

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LARISSA VASCONCELOS FONTES

**Diferenciação de células T reguladoras tímicas
em camundongos geneticamente mutantes em WASp**

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

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

RIO DE JANEIRO

Vasconcelos-Fontes, Larissa.

Diferenciação de células T reguladoras tímicas em camundongos geneticamente mutantes em WASp / Larissa Vasconcelos-Fontes. - Rio de janeiro, 2020.

102 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientador: Vinícius Cotta-de-Almeida.

Co-orientadora: Adriana César Bonomo.

Bibliografia: f. 70-87

1. células T reguladoras. 2. Timo. 3. Camundongos geneticamente modificados em WASp. 4. diferenciação . I. Título.

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

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LARISSA VASCONCELOS FONTES

**Diferenciação de células T reguladoras tímicas em camundongos geneticamente
mutantes em WASp**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Andrea Henrique Pons – IOC- Fiocruz
Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos– IFF - Fiocruz
Prof. Dr. Fábio Barrozo do Canto - UFF

Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso - IOC- Fiocruz
Profa. Dra. Flávia Ribeiro Gomes – IOC - Fiocruz

Rio de Janeiro, 17 de março de 2020

Dedico essa tese aos meus amores, por todo apoio e confiança no meu potencial.
Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Farei um agradecimento breve a todos que participaram dessa longa caminhada acadêmica. Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, por nunca terem me obrigado

a estudar, fazendo com que isso fosse algo divertido. Sem dúvidas, o apoio de vocês em todas as decisões da minha vida me ajudou a chegar até aqui. Vocês são maravilhosos! À minha irmã, que sempre me incentivou e tinha em mim um exemplo para ir atrás dos próprios sonhos. Ter você na minha vida é a melhor coisa que meus pais já me deram. Ao Guilherme, pela paciência, palavras de apoio e admiração em todas minhas fases durante essa montanha russa que foi o doutorado. Obrigada por me transbordar, sem você seria mais difícil. Aos meus familiares, sogros e cunhada que mesmo de longe sempre me incentivaram. Ver vocês vibrarem em cada conquista foi muito importante. Aos meus amigos, aqueles que o colégio me deu lá no passado, os da faculdade, do meu ex-condomínio e do intercâmbio, cada um de vocês contribuiu para que os dias pesados ficassem mais leves, que os momentos de descontração fizessem meu coração e minha cabeça acalmar, que dividiram as angústias e frustrações comigo. Obrigada por tanto.

Nesse segundo bloco quero agradecer meus orientadores, Dr. Vinícius Cotta de Almeida, que me acompanha desde a IC e a Dra. Lisa Westerberg, que foi uma surpresa maravilhosa que o PDSE me proporcionou. Vini, obrigada pelas discussões científicas, políticas e de vida! Você não imagina o tanto que te agradeço por tantas oportunidades. Lisa, thanks for all the discussions, experiments and to make me feel super welcome and warm in your lab, even with all the snow and darkness. You are an amazing PI. Thanks so much! Ao Dr. Wilson Savino, pela oportunidade quando eu mesma não sabia o que queria da minha vida. Ter entrado no seu laboratório com certeza engrandeceu e muito minha caminhada acadêmica e pessoal. A todos os pesquisadores do laboratório, por tantos “journals” e discussões interessante; além da amizade e do melhor ambiente de trabalho possível. Não deixem isso se perder, nunca! Aos meus colegas de laboratório do Brasil que permanecem e que já se foram, obrigada pelas festas, companhias e discussões científicas, sentirei saudade dos Outbacks e da conversa no corredor. Em especial, quero agradecer a Julia, Carol, Rafa, Ju Barreto, Arnon, Felps, Pedro, Marina e Rômulo pela amizade dentro e fora do laboratório. Quero levar essa amizade para vida, só depende da gente! To my colleagues in Sweden, thank you for welcoming me, including me in everything and making me so happy during the exchange. You are awesome!

Neste último bloco gostaria de agradecer aos avaliadores que aceitaram fazer parte desse momento tão importante da minha vida. Obrigada a todos!

ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

T CD4 SP – linfócitos T CD4 simples-positivos, fenótipo CD4⁺CD8⁻

CCL – quimiocinas do tipo CC

CD8 SP - linfócitos T CD8 simples-positivos, fenótipo CD4⁻CD8⁺

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

cTEC – células epiteliais tímicas corticais

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

CXCL – quimiocinas da família CXC

DC – células dendríticas (do inglês, “dendritic cells”)

cDC – células dendríticas convencionais

pDC – células dendríticas plasmocitóides

DN – duplo-negativo, fenótipo CD4⁻CD8⁻

DP – duplo-positivo, fenótipo CD4⁺CD8⁺

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

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

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

GITR – (do inglês, “glucocorticoid-induced TNFR family related protein”)

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

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IPEX – Síndrome ligada ao X

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

iTreg– células T reguladoras induzidas

mDCs – células dendríticas da região medular do timo

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

mTEC – células epiteliais tímicas medulares (do inglês, “medullary thymic epithelial cells”)

NRP1 – neuropilina 1

OVA - ovalbumina

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

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

pTreg- células T reguladoras de origem periférica

S1P – esfingosina 1 fosfato

S1P1 – receptor de esfingosina 1 fosfato

SCF – fator de célula tronco (do inglês, “stem cell factor”)

STAT – fator de transcrição (do inglês, “signal transducer and activator of transcription”)
TCR – receptor de célula T (do inglês, “T cell receptor”)
TEC – células epiteliais tímicas (do inglês, “thymic epithelial cells”)
TGF- β – fator de transformação e crescimento celular (do inglês, “transforming growth factor beta”)
TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, “tumor necrosis factor”)
Treg – células T reguladoras
tTreg - células T reguladoras de origem tímica
TSAs – antígenos próprios tecido-específicos (do inglês, “tissue-specific self antigens”)
VCA – (do inglês, “verprolin homology; cofilin homology domain; acid region”)
WAS – Síndrome de Wiskott-Aldrich (do inglês “Wiskott-Aldrich Syndrome”)
WASp – proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich (do inglês “Wiskott-Aldrich Syndrome protein”)
WH1 – domínio 1 homólogo a WASp (do inglês, “WASp homology domain 1”)
WIP – proteína de interação com WASp (do inglês, “WASp interaction protein”)
WT – camundongo controle (do inglês “wild type”)
WASp-KO – camundongo geneticamente deficiente em WASp (do inglês, “WASp knockout”)
XLN – neutropenia ligada ao X (do inglês, “X-linked neutropenia”)
XLT – trombocitopenia ligada ao X (do inglês, “X-linked thrombocytopenia”)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
ABREVIATURAS E SIGLAS	v

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
Diferenciação de células T reguladoras tímicas em camundongos geneticamente mutantes em WASp.....	xiv
RESUMO	xiv
Differentiation of regulatory T cells in mice genetically mutant in WASp	xv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Timo.....	1
1.1.1 O Microambiente Tímico.....	2
1.2 Desenvolvimento, Maturação e Seleção de Timócitos	4
1.3 As Células T Reguladoras	7
1.3.1 Histórico.....	7
1.3.2 Caracterização fenotípica de Células T Reguladoras	8
1.3.3 Subpopulações de Células T Reguladoras	10
1.3.4 Geração de Células T Reguladoras no Timo	12
1.3.5 Moléculas Envolvidas na Migração de T Reguladoras	16
1.3.6 Mecanismos de Ação de Células T Reguladoras	17
1.4 As alterações na proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	19
1.4.1 A Síndrome de Wiskott-Aldrich.....	19
1.4.2 A Neutropenia ligada ao X.....	20
1.4.3 WASp em nível molecular	21
1.4.4 A WASp e as Células do Sistema Imunitário	23
1.4.5 A WASp e as Células T Reguladoras	24
2 JUSTIFICATIVA/HIPÓTESE	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Principal	27

3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Anticorpos, Moléculas E Kits	29
4.2.1 Anticorpos	29
4.2.2 Moléculas	31
4.2.3 Kits	31
4.3 Obtenção De Células	32
4.4 Fenotipagem de timócitos, tTreg, Células B e Células Dendríticas por Citometria de Fluxo	32
4.5 Ensaio de Diferenciação	35
4.6 Ensaio de Proliferação	36
4.7 Obtenção de Tecidos	36
4.8 Imunofluorescência Indireta	37
4.9 Marcação de Proteínas Fosforiladas por Citometria de Fluxo	37
4.10 Ensaio de Adesão	37
4.11 Avaliação Multiplex de Citocinas	38
4.12) Análises Estatísticas	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Mutações na molécula WASp impactam as populações de timócitos CD4 SP e CD8 SP	39
5.2 Deficiência em WASp impacta a população de células T Reguladoras de origem tímica	41
5.3 Deficiência em WASp impacta a população de células B tímicas, mas não a de células dendríticas tímicas	42
5.4 Mutações em WASp impactam na diferenciação <i>in vitro</i> de células T Reguladoras	45
5.5 Células do camundongo WASp-KO parecem não apresentar defeitos na sinalização de IL-2 e TGF- β , no entanto, a disponibilidade de TGF- β parece estar diminuída no timo	47

5.6 A proliferação das células T reguladoras encontra-se comprometida em células provenientes de animais WASp-KO	50
5.7 O TGF- β bloqueia a diferenciação e proliferação <i>in vitro</i> de células T reguladoras e inibe a regulação positiva de Foxp3 em células WASp-KO.....	55
5.8 Há uma morte pronunciada nos timócitos provenientes dos animais WASp-KO após 72h de estímulo em cultura	56
6. DISCUSSÃO	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

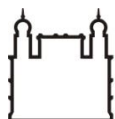
Figura 1 - Localização anatômica do timo.	1
---	---

Figura 2 - Representação esquemática da migração intratímica de linfócitos T e microambiente tímico.	2
Figura 3- Visão do desenvolvimento de células T nas zonas de sinalização.	6
Figura 4 - Sinalização nos processos de diferenciação de células Treg.	14
Figura 5 - Estrutura e domínios de WASp.	22
Figura 6 - Representação do fluxo das análises citofluorométricas I.	34
Figura 7 - Representação do fluxo das análises citofluorométricas II.	34
Figura 8 - Representação do fluxo das análises citofluorométricas III.	35
Figura 9 - O timo do camundongo I296T-WASp tem menor tamanho, número de timócitos e de células T CD4 SP.	40
Figura 10 – Camundongo WASp-KO apresenta mais timócitos CD4 SP e CD8 SP no estágio maduro.	41
Figura 11 - Diminuição de células tTreg em animais WASp-KO e I296T-WASp.	42
Figura 12 - Discreta alteração nas células dendríticas tímicas.	43
Figura 13- Diminuição das células B tímicas em animais WASp-KO.	44
Figura 14 - Diminuição das células Treg e B tímicas em animais WASp-KO.	45
Figura 15 - Animais WASp-KO têm menos células Treg após diferenciação <i>in vitro</i>	46
Figura 16 – As células CD4 SP obtidas de animais WASp-KO pouco se diferenciam em células Treg e células precursoras após diferenciação <i>in vitro</i>	47
Figura 17 - As células dos animais WT, WASp-KO, L272P-WASp e I296T-WASp apresentam níveis de pSTAT5 e pSmad2/3 semelhantes em resposta à sinalização de IL-2 e TGF- β	48
Figura 18 - Diminuição de TGF- β no timo dos animais WASp-KO.	49
Figura 19 – O animal WASp-KO apresenta redução da citocina TGF- β em relação aos animais WT e com mutações do tipo XLN.	50
Figura 20 - Análise dos histogramas demonstram defeito na proliferação de células Treg de células provenientes de animais WASp-KO.	51
Figura 21 - Diminuição da proliferação e diferenciação <i>in vitro</i> de células Treg provenientes de animais WASp-KO e aumento da proliferação.	52
Figura 22 - A diferenciação/proliferação <i>in vitro</i> de Treg começa a partir de 36h nas células obtidas do animal WT, mas o mesmo não acontece para as células do WASp-KO.	53
Figura 23 - Porcentagem de células Foxp3 ⁺ nas diferentes gerações do ciclo celular.	54

Figura 24 - A regulação positiva de CD25 é atrasada nas células provenientes do WASp-KO.	55
Figura 25 - TGFb bloqueia a diferenciação e proliferação de células do animal WASp-KO em células Treg <i>in vitro</i>	57
Figura 26 – Percentual de células mortas na cultura em 48h e 72h.	58
Figura 27 - Adesão de timócitos CD4 SP do WASp-KO é menor ao anti-CD3.	59
Figura 28 - Resumo	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas identificadas como marcadores de células Treg murina.....	9
Tabela 2: Experimento e idade dos animais.....	28
Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados.....	29



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

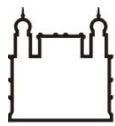
Diferenciação de células T reguladoras tímicas em camundongos geneticamente mutantes em WASp

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Larissa Vasconcelos Fontes

A proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) regula a dinâmica de rearranjos do citoesqueleto de actina e a função das células hematopoiéticas. Mutações no gene *WAS* levam a duas síndromes de imunodeficiência diferentes: a Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), causada por mutações de perda de função na WASp, e a neutropenia ligada ao X (XLN), causada por mutações de ganho de função. Foi demonstrado que os pacientes com WAS e XLN carregam várias anormalidades nas atividades linfocitárias. Curiosamente, mostramos anteriormente que a inativação de WASp em camundongos ("Wasp-knockout"-WASp-KO) resulta em número reduzido de células T reguladoras (Treg) no timo e na periferia. Entretanto, ainda não se sabe como a WASp constitutivamente ativa afeta a função das células Treg. Neste projeto, avaliamos o impacto das mutações em WASp na diferenciação de células Treg no timo de camundongos WASp-KO e de camundongos XLN (knock-in para mutações presentes na XLN). As células do timo de camundongos WT, WASp-KO e XLN foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação dos timócitos, células B e células dendríticas. Para avaliar se as células provenientes de camundongos WASp-KO e XLN eram capazes de se diferenciar em células Treg, isolamos células CD4 SP e cultivamos com diferentes combinações de estímulos, como IL-2, TGF- β , anti-CD3 e anti-CD28, por 12 a 72 horas, marcadas ou não com CFSE para rastrear células em proliferação. Nossos resultados mostram que o timo dos animais WASp-KO apresenta diminuição significativa de células Treg, e os animais com mutação I296T-WASp apresentam leve diminuição dessas células. Quando comparadas aos camundongos WT, as células B tímicas estão diminuídas nos camundongos WASp-KO. Além disso, usando ensaios de diferenciação *in vitro*, descobrimos que timócitos CD4 SP de camundongos WASp-KO mostram diferenciação reduzida para células Treg. Apesar desse defeito, as células CD4 SP deficientes em WASp apresentam sinalização eficiente após estimulação com IL-2 e TGF- β , medida pela regulação positiva da expressão de fosfo-Stat5 e fosfo-Smad2/3, respectivamente. Embora as células obtidas dos camundongos WASp-KO tenham regulado positivamente o fator de transcrição Foxp3, elas não proliferaram, levando a um número menor de células Treg Foxp3⁺. Curiosamente, as células CD4 SP dos animais XLN proliferaram mais rapidamente quando comparadas às células do animal WT, tendo uma maior fração das células XLN Foxp3⁻, que pode ser causada pela rápida proliferação. Nós fornecemos evidências de que o timo de camundongos mutantes em WASp apresentou alterações em subpopulações de timócitos e de outras células tímicas. Por fim, esses resultados mostram que diferentes mutações em WASp afetam a diferenciação das células Treg de maneira bastante distinta, sugerindo um papel central da WASp durante o desenvolvimento das células T.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Differentiation of regulatory T cells in mice genetically mutant in WASp

ABSTRACT

PhD Thesis

Larissa Vasconcelos Fontes

The Wiskott-Aldrich syndrome (WASp) protein regulates the dynamics of actin cytoskeleton rearrangements and the function of hematopoietic cells. Mutations in the *WAS* gene lead to two different immunodeficiency syndromes: Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS), caused by loss-of-function mutations in WASp, and X-linked neutropenia (XLN), caused by gain-of-function mutations. It has been shown that patients with WAS and XLN carry various abnormalities in lymphocyte activities. Interestingly, we showed earlier that the inactivation of WASp in mice ("Wasp-knockout" -WASp-KO) results in a reduced number of regulatory T cells (Treg) in the thymus and in the periphery. However, it is not yet known how constitutively active WASp affects the function of Treg cells. In this project, we evaluated the impact of WASp mutations on the differentiation of Treg cells in the thymus of WASp-KO mice and XLN mice (knock-in for XLN mutations). The thymus cells of WT, WASp-KO and XLN mice were analyzed by flow cytometry to evaluate thymocytes, B cells and dendritic cells. To assess whether cells from WASp-KO and XLN mice were able to differentiate into Treg cells, we isolated CD4 SP cells and cultured with different combinations of stimuli, such as IL-2, TGF- β , anti-CD3 and anti-CD28, for 12 to 72 hours, labeled or not with CFSE to track proliferating cells. Our results showed that WASp-KO have a significant decrease in Treg cells, and animals with I296T-WASp mutation have a slight decrease in these cells. When compared to WT mice, thymic B cells are decreased in WASp-KO mice. In addition, using *in vitro* differentiation assays, we found that CD4 SP thymocytes from WASp-KO mice show reduced differentiation for Treg cells. Despite this defect, WASp-deficient CD4 SP cells present efficient signaling after stimulation with IL-2 and TGF- β , measured by the positive regulation of the expression of phospho-Stat5 and phospho-Smad2/3, respectively. Although the cells obtained from the WASp-KO mice have positively regulated the Foxp3 transcription factor, they have not proliferated, leading to a smaller number of Foxp3⁺Treg cells. Interestingly, the CD4 SP cells from XLN animals proliferated more quickly when compared to WT cells, having a larger fraction of XLN Foxp3⁺ cells, which can be the result of rapid proliferation. We provide evidence that the thymus of WASp mutant mice showed changes in subpopulations of thymocytes and other thymic cells. Finally, these results show that different mutations in WASp affect the differentiation of Treg cells in different ways, suggesting a central role for WASp during the development of T cells.

1. INTRODUÇÃO

A formação do repertório de linfócitos T ocorre essencialmente em um órgão especializado, o timo, e consiste em etapas determinantes durante o desenvolvimento dos timócitos, dependendo do controle de diferentes interações moleculares com células do microambiente tímico (Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007). Dessa forma, o timo é um órgão linfoide primário com papel fundamental para a formação e função do sistema imunitário adaptativo. Esse, envolve uma complexa rede de mecanismos de defesa e regulação. Os linfócitos T têm papel fundamental na resposta celular da imunidade adaptativa, sendo também, importantes para ativação de linfócitos B, células produtoras de anticorpos, um outro mecanismo da resposta adaptativa. Os linfócitos T e B estão relacionados com o reconhecimento de antígenos por receptores específicos para antígenos (Flajnik e Kasahara 2010).

1.1 O Timo

O timo é um órgão linfoide primário, bilobado, situado no mediastino anterior, acima do coração (**Figura 1A**). Ele é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, de onde e cada lobo é dividido em lóbulos contínuos separados por septos (**Figura 1B**). Estes apresentam uma região externa denominada de córtex e uma região medular central (**Figura 1C**).

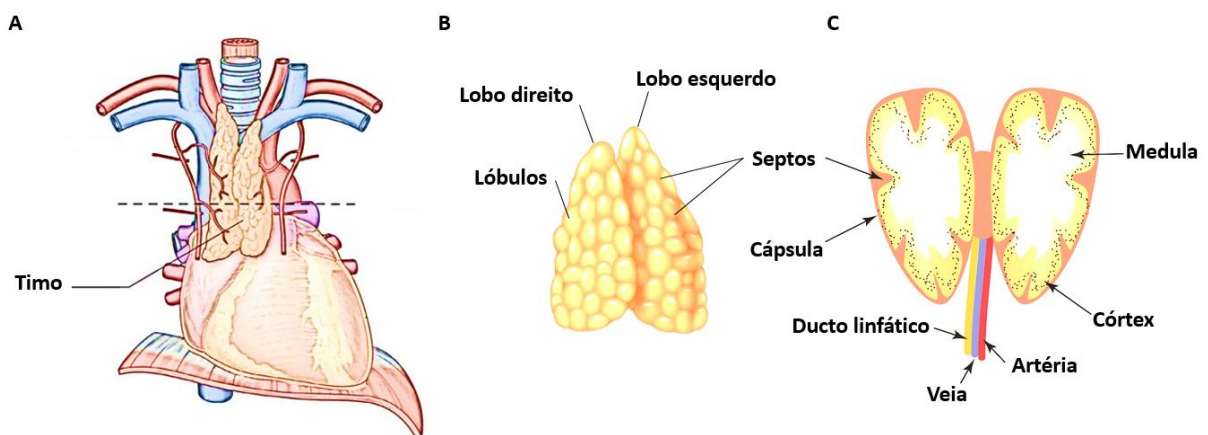


Figura 1 - **Localização anatômica do timo.** Localização do timo no mediastino anterior (A). O timo dividido em lobo direito e lobo esquerdo, as setas demonstram os septos que dividem o lobo em lóbulos (B). Corte do timo mostrando área de medula, córtex, cápsula, artéria, veia e ducto linfático (ducto torácico). **Fonte:** Vetores do DepositPhotos

O parênquima tímico é principalmente constituído por timócitos em processo de desenvolvimento e um rico microambiente, composto por células não linfoides, como células

epiteliais tímicas corticais (cTECs), células epiteliais tímicas medulares (mTECs), fibroblastos, células dendríticas e macrófagos e por algumas células linfoides, como células B tímicas. Esses componentes encontram-se entremeados em uma rede de matriz extracelular (ECM) (revisado por Savino *et al.* 2004).

1.1.1 O Microambiente Tímico

O timo tem uma organização orientada tridimensionalmente, devido à sua composição de timócitos, células não linfoides (**Figura 2**) e ECM formando uma rede (van Ewijk *et al.* 1999). Esta rede celular envolve os vasos sanguíneos no córtex e efetivamente isola linfócitos em desenvolvimento, impossibilitando o contato dessas células com antígenos próprios (barreira hemato-tímica), um mecanismo que regula o processo de tolerância central, responsável por eliminar células autorreativas na medula do timo (Sprent e Kishimoto 2001; Gameiro *et al.* 2010)

As TECs são populações de células que vão povoar o timo e ocupar regiões específicas. Por apresentarem altos níveis de moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e II, as TECs são as principais responsáveis pela seleção positiva dos timócitos em desenvolvimento (revisado por Crivellato *et al.* 2004; Savino *et al.* 2004). Essas células também produzem citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos e hormônios essenciais para a migração e diferenciação dos timócitos (Savino e Dardenne 2010; Savino *et al.* 2015).

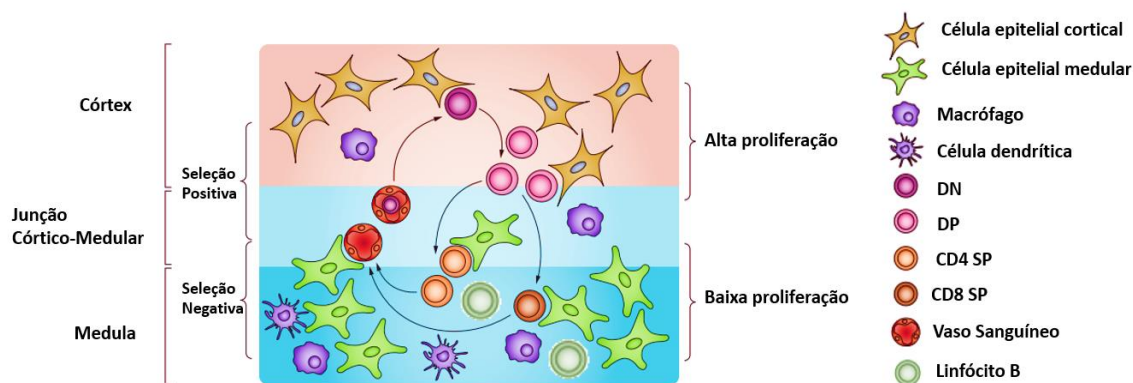


Figura 2 - **Representação esquemática da migração intratímica de linfócitos T e microambiente tímico.** Esquema simplificado de migração do timócito, desde a entrada do precursor na junção córtico-medular, sua migração dentro do órgão com consequente diferenciação, até a formação do timócito maduro CD4⁺ ou CD8⁺ e a relação entre os timócitos e o microambiente tímico de acordo com a região em que se encontra. **Fonte:** Modificado de Savino *et al.*, 2015.

As células B estão em baixa frequência no timo normal (0,1-0,3%) e têm função na seleção negativa (Frommer e Waisman 2010), elas expressam Aire e estão envolvidas na

deleção de células autoreativas (Gies et al. 2017). Elas são encontradas desde estágios fetais e não parecem ser recirculantes, pois foi identificada uma célula-progenitora-*like* de B no timo (B220^{lo}CD43⁺Ig⁻) que ao ser estimulada com IL-7 e FLT3L deu origem a um grupo de células B220^{hi}CD43-IgM⁺, fenótipo característico de células B tímica. Essas células B tímicas também expressam CD19, CD5, CD69, CD80, CD86, CD40 e MHCII (Suvas *et al.* 2002; Xu *et al.* 2008; Frommer e Waisman 2010; Perera *et al.* 2013). São encontradas na região córtico-medular e na medula do timo, possuem moléculas co-estimulatórias e são capazes de apresentar peptídeos através de moléculas de MHC classe II (Suvas *et al.* 2002; Xu *et al.* 2008).

As citocinas são polipeptídeos solúveis secretadas com funções de crescimento, diferenciação e ativação que regulam e determinam a natureza das respostas imunitárias (revisado por Borish e Steinke 2003). No timo, elas são normalmente produzidas pelas células do microambiente tímico, e algumas agem como fatores de crescimento e são responsáveis pela estimulação da linfopoiese. As citocinas comumente produzidas no timo são as interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-7 e fator de célula tronco (SCF, do inglês “stem cell factor”). A IL-7 desempenha um papel central no comprometimento de células T auxiliando na diferenciação e sobrevivência das mesmas, sendo produzida por todo estroma, e a IL-2 é necessária para a sobrevivência, geração e para a função das células T reguladoras (Treg), e também tem papel fundamental na maturação de células T (Savino *et al.* 2004; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007).

Já as quimiocinas (citocinas quimiotáticas) contribuem para a funcionalidade do microambiente tímico em dirigir o processo migratório dos progenitores linfoides que colonizarão o timo e das células T em desenvolvimento até sua emigração do órgão. Dependendo da fase de maturação, os timócitos mudam a expressão dos receptores de quimiocinas. A maioria das quimiocinas é encontrada na forma solúvel e pode ser imobilizada pelas moléculas da ECM (Savino *et al.* 2002). As quimiocinas são cruciais para o tráfego linfocitário, como CCL21, CCL25 e CXCL12 que são quimioatrativos vitais em diferentes estágios de maturação dos timócitos, propiciando que os precursores de células T alcancem a camada cortical. O eixo CXCL12-CXCR4 medeia o fluxo de timócitos desde a entrada do progenitor linfóide no timo, da migração até a região sub-capsular e região córtico-medular dirigindo o timócito à região medular. Por fim, as quimiocinas CCL19/CCL21 que também estão envolvidas em fases mais imaturas durante a entrada dos progenitores no timo, estão mais concentradas na região medular e envolvidas na saída de timócitos maduros para periferia (revisado em Gameiro *et al.* 2010).

Além dos componentes já mencionados, o tráfego de timócitos por todo parênquima tímico é auxiliado pela densa rede de ECM. Durante a migração dos timócitos, os eventos de adesão e de-adesão, principalmente uma adesão moderada, são cruciais para que os timócitos entrem em contato com os sinais corretos para sua maturação. Nesse contexto, a rede de ECM é fundamental para esses eventos adesivos e de-adesivos, que ocorrem no desenvolvimento intratímico (Savino *et al.* 2004). Os fibroblastos e as TECs expressam ainda a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1, do inglês “intracellular adhesion molecule 1”) e a molécula de adesão vascular (VCAM-1, do inglês “vascular cell adhesion molecule 1”), capazes de promover a adesão de timócitos maduros ao endotélio (Le and Singer 1993). O microambiente tímico produz diversas glicoproteínas dessa complexa rede de ECM, como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV. Esses componentes serão fundamentais para os eventos adesivos que ocorrem no timo.

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

1.2 Desenvolvimento, Maturação e Seleção de Timócitos

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

Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo migram ativamente pelo órgão, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-ECM e, ainda, através da liberação de fatores solúveis. Dois grupos de linfócitos T, diferenciados pelas cadeias que formam o TCR dessas células, são formados durante a diferenciação tímica. Um primeiro, chamados de linfócitos $\gamma\delta$, são diferenciados principalmente na vida fetal e ocupam tecidos específicos. Já os linfócitos $\alpha\beta$, são gerados durante toda a vida e estão em muitos tecidos, sangue e órgãos linfoides secundários (Savino *et al.* 2002, 2004; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Savino e Dardenne 2010).

Conforme citado previamente, timócitos em diferentes estágios de maturação ocupam regiões distintas no timo, indicando que a diferenciação acontece com a migração altamente coordenada através do microambiente (**Figura 3**). Os progenitores imaturos provenientes da medula óssea (ETPs) entram na junção córtico-medular. Essas células não expressam os correceptores CD4 ou CD8 nem o CD25 (CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻) e são chamadas de duplo-negativas (estágio DN1) (Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Elas migram em direção à zona subcapsular. Durante o trajeto, no meio do córtex, tornam-se CD25⁺ (cadeia α do receptor da IL-2) e passam a ser chamadas de DN2 (CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁺) (Schmitt *et al.* 2004; Hauri-Hohl *et al.* 2014). No córtex, na fase DN2 começa a acontecer a recombinação do TCR (do inglês, “T cell receptor”) após sinalização por Notch/Kit. A recombinação D-J, diverge os timócitos em duas linhagens de linfócitos T que expressam diferentes cadeias de receptores para antígeno: $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. A primeira recombinação acontece nas cadeias TCR γ e TCR δ . Dessa forma, os timócitos comprometidos com a linhagem $\gamma\delta$ são formados primeiro (Dudley *et al.* 1994; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Já na fase DN3 (CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁺), o locus do TCR β sofre a recombinação V-DJ e o timócito em maturação apresenta o pré-TCR. As células que têm um rearranjo improdutivo sofrem apoptose e são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas. Se a recombinação tem êxito, ocorre uma redução da expressão de CD25 e a expansão de timócitos, chamados então de DN4 (CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁻) (Crompton *et al.* 1994; Yamasaki *et al.* 2006). Esse processo é conhecido como seleção β (Dudley *et al.* 1994; Surh e Sprent 1994). Os timócitos continuam sua migração em direção à medula e sofrem o rearranjo da cadeia α do TCR e passam então a expressar os dois co-receptores CD4 e CD8, nesse estágio as células têm fenótipo CD4⁺CD8⁺ e são chamadas de duplo-positivas (DP) (Petrie *et al.* 1993; Dudley *et al.* 1994). As cTECs apresentam peptídeos através da molécula de MHC às células em desenvolvimento. As células T que interagem com baixa afinidade aos complexos MHC/peptídeo estão aptas a sobreviver, e ao reconhecer as moléculas de MHC de classe I ativam o fator de transcrição RUNX se tornam células simples-positivas (SP) para o receptor CD8 e as células que reconhecem as moléculas MHC de classe II e ativam o fator de transcrição Th-POK se tornam células T CD4 SP (Wong *et al.* 2011). Esse mecanismo é denominado de seleção positiva e auxilia as células aptas a continuarem a migração até a medula, onde elas terminam sua maturação, além de desencadear uma maquinaria transcricional que opera distintamente para diferenciação final (Singer *et al.* 2009; Morris e Allen 2012). As células que se ligaram com alta avidéz ao MHC passam a estar sob controle de mecanismos de indução à

tolerância. Esses mecanismos compreendem principalmente os processos de deleção clonal, anergia e desvio clonal (Xing e Hogquist 2012).

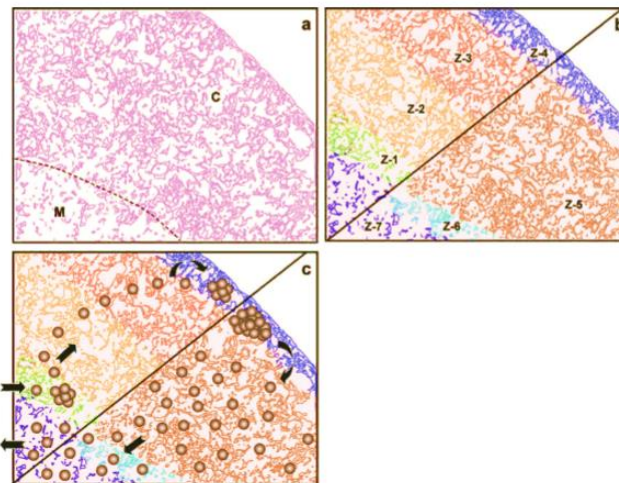


Figura 3- **Visão do desenvolvimento de células T nas zonas de sinalização.** Os limites das principais áreas histológicas, córtex (C) e medula (M), são demarcados por uma linha tracejada (a). Zonas 1 a 7 são codificados por cores e representam os estágios pelos quais o timócito vai transcorrer durante a maturação. A linha diagonal separa as zonas de movimento para o exterior (superior esquerdo) e o movimento para o interior (inferior direito) (b). O padrão de migração de células progenitoras no timo é representado por uma camada de células linfoides. As densidades relativas indicam vagamente zonas de proliferação de timócitos (c). **Fonte:** Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007.

Dentro da medula tímica, o timócito sofre a seleção negativa ou deleção clonal, um mecanismo de tolerância que vai prevenir a autoimunidade. A deleção clonal é dependente das mTEC, células B e das células dendríticas, que ocorre em função da duração e força da interação com o TCR e os consequentes diferentes níveis de sinalização intracelular (Hinterberger *et al.* 2010). As mTECs apresentam antígenos próprios tímicos e específicos de tecidos extratímicos (TSAs do inglês “tissue-specific self-antigens”) e selecionam os timócitos aptos a migrarem para a periferia. As células dendríticas medulares (mDCs) são importantes na indução da apoptose nos timócitos autorreativos. Os timócitos que interagem com elevada afinidade e forte sinalização com o complexo MHC-peptídeo próprio entram em processo de morte por apoptose através da ativação da caspase 8. As mTEC expressam o gene *AIRE* (definido a partir do termo “autoimmune regulator”) que regula a expressão de diversos TSAs para desenvolvimento de timócitos de maneira dose-dependente, impedindo que células altamente autorreativas saiam do timo (revisado em Savino e Dardenne 2010; Xing e Hogquist 2012; Passos *et al.* 2015). Além dessas células clássicas, foi visto recentemente que células B e os próprios timócitos se ligando de forma estável a outros timócitos podem auxiliar na seleção negativa (Melichar *et al.* 2014).

Células que reconhecem com determinada avidéz os antígenos apresentados pelo MHC de classe II das mTECs podem sofrer um desvio clonal, que compreende uma série de estímulos

que levam à geração de células T reguladoras (Treg), discutidas com mais detalhe abaixo (Xing e Hogquist 2012).

1.3 As Células T Reguladoras

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

1.3.1 Histórico

As primeiras descrições de células T especializadas na regulação da resposta imunitária ocorreram na década de 70. Naquela época, foi descrito que a depleção de determinadas células T em animais normais poderia causar doenças autoimunes (Gershon e Kondo 1970). Ainda nessa década, foi visto que a timectomia em camundongos de 2-4 dias levava a disgenesia ovariana, mas que se a timectomia fosse realizada no dia 7 isso não acontecia (Nishizuka e Sakakura 1969; Nishizuka *et al.* 1971). Avançando para a década de 90, Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi *et al.* 1995) caracterizaram uma subpopulação de linfócitos T CD4 que expressavam a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e demonstraram através de ensaios de transferência celular que essas células eram responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças autoimunes.

Em humanos, as células Treg representam de 5% a 10% do total de linfócitos T CD4 no sangue periférico (Baecher-Allan *et al.* 2001); já nos órgãos linfoides periféricos de camundongos, essas células constituem 5-15% dos linfócitos T CD4 (Holm *et al.* 2004; Ohkura e Sakaguchi 2010).

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

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

Nesse contexto, pacientes com mutação no gene *FOXP3* apresentam a síndrome IPEX (do inglês, “Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome”), caracterizada por eventos de imunodesregulação com geração de clones de linfócitos T autorreativos que agridem múltiplos órgãos (Chatila *et al.* 2000; Bennett *et al.* 2001; Wildin *et al.* 2001; Levings *et al.* 2002). Camundongos com mutação ou inativação gênica de *Foxp3* (camundongos *scurfy*) desenvolvem uma síndrome autoimune letal, que causa uma proliferação descontrolada de linfócitos T CD4 e acometimento de múltiplos órgãos (Clark *et al.* 1999; Brunkow *et al.* 2001). Desse modo, *Foxp3* é um gene mestre para o desenvolvimento e a função de células Treg CD4⁺CD25⁺ (Fontenot *et al.* 2005b; Curotto de Lafaille and Lafaille 2009; Ohkura and Sakaguchi 2010).

1.3.2 Caracterização fenotípica de Células T Reguladoras

Conforme descrito acima, as células Treg expressam altas concentrações de CD25 em sua superfície e o fator de transcrição Foxp3, sendo assim definidas fenotipicamente como células CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺. No entanto, outros marcadores são encontrados nessa célula. A cadeia β (CD122) e a cadeia γ (CD132) do IL-2R, juntamente com a cadeia α, formam um complexo de alta afinidade para IL-2, essencial para a maturação das células Treg (Thornton e Shevach 1998; Thornton *et al.* 2004). Ainda, a presença de CTLA-4 (do inglês, “cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4”) e GITR (do inglês, “glucocorticoid-induced TNFR family related protein”) e a baixa expressão de CD127, embora não sejam marcadores exclusivos de células Treg, são utilizados como marcadores para caracterização fenotípica dessas células (Mazzucchelli e Durum 2007; Schmetterer *et al.* 2012)

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

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

CD25	Cadeia α do receptor de IL-2; ativa a via de sinalização que vai culminar com ativação de STAT5 importante para manutenção e desenvolvimento de células Treg	(Sakaguchi <i>et al.</i> 1995)
CD122	Cadeia β do receptor de IL-2; forma o complexo do receptor de alta afinidade para o IL-2	(Thornton <i>et al.</i> , 2004)
CD132	Cadeia γ do receptor de IL-2; forma o complexo do receptor de alta afinidade para o IL-2	(Thornton <i>et al.</i> 2004)
Foxp3	Fator de transcrição importante no desenvolvimento de células Treg e função supressora; reprime a transcrição de genes envolvidos na diferenciação de Th1 e Th2	(Fontenot <i>et al.</i> 2003; Hori <i>et al.</i> 2003; Lin <i>et al.</i> 2007)
Helios	Fator de transcrição da família Ikaros; se liga ao promotor de Foxp3 mantendo assim a expressão de Foxp3 e aumentando a atividade supressora de Treg	(Sugimoto <i>et al.</i> 2006; Thornton <i>et al.</i> 2010; Getnet <i>et al.</i> 2011)
GITR	Receptor de TNF induzida por glicocorticóides; regula negativamente a função de Treg, anulando a supressão de Treg; importante na geração de tTreg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28	(Shimizu <i>et al.</i> 2002; Kanamaru <i>et al.</i> 2004; Mahmud <i>et al.</i> 2014)
Neuropilina 1 (Nrp1)	Altamente e constantemente expressa em tTregs; a neutralização dessa molécula leva a anulação da supressão.	(Bruder <i>et al.</i> 2004; Gray <i>et al.</i> 2005)
DR3	Receptor da família do TNF; promove sobrevivência e expansão de Treg por estimular PI3K/Akt.	(Croft 2015)
CTLA-4	Se liga a CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos impedindo que células T efectoras se liguem	(Takahashi <i>et al.</i> 2000; Zheng <i>et al.</i> 2006)
CD127	Cadeia α do receptor de IL-7, não é expresso em Treg e por isso serve com um marcador excludente de células Treg	(Liu 2006; Mazzucchelli e Durum, 2007)
CD62L	L-Selectina; permite a entrada de células em órgãos linfoides periféricos, sua ausência funciona como marcador de células ativadas; determina uma subpopulação com grande capacidade reguladora	(Salomon <i>et al.</i> 2000)
LAG-3	Expressa em T efectoras e Tregs ativadas, se liga ao MHC classe II e APCs competindo com as células T efectoras	(Huard <i>et al.</i> 1995)
CCR6/CCR4/CXCR3/CCR9	CCR6 é um marcador de célula Treg de memória; todos esses marcadores promovem agregação de células tTreg em tecidos não linfoides; auxiliam na resposta rápida nesses tecidos	(Kleinewietfeld <i>et al.</i> 2005; Sather <i>et al.</i> 2007; Guo <i>et al.</i> 2008; Yamazaki <i>et al.</i> 2008)
PD-1/CD279	Expresso em tTreg não ativadas, permitino a identificação de Treg ativadas das não ativadas; influencia a tolerogenicidade de DCs	(Raimondi <i>et al.</i> 2006; Francisco <i>et al.</i> 2011)
CD39	Marcador de superfície com alta correlação com Foxp3; funciona como uma ectoATPase de membrana, levando à atividade supressora pela produção de adenosina.	(Borsellino <i>et al.</i> 2007; Deaglio <i>et al.</i> 2007)
CD44	Marcador de um subgrupo distinto tem alta relação com Foxp3 e com a produção de IL-10; sua ausência está relacionado com um fenótipo menos supressor de Treg	(Liu <i>et al.</i> 2009)

CD73	Funciona como uma ectoATPase de membrana, levando à atividade supressora pela produção de adenosina do mesmo modo que o CD39	(Deaglio <i>et al.</i> 2007)
OX40 (CD134)	Membro da superfamília TNFR/TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28; controlador da atividade supressora na periferia através da ativação de fatores de transcrição de célula T efetoras (GATA-3 e T-bet)	(So <i>et al.</i> 2008; Mahmud <i>et al.</i> 2014; Kumar <i>et al.</i> 2018)
4-1BB (CD137)	Membro da superfamília TNFR/TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; controlador da atividade supressora na periferia através da ativação de fatores de transcrição de célula T efetoras (GATA-3 e T-bet)	(So <i>et al.</i> 2008)
TNFR2	Receptor de TNF importante na geração de Treg por aumentar a responsividade à IL-2 e o fator de transcrição STAT5; controlador da atividade supressora; é expresso após ativação do TCR com ativação da quinase TAK1 e coestimulação com CD28	(Mahmud <i>et al.</i> 2014)

1.3.3 Subpopulações de Células T Reguladoras

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

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

de células tTreg em camundongos recém-nascidos causada por uma diminuição da seleção negativa na ausência do receptor de TGF- β nos timócitos, e ainda confirmaram que a sinalização de TGF- β é crucial para inibição da apoptose dependente da molécula Bim em timócitos autorreativos (Ouyang *et al.* 2010). É importante salientar que as células tTreg humanas podem ser divididas em subpopulações funcionalmente e fenotipicamente distintas com base em alterações na expressão de Foxp3, do fenótipo de moléculas da superfície celular, no grau de metilação do DNA no gene *FOXP3*, proliferação e o estado fisiológico em que a célula se encontra, dentre outros fatores. Nesse contexto, podemos destacar a sugestão de subdivisão funcional de células Treg baseadas na expressão de Foxp3 e de CD45RA: as células Treg de repouso, definidas como CD45RA⁺Foxp3^{lo} Treg, células Treg ativadas, definidas como CD45RA⁻Foxp3^{hi}, e células não-Treg secretoras de citocinas, definidas como CD45RA⁻Foxp3^{lo} (Miyara *et al.* 2009).

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

A dificuldade de encontrar um marcador específico para diferenciar tTreg de pTreg é bastante importante. Alguns estudos sugerem que o fator de transcrição Helios, pertencente à família Ikaros, estaria presente somente em células tTreg, sendo um potencial marcador para distinguir tTreg e pTreg (Thornton *et al.* 2010; Getnet *et al.* 2011). No entanto, algumas pesquisas contestaram essa hipótese. Foi descrito que Helios poderia ser induzido em células T CD4 com TCR transgênico sob estímulo e presença de IL-2 e TGF- β (Verhagen e Wraith 2010), e durante a ativação e proliferação de células T, mas sua indução regride sob condições de repouso, não somente em Treg humanas e murinas, mas também em células T CD4 e T CD8 (Akimova *et al.* 2011). Estes dados sugerem então que, dependendo do método de ativação e condições específicas, pode-se verificar a expressão de Helios em células pTreg. É importante salientar, entretanto, que esses achados não estão bem explorados em populações de células T CD4 com TCR não-transgênico (Zabransky *et al.* 2012). Foi observado também que Helios

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

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

1.3.4 Geração de Células T Reguladoras no Timo

As células tTreg se diferenciam a partir dos precursores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ nos estágios de SP (Fontenot *et al.* 2005a) e dos precursores CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ (Marshall *et al.* 2014; Schuster *et al.* 2019), ou algumas células podem surgir no estágio DP (Nunes-Cabaço *et al.* 2011). Ao comparar a expressão de Foxp3 em timócitos DP e SP, mostrou-se que os timócitos DP expressavam mais proteína Foxp3 do que os SP (Tuovinen *et al.* 2008). No entanto, isso se tornou controverso através de um estudo que demonstrou que a detecção dessas células eram artefatos tímicos, onde “doublets” de timócitos DP Foxp3⁻ eram indistinguíveis das Foxp3⁺ (Lee e Hsieh 2009).

O desvio clonal (**Figura 4**) é, então, o processo responsável por produzir células Treg intratímicas. É difícil diferenciar a deleção clonal do desvio clonal porque ambas necessitam da interação do TCR com o complexo MHC-peptídeo próprio. Dessa forma, pensou-se que a diferença seria pela interação com diferentes células apresentadoras de antígenos (APCs) tímicas. Porém, apesar de relato inicial mostrar que mTECs seriam suficientes e DCs seriam dispensáveis na diferenciação de células tTreg, outros estudos mostraram que antígenos expressos por células dendríticas estariam envolvidos nesse processo (Aschenbrenner *et al.* 2007; Proietto *et al.* 2008), como o desenvolvimento tímico de células Treg específicas de antígenos da próstata (Leventhal *et al.* 2016). De fato, o reconhecimento de antígenos cognatos

seleciona positivamente as células tTreg ao invés de deletá-las. Foi visto que um modelo de camundongo com TCR transgênico para DO11.10 em um animal RAG^{-/-} não é capaz de gerar células Treg, no entanto, quando se é colocado um timo que expressa ovalbumina (OVA) a célula Treg é gerada nesse animal (Itoh *et al.* 1999; Walker *et al.* 2003).

Além da indução de Treg por mTEC e DCs, células B tímicas também podem auxiliar no processo de desenvolvimento das células tTreg, sendo capazes de promover a diferenciação e a sobrevivência das mesmas (Suvas *et al.* 2002; Xu *et al.* 2008; Walters *et al.* 2014; Lu *et al.* 2015; Mohammed Ali e Drela 2017). Um estudo demonstrou que o desenvolvimento intratímico de células Treg foi diminuído em experimentos com quimeras deficientes de células B, sendo a captura e apresentação de antígeno pelas células B eventos fundamentais para o desenvolvimento de células Treg *in vivo* (Walters *et al.* 2014). Células B tímicas expressam altos níveis de moléculas de MHCII, possuem moléculas co-estimulatórias como CD80/CD86 e estão presentes na região medula tímica, local onde se encontram o maior número de células Treg. Esses estudos nos mostram que os mecanismos de desvio e deleção ocorrem em uma complexa interação entre essas células. Contudo, um postulado mais consistente diz que a distinção seria exercida pela duração e força da interação com TCR e consequentes níveis de sinalização intracelular, sugerindo que a avidéz e a afinidade são ambas importantes (Xing e Hogquist 2012). Como exemplo da importância da avidéz, demonstrou-se que camundongos transgênicos que tinham a expressão de níveis mais baixos de MHC classe II em mTECs apresentavam menor eficácia na deleção clonal em paralelo à maior frequência de células Treg no timo (Hinterberger *et al.* 2010).

Dentre as DCs presentes no timo, as DCs CD8 α ⁺ foram descritas como células não importantes para a diferenciação de células Treg, pois ao serem depletadas não foram observadas alterações no número de células tTreg (Herbin *et al.* 2016). No entanto, um estudo demonstrou a cooperação entre mTECs e DCs CD8 α ⁺, elucidando seu envolvimento na facilitação da geração de células tTreg para autoantígenos dependentes de AIRE. O estudo ainda mostrou que o CD36, um receptor sequestrador de classe B expresso preferencialmente em células DCs CD8 α ⁺, é importante para a transferência de antígeno da superfície celular para o citoplasma e consequentemente apresentação via MHCII (Perry *et al.* 2018).

Além dos sinais de TCR, os sinais co-estimulatórios via CD28 têm um papel essencial na indução da diferenciação de células Treg, pois a ausência de CD28, vista em camundongos deficientes, levaram a uma diminuição de células Treg no timo e nos tecidos periféricos (Salomon *et al.* 2000; Tai *et al.* 2005). O CD28 parece fornecer um sinal intrínseco para o desenvolvimento das Treg (Burchill *et al.* 2008; Liu *et al.* 2008) analogamente ao que acontece

num linfócito T maduro. Recentemente, demonstrou-se também que, além de ser importante para a fase inicial de desenvolvimento da Treg no timo, as Tregs na periferia dependem do CD28 para os mecanismos de homeostasia (Franckaert *et al.* 2014) (**Figura 4**). Salienta-se ainda que, além da interação com as moléculas CD80/CD86, a intensidade da interação com moléculas acessórias como ICAM-1 e CD40 contribuem para a geração, e a ausência delas resulta em diminuição do número de células Treg (Buhlmann *et al.* 2003; Sakaguchi 2005).

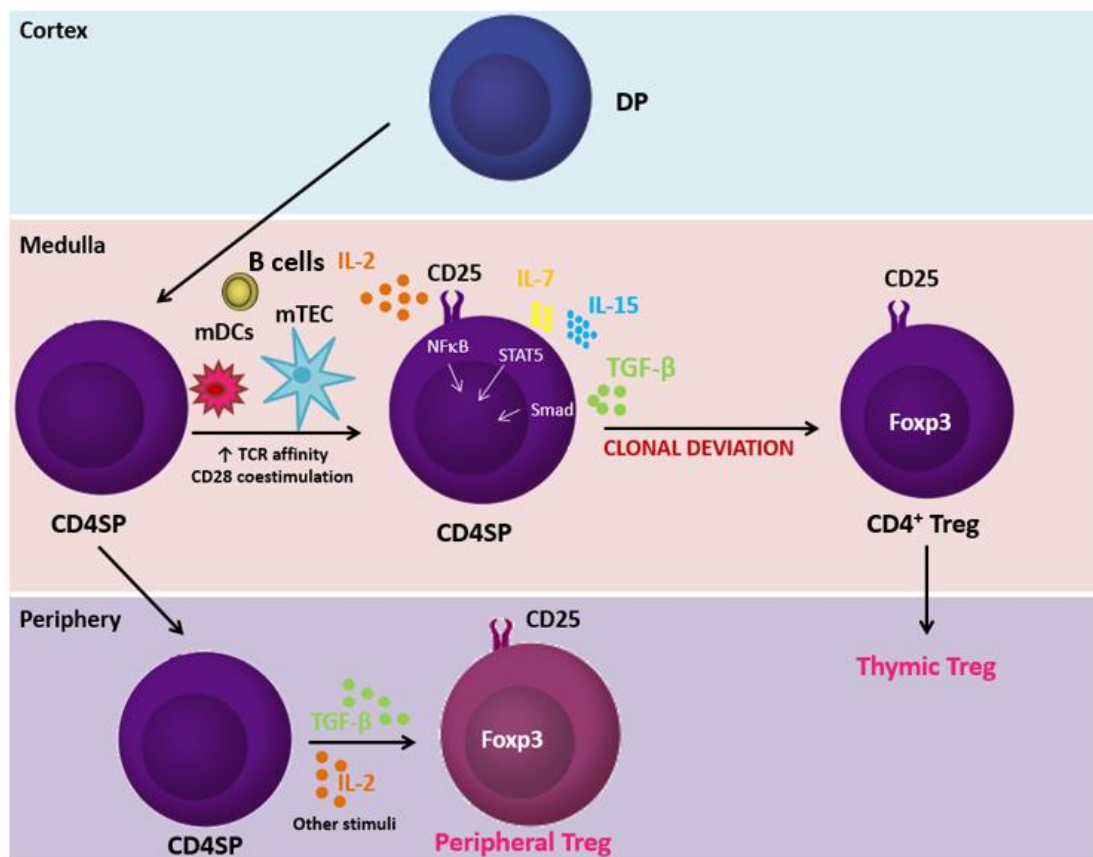


Figura 4 - **Sinalização nos processos de diferenciação de células Treg.** As células CD4 SP entram em contato com células dendríticas medulares (mDCs), células B tímicas e células epiteliais medulares (mTECs) que expressam MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2 e passam a expressar a cadeia alfa do receptor de IL-2, ao se ligar com alta afinidade no TCR; juntamente com a coestimulação do CD28, IL-2, IL-7, IL-15 e TGF-β, ativam fatores de transcrição distintos, como NFκB, STAT5 e Smads, que vão levar essas células a sofrerem um desvio clonal para células Treg, escapando da apoptose. As células T CD4+ que chegam à periferia e entram em contato com TGF-β e IL-2, além de outros estímulos relacionados ao tecido em que se encontra ou estímulos da inflamação, também podem se diferenciar em células Treg. **Fonte:** modificado de Vasconcelos-Fontes *et al.* 2019.

Como definido anteriormente (seção 1.3.3), fatores solúveis como o TGF-β e a IL-2 também estão implicados centralmente no desenvolvimento das células Treg. Particularmente, a sinalização pela cadeia β (CD122) e cadeia γ (CD132) do receptor de IL-2, compartilhado pelo receptor de IL-15, parece ser essencial para a diferenciação das tTreg, visto que

camundongos duplamente deficientes em IL-2 e IL-15, ou em CD122 e IL-15, apresentam depleção quase completa de células tTreg. Em níveis moleculares, a sinalização por CD122 é necessária para a translocação de STAT5 para o núcleo, o que leva à indução da expressão de Foxp3. As moléculas STAT são uma família de sete moléculas que participam da transdução de sinais após estimulação celular por citocinas, fatores de crescimento e hormônios. Nas células Treg, as proteínas STAT5 são essenciais para as vias de sinalização IL-2/IL-2R e IL-15 (Waldmann *et al.* 1998; Burchill *et al.* 2007; Soper *et al.* 2007). Estudos mostram que camundongos duplo-nocautes para STAT-5a e STAT-5b têm autoimunidade similar aos camundongos nocautes para IL-2 ou IL-2R, o que demonstra a importante contribuição das moléculas STAT5 no desenvolvimento das células Treg (Snow *et al.* 2003). Um estudo recente sugere que as APCs podem oferecer tanto IL-2 quanto o ligante de TCR, constituindo o nicho do timo onde são geradas as Tregs, assim como, a concorrência entre as células Treg existentes, as T efectoras e a oferta limitada de IL-2 fornece um feedback negativo para a nova geração de células Treg (Weist *et al.* 2015). Além disso, foi observado que a hiperplasia linfoide observada em camundongos com deficiência de IL-2R e IL-2 acontece pela ausência de células Treg, e que a reconstituição de animais quiméricos com células produtoras de IL-2 restaura o compartimento linfoide impedindo o estabelecimento de autoimunidade (Almeida *et al.* 2002; Amado *et al.* 2013).

É importante ressaltar que estudos recentes demonstraram que algumas alterações epigenéticas presentes no curso do desenvolvimento das células Treg no timo são independentes de Foxp3. Tais estudos propõem um modelo onde o pré estabelecimento de toda cromatina antes da indução Foxp3 e a expressão de co-fatores que interagem com Foxp3 são críticos componentes para a regulação de genes dependentes de Foxp3 (Ohkura *et al.* 2013; Kitagawa *et al.* 2015; Beyer e Huehn 2017). Ainda nesse contexto, um estudo identificou super-intensificadores (SEs) específicos para Tregs, as Treg-SEs, associadas aos genes de assinatura da Treg que são gradualmente estabelecidas e ativadas nos estágios iniciais do desenvolvimento das células tTreg. E, a exclusão específica no estágio de desenvolvimento do organizador do genoma Satb1 prejudica a ativação do Treg-SE e interrompendo a indução dos genes de assinatura das células Treg (Kitagawa *et al.* 2017). Muitas outras alterações epigenéticas foram revisadas por Iizuka-Koga *et al.* (Iizuka-Koga *et al.* 2017).

Além disso, um estudo demonstrou que o complexo linear de montagem da cadeia de ubiquitina (LUBAC), composto de pelo menos três proteínas: RNF31/HOIP, RBCK1/HOIL-1

e SHARPIN/SIPL1, desempenham papéis fundamentais na diferenciação tardia de timócitos e na homeostase de células Treg (Redecke *et al.* 2016; Teh *et al.* 2016).

1.3.5 Moléculas Envolvidas na Migração de T Reguladoras

A capacidade migratória das células Treg é controlada por sinais distintos de quimiocinas e moléculas de adesão, e essa migração é dependente da ação efetora que essas moléculas terão no sítio alvo (Zou *et al.* 2004). Os mecanismos envolvidos no tráfego de células Tregs ainda não estão completamente elucidados. No entanto, algumas moléculas são essenciais para que essas células cheguem aos órgãos periféricos.

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

O receptor de quimiocina CCR7, também associado de forma importante ao tráfego de linfócitos, está implicado na migração de células Treg, visto que a perda de CCR7 bloqueia a migração dessas células para os linfonodos (Schneider *et al.* 2007). Nesse sentido, um estudo demonstrou que células Treg da tonsila são capazes de migrar frente à quimiocina CCL19, sugerindo que a sinalização via CCR7 poderia facilitar a entrada dessas células para as zonas de células T dos órgãos linfoides periféricos. Além disso, observou-se que algumas células Treg trocam a expressão de CCR7 por CXCR5, facilitando sua migração para os folículos dos órgãos linfoides em resposta à quimiocina CXCL13 produzida nessa região de células B (Lim *et al.* 2004) e compartilhando as mesmas sinalizações por quimiocinas que os linfócitos T naive e efetores.

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

Apesar de a molécula CD44 ter uma grande distribuição tecidual, ela parece estar envolvida no “*homing*” de linfócitos durante os estágios iniciais de diferenciação (Khalidoyanidi *et al.* 1996). Nesse contexto, as células Treg CD44^{hi} são classificadas como células ativadas e proliferam após sua ligação ao ácido hialurônico na ECM (Bollyky *et al.* 2009a).

A sinalização por S1P (esfingosina-1-fosfato), um lipídio bioativo, via seu receptor (S1P1) regula a saída de linfócitos T do timo e de órgãos linfoides periféricos (Drennan *et al.* 2009). Foi demonstrado que a sinalização via S1P1 afeta também as Tregs, suprimindo o desenvolvimento intratímico, a manutenção periférica, a atividade supressora dessas células (Liu *et al.* 2009) e regulando a localização do fator de transcrição Foxp3 (Ishimaru *et al.* 2012).

Já na periferia, a localização das células T nos locais inflamatórios é essencial para sua função homeostática. Um estudo demonstrou que a migração de células Treg requer a ativação da glicólise pela enzima glucocinase (GCK) induzida por uma via PI3K-mTORC2 seletiva de células Treg e que a perda de função do regulador de GCK causa um aumento na motilidade de células Treg humanas (Kishore *et al.* 2017).

1.3.6 Mecanismos de Ação de Células T Reguladoras

Uma característica central das células Treg se refere à sua capacidade supressora pluripotente, modulando diferentes reações imunes. Elas são capazes de inibir mecanismos efetores de células T CD4 (Thornton e Shevach 1998; Oldenhove *et al.* 2003), suprimir a ativação e produção de anticorpo pelas células B (Bystry *et al.* 2001), prevenir a atividade citotóxica de células T CD8 (Suvas *et al.* 2003; Dittmer *et al.* 2004), limitar a atividade de células do sistema imunitário inato (Maloy *et al.* 2003) e regular a ativação mediada pelas moléculas CD80/CD86 das APCs (Cederbom *et al.* 2000). Todos esses mecanismos levam a supressão das respostas imunitárias e quando desequilibradas propiciam a cronificação de infecções, perda da resposta anti-tumoral ou, ao contrário, a geração de respostas autoimunes e alérgicas indesejadas (revisado por Mailloux e Young 2010). Essas funções regulatórias distintas permitem que essas células exerçam papel central na inibição de processos imunopatológicos importantes, como aqueles vistos na rejeição de transplante (revisado por Burrell *et al.* 2012), e nos processos inflamatórios associados à retocolite ulcerativa e esclerose múltipla (revisado por Ding *et al.* 2012), além de facilitar a progressão tumoral (revisado por Mailloux e Young 2010). Nesse contexto, a necessidade de entender o mecanismo de ação dessas células levou ao desenvolvimento de um modelo *in vitro* de estudo para análise da função das células Treg (Takahashi *et al.* 1998; Thornton and Shevach 1998), que mimetiza a função dessas células *in vivo*. Nesse modelo *in vitro*, que analisa a capacidade inibitória de células Treg sobre atividade proliferativa e funcional de células T efetoras, foram identificadas diversas moléculas e processos que contribuíssem para as atividades supressoras de

células Treg, embora ainda não esteja bem elucidado se estes mecanismos são realmente semelhantes ao que ocorre *in vivo* (Shevach 2009).

A molécula Foxp3 é apontada como a principal responsável por orquestrar os programas moleculares envolvidos na função de células Treg. Embora não esteja bem estabelecido como esse controle ocorre, sabe-se que Foxp3 interage com NFAT e após a ligação ao DNA ocorre a regulação da transcrição de diversos genes (Wu 2006). Além disso, os genes alvo do Foxp3 regulam positivamente os genes essenciais para a função supressora ou a repressão transcricional de citocinas presentes nas respostas inflamatórias (Yagi *et al.*, 2004), além dos genes que regulam positivamente as células Treg, como *Il2ra* (CD25) (Sakaguchi *et al.* 1995), *Tnfrsf18* (GITR) (McHugh *et al.* 2002), *Nrp1* (Bruder *et al.* 2004) e *Ccr4* (Iellem *et al.* 2001). Estudos que bloqueiam o Foxp3, em determinados casos em que a célula Treg não é benéfica, demonstram que o bloqueio leva a uma supressão do mecanismo efetor dessas células (Park *et al.* 2014).

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

Um mecanismo supressor central demonstrado é a inibição da diferenciação de células efectoras através das APCs. As células Treg expressam CTLA-4, uma molécula que participa do bloqueio funcional dos sinais de co-estimulação de células T efectoras através da sua competição com CD28 pela ligação, em maior afinidade, ao CD80 e CD86, expressos nas células dendríticas. Alguns estudos sugerem que a inibição da expressão de CD80 e CD86 por células Treg limita a capacidade das DCs de estimular células T naive através de CD28, resultando em imunossupressão (Cederbom *et al.* 2000; Onishi *et al.* 2008). Além dessa molécula, a supressão da função das DCs é feito pela LAG-3 (CD223) que vai se ligar às moléculas de MHC de classe II com alta afinidade, inibindo então o sinal mediado por ITAMs (do inglês, “immunoreceptor tyrosine-based activation motif”) (Liang *et al.* 2008). No mesmo sentido, a *Nrp1* (**Tabela 1**), que promove longas interações entre células Treg e DCs imaturas, impossibilita a ligação de células T naive às DCs, o que resulta em vantagem para as células Treg sobre células T naive

(Sarris *et al.* 2008). Ainda nesse contexto, CD39 é uma ectoATPase que hidrolisa ATP ou ADP em AMP e adenosina pericelular. As células T efectoras expressam em sua superfície o receptor de adenosina A2A, dessa forma, ao entrar em contato com a adenosina produzida pelas células Treg, ocorre uma modulação imunossupressora das células T efectoras (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007).

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

1.4 As alterações na proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich

Nesse tópico vamos discutir duas doenças derivadas de mutações no gene que codifica a proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp). As mutações podem ser de perda-de-função ou de ganho-de-função e falaremos mais adiante da proteína em nível molecular. De fato, uma das doenças cursa com eventos de autoimunidade e, de forma interessante, um dos distúrbios imunológicos apresentados é a diminuição na função imunossupressora de células Treg.

1.4.1 A Síndrome de Wiskott-Aldrich

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

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

tratados adequadamente podem morrer na primeira década de vida (Rosen *et al.* 1995). A administração correta dos tratamentos para pacientes com WAS é um grande desafio. Vários tratamentos estão disponíveis, mas o único tratamento que resultou em 73-100% de cura entre os pacientes compatíveis foi o transplante de medula óssea (Mullen *et al.* 1993; Moratto *et al.* 2011).

É importante ressaltar que a gravidade da doença varia pelos diferentes defeitos que as mutações podem causar na expressão da proteína WASp (Jin *et al.* 2004) e, particularmente, a perda parcial ou total da expressão de WASp está correlacionada com o fenótipo mais severo da doença (Imai *et al.* 2004). É interessante observar que mutações pontuais que prejudicam, mas não suprimem, a expressão de WASp podem causar trombocitopenia ligada ao X (XLT; do inglês, “X-linked thrombocytopenia”), uma doença que pode ser crônica (Villa *et al.* 1995) ou intermitente (Notarangelo *et al.* 2002), e é considerada uma forma atenuada de WAS, caracterizada por número baixo de plaquetas e em alguns casos imunodeficiência.

A WAS apresenta um curso evolutivo e progressivo da doença. A doença começa com trombocitopenia e imunodeficiência, e pode evoluir para autoimunidade, com vasculite e doença inflamatória intestinal. E também, podendo evoluir para linfoma. Para nosso trabalho, a autoimunidade é o aspecto fundamental para nossas perguntas principais.

1.4.2 A Neutropenia ligada ao X

Por outro lado, algumas mutações no domínio GBD (do inglês, “GTPase-binding domain”) podem levar à formas constitutivamente ativas da molécula, mudando completamente o espectro de imunodeficiência, como ocorre na neutropenia ligada ao X (XLN, do inglês, “X-linked neutropenia”) (Devriendt *et al.* 2001; Cotta-de-Almeida *et al.* 2007).

A XLN faz parte de um conjunto de doenças conhecido como neutropenia congênita severa que leva a infecções bacterianas recorrentes, escassez de neutrófilos maduros, interrupção da maturação no estágio de promielócitos/mielócitos na medula óssea e aumento do risco de desenvolver leucemia (Dale e Link, D 2009). As mutações (em humanos, L270P-WASp, S272P-WASp e I296T-WASp) que levam à XLN são do tipo ganho-de-função, o que aumentam de forma importante a complexidade genética da doença. Elas impedem a conformação auto-inibida da proteína mantendo-a em estado de ativação constante e com maior atividade de polimerização de actina (Devriendt *et al.* 2001; Ancliff *et al.* 2006). Assim como as mutações de perda-de-função em WASp alteram funcionalmente as células hematopoiéticas, a ativação constante de WASp também provoca profundas alterações na atividade de linfócitos (Westerberg *et al.* 2010).

Para entender melhor como a WASp se comporta em nível molecular descrevemos os principais mecanismos no tópico abaixo.

1.4.3 WASp em nível molecular

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

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

A WASp responde a sinais que ativam a molécula Cdc42 (do inglês, “cell division cycle 42”), uma GTPase da família Rho de pequenas GTPases para o início da polimerização do citoesqueleto de actina. Ela apresenta domínios multifuncionais como o EVH1 (do inglês, “N-terminal Ena/VASP homology 1), também chamado de WH1 (domínio 1 homólogo a WASp), o BR (do inglês, “basic region”), uma pequena região básica, o GBD, um domínio de ligação interativa com Cdc42, o PPP (do inglês, “polyproline-rich region”), uma região rica em prolina que caracteriza sítios de ligação a moléculas contendo domínio SH3, e ainda apresenta o VCA, um domínio C-terminal denominado a partir das sub-regiões V (do inglês, “verprolin homology”; também chamado “WASp homology 2/WH2”), C (do inglês, “cofilin homology domain” ou “central hydrofobic region”) e A (do inglês, “acidic region”) (revisado em Thrasher e Burns 2010; Cotta-de-Almeida *et al.* 2015) (**Figura 5**)

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

enquanto os domínios C e A se ligam ao complexo Arp2/3 (do inglês “actin related protein 2/Arp3”) para o início da nucleação e do consequente alongamento dos filamentos de actina (**Figura 5**). Por fim, a WASp fosforilada é então ubiquitinada e degradada no proteassoma (revisado em Reicher *et al.* 2012; Cotta-de-Almeida *et al.* 2015).

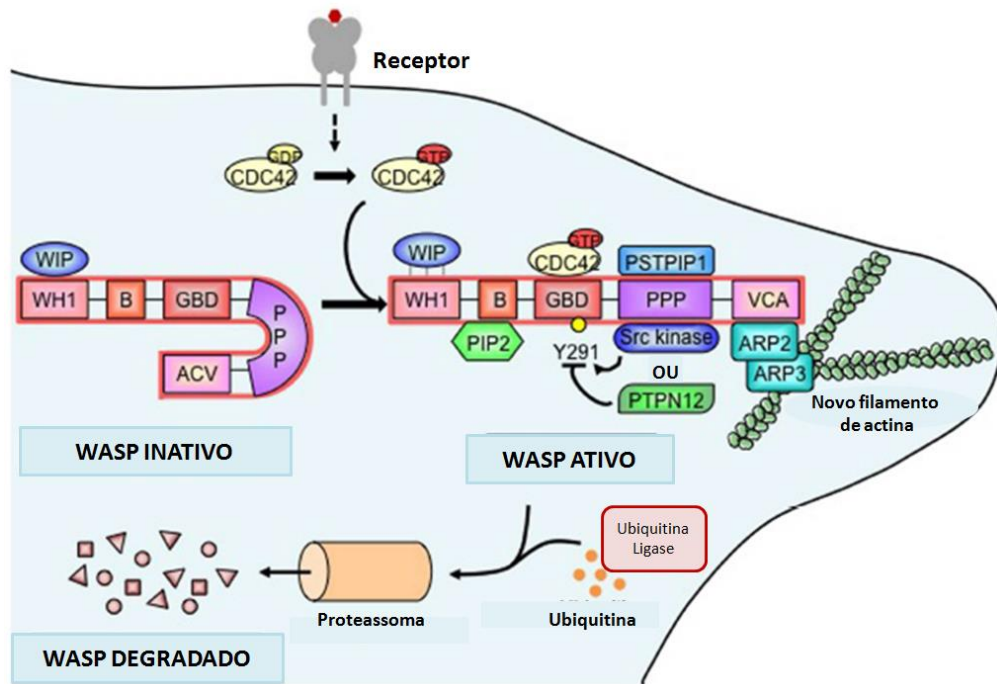


Figura 5 - **Estrutura e domínios de WASp.** Em seu estado inativo, WASp tem uma conformação autoinibida através de uma interação intramolecular entre o domínio de homologia VCA e do domínio GBD. A associação de WIP (WASp Interacting Protein) com o domínio WH1 estabiliza a configuração inibida, embora não seja claro se WIP permanece ligado após a ativação de WASp. A pequena GTPase Cdc42 é a principal molécula ativadora de WASp, ligando-se ao domínio GBD e causando a liberação do domínio VCA. A fosforilação do resíduo de tirosina 291 (Y291) pode tanto ativar WASp sozinho ou estabilizar uma conformação ativa iniciada por outros fatores. Na conformação ativa de WASp, o complexo Arp2/3 se liga ao domínio VCA e começa a polimerização de actina. A remodelação da actina é dinâmica e depende de um equilíbrio entre a ativação de WASp e sua degradação, sendo este último regulado pela ubiquitinação e mediado pelo proteassoma. **Fonte:** Cotta-de-Almeida *et al.* 2015.

Já foram descritas mais de 446 mutações não relacionadas em WAS (HGMD).

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

1.4.4 A WASp e as Células do Sistema Imunitário

A resposta imunitária é dependente da perfeita função de todas as células do sistema imunitária. E, as células do sistema imunitário inato e adaptativo necessitam da dinâmica do citoesqueleto de actina para seguir com suas funções. Os estudos nessas células e sua correlação com a proteína WASp demonstraram disfunções importantes em células T e B (Sun *et al.* 2019), deficiência na quimiotaxia de neutrófilos, alterações em células dendríticas (Baptista *et al.* 2016), entre outras. Particularmente, as análises de linfócitos T de pacientes com WAS revelaram anormalidades na sinalização pelo TCR associados a defeitos na organização do citoesqueleto de actina (Molina *et al.* 1993). De maneira geral, as diferentes células de origem hematopoiética têm sido afetadas pela ausência da expressão de WASp, indicando que os principais processos fisiológicos presentes na geração da resposta imunitária, com participação dessas células, envolvam o rearranjo do citoesqueleto de actina (Imai *et al.* 2003).

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

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

Eventos de imunodesregulação e autoimunidade podem estar associados diretamente a um efeito da ausência de WASp em células Treg. Essas células estão implicadas em distúrbios de regulação da resposta imunitária em pacientes e camundongos deficientes em WASp (Humblet-baron *et al.* 2007a; Maillard *et al.* 2007; Marangoni *et al.* 2007). Dessa forma, como

tópico central na discussão deste trabalho, a seção a seguir discorrerá sobre o impacto da deficiência de WASp em células Treg.

A hiperativação de WASp também gera alterações nas células do sistema imunitária. A neutropenia é o achado laboratorial mais clássico (Dale e Link, D 2009). Recentemente foi demonstrado que os neutrófilos teciduais têm hiperatividade devido à fosforilação da tirosina-293, tornando a atividade do WASp menos dependente da regulamentação do PI3K (Keszei *et al.* 2018). Os macrófagos de pacientes com XLN apresentam níveis aumentados de F-actina e podossomos anormais com conseqüente alteração da motilidade e forma (Ancliff *et al.* 2006). Além disso, Ancliff e colaboradores demonstraram defeito na mielopoiese com altos níveis de apoptose na medula óssea e anormalidades citogenéticas adquiridas variáveis (Ancliff *et al.* 2006; Moulding *et al.* 2007). Os linfócitos apresentam a arquitetura das suas microvilosidades alteradas e aumento da F-actina, o que leva a um rolamento prejudicado nas L-selectinas, devido as alterações na adesão celular (Burns *et al.* 2010), assim como alterações nas respostas dependentes do citoesqueleto e estabilidade genômica (Westerberg *et al.* 2010).

1.4.5 A WASp e as Células T Reguladoras

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

As células Treg deficientes em WASp apresentam baixos níveis na expressão de marcadores de ativação, como o CD25, no entanto, sua capacidade supressora pode ser parcialmente recomposta administrando IL-2 exógena *in vitro*. Relacionado a isso, as células T efetoras deficientes em WASp secretam pouco IL-2 aumentando a disfunção intrínseca das células Treg (Humblet-Baron *et al.* 2007b). Somando-se a esses fatos, a ausência de WASp implica em distúrbios de localização tecidual e da capacidade funcional dessas células. As células Treg nocautes para WASp apresentam reduzida capacidade de expansão periférica, diminuição na atividade supressora sobre as células T efetoras, deficiência na secreção de citocinas, como a IL-10, e são incapazes de mediar a tolerância *in vivo* (Adriani *et al.* 2007;

Humblet-Baron *et al.* 2007b; Maillard *et al.* 2007; Marangoni *et al.* 2007). Foi observada deficiência no número e na função imunossupressora de células Treg na periferia dos camundongos WASp nocaute (WASp-KO), achado esse corroborado por resultados similares em pacientes com WAS (Marangoni *et al.* 2007). Ainda, um dado relevante foi a demonstração da diminuição significativa de células Treg no timo de camundongos WASp-KO (Maillard *et al.* 2007).

A doença em camundongos e em humanos gera características muito semelhantes nas células imunitárias, como os defeitos migratórios, a formação prejudicada de podossomos, a sinalização defeituosa pelas células T e B, e a geração de respostas imunitárias ineficientes que levam ao desenvolvimento de autoimunidade (Snapper *et al.* 1998; Westerberg *et al.* 2005). Os camundongos WASp-KO costumam desenvolver doença inflamatória intestinal limitada ao cólon (colite), sugerindo que um defeito numérico ou funcional de células Treg possa estar associado a essa patologia (Snapper *et al.* 1998; Klein *et al.* 2003; Maillard *et al.* 2007).

Além dos efeitos nas células Treg, outras alterações na função imunitária podem contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, como a possibilidade de defeitos na fagocitose de células apoptóticas e a produção de autoanticorpos devido à disfunção das células B. Além disso, as células Treg WASp^{-/-} murinas e de pacientes também apresentaram pouca habilidade em induzir apoptose em células B, por consequência de uma significativa redução na secreção de granzima B (Adriani *et al.* 2011) e, deficiência em eliminar células B autorreativas (Becker-Herman *et al.* 2011; Recher *et al.* 2012).

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

2 JUSTIFICATIVA/HIPÓTESE

Apesar das diversas publicações avaliando como a ausência e ativação constante de WASp modifica a função de células hematopoiéticas na periferia, poucos estudos abordaram as alterações no timo de animais WASp-KO e, principalmente, de animais com mutações do tipo XLN. Nesse contexto, será fundamental traçar um paralelo entre esses animais, com análise dos mesmos parâmetros para comparar os efeitos da inativação de WASp com sua ativação constante no nicho tímico. A diferenciação e seleção dos linfócitos Treg no timo já foram amplamente estudado, no entanto, o papel de algumas moléculas, como a WASp, nesses eventos ainda não foi totalmente avaliada. Nesse sentido, apesar de ter sido demonstrada redução no número de células tTreg em camundongos WASp-KO, ainda não foram elucidado os mecanismos que levam a essa discrepância numérica, assim como não houve avaliação dessas células em animais com mutações do tipo XLN. Sendo assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação de células tTreg em animais WASp-KO e com mutações do tipo XLN poderá auxiliar no entendimento dos processos de autoimunidade observados nos pacientes imunodeficientes. Com esse estudo, esperamos gerar novos conhecimentos sobre os mecanismos intervenientes na maturação intratímica de células tTreg e, assim, contribuir para um melhor entendimento da imunodesregulação associada às mutações em WASp.

Nossa hipótese é de que mutações em WASp podem acarretar alterações tímicas importantes tanto na diferenciação dos linfócitos T, quanto nos componentes do microambiente que suportam essa diferenciação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Avaliar componentes do microambiente tímico e a diferenciação de células tTreg em camundongos mutantes para a proteína WASp, buscando correlacionar as potenciais alterações tímicas com a deficiência de tTreg vista em animais WASp-KO e a imunodesregulação em modelos experimentais com deficiência e expressão constitutiva de WASp.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o impacto das mutações na proteína WASp nas células do timo de camundongos WASp-KO e com mutações do tipo XLN, avaliando as populações de timócitos, células B tímicas e células dendríticas no timo;
- Avaliar o impacto das mutações na proteína WASp em componentes do microambiente tímico, como ECM (através da avaliação da fibronectina) e citocinas (IL-2 e TGF- β).
- Investigar a diferenciação de células tTreg de camundongos controle, WASp-KO e com mutações do tipo XLN.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos realizados no Brasil foram utilizados camundongos geneticamente deficientes em WASp (129S6/SvEvTac-Was^{tm1Sbs}); denominados WASp-KO) e camundongos normais como controles isogênicos da linhagem (129S6/SvEvTac; denominados WT – do inglês “wild-type”). Em cada experimento foram utilizados de 1 a 3 animais controles e WASp-KO, machos e fêmeas, com idade entre 4 a 7 semanas (**Tabela 2**). A utilização desses animais está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e sob aprovação da Comissão Ética de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA) licenciado pelo número L031/2016. Os animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Para os experimentos realizados na Suécia foram utilizados camundongos geneticamente mutantes em WASp, WASp-KO (C57BL/6Tac-WAS) e com mutações do tipo XLN (L272P-WASp e I296T-WASp – fundo C57BL/6), e camundongos normais como controles isogênicos da linhagem (C57BL/6) de ambos os sexos com idade de 3 a 8 semanas. O projeto segue a aprovação do comitê de ética de Estocolmo (tribunal norte de Estocolmo, N77/13) e as diretrizes nacionais e institucionais na Suécia.

Tabela 2: Experimentos e idade dos animais

Experimento	Idade dos animais	Consideração
Caracterização fenotípica linfócitos T e B	4-7 semanas	Não foram encontradas diferenças entre as idades
Caracterização fenotípica de células dendríticas	5 semanas	-
Ensaio de diferenciação	4 semanas	-
Ensaio de proliferação	4 semanas	-
Ensaio de pSTAT5 e pSmad2/3	5 semanas	-
Ensaio de adesão	5 semanas	-
Ensaio de Imunofluorescência em tecido tímico	6 semanas	-

Ensaio Multiplex	4 semanas	-
-------------------------	-----------	---

4.2 Anticorpos, Moléculas E Kits

4.2.1 Anticorpos

Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados

Anticorpo/Molécula	Catálogo	Marca
Anti-CD4 PerCP-Cy5.5	45004282	eBioscience
Anti-CD4 Pe-Cy7	25004182	eBioscience
Anti-CD4 PE	533730	BD Biosciences
Anti-CD4 Pacific Blue	558107	BD Biosciences
Anti-CD4 FITC	100510	Biolegend
Anti-CD4 APC	100516	Biolegend
Anti-CD4 PE-Cy7	25004182	Invitrogen
Anti-CD4 BV510	563106	BD Biosciences
Anti-CD8 APC	RM252502	Caltag
Anti-CD8 APC-eFluor® 780	470081	eBioscience
Anti-CD8 PerCP-Cy5.5	551162	BD Biosciences
Anti-CD3 PE	100308	Biolegend
Anti-CD3 FITC	555274	BD Biosciences
Anti-CD3 APC-Cy7	100222	Biolegend
Anti-CD3 PE-Cy7	100320	Biolegend
Anti-CD3 purificado	550275	BD Biosciences
Anti-CD3 purificado	100314	Biolegend
Anti-CD3 BV605	100237	Biolegend
Anti-CD28 purificado	102115	Biolegend
Anti-CD25 PE	553866	BD Biosciences
Anti-CD25 APC	557192	BD Biosciences
Anti-CD69 FITC	01504D	BD Biosciences
Anti-CD69 PE	553237	BD Biosciences
Anti-CD62L ACP-Cy7	104428	Biolegend
Anti-Foxp3 PE-Cy7	2557382	eBioscience

Anti-Foxp3 purificado	D6O8R	Cell Signaling
Anti-Foxp3 purificado	14577382	eBioscience
Anti-Foxp3 biotinilado	13577383	eBioscience
Anti-CD21/35 PerCP-Cy5.5	123416	Biolegend
Anti-CD23 PE	561773	Biolegend
Anti-IgM Pacific Blue	406518	Biolegend
Anti-Caspase 3 ativa PE	550914	BD Biosciences
Anti-Ki-67 FITC	561165	BD Biosciences
Anti-fibronectina purificado	ab2413	Abcam
Anti-fibronectina purificado	24931	Novotech
Anti-CD19 FITC	553785	BD Biosciences
Anti-CD19 APC-Cy7	557655	BD Biosciences
Anti-CD19 biotinilado	553784	BD Biosciences
Anti-B220 Alexa Fluor 647	RM2621	Invitrogen
Anti-B220 FITC	103206	Biolegend
Anti-B220 PE-Cy7	103222	Biolegend
Anti-B220 PerCP-Cy5.5	103236	Biolegend
Anti-CD11c APC	117310	Biolegend
Anti-CD11c PE	117308	Biolegend
Anti-CD11c APC-Cy7	117324	Biolegend
Anti-CD23 PE-Cy7	101614	Biolegend
Anti-CD11b FITC	553310	BD Biosciences
Anti-CD138 APC	142506	Biolegend
Anti-pSMAD2/3 PE	562586	BD Biosciences
Anti-pStat5 PE	612567	BD Biosciences
Anti-MHCII Alexa Fluor 700	56532182	eBioscience
Anti-CD45RA BV510	740119	BD Biosciences

IgG cabra-anti-coelho AlexaFluor 488	A11008	Molecular Probes
IgG cabra-anti-coelho AlexaFluor 546	A11010	Molecular Probes
IgG cabra-anti-coelho Peroxidase	#70745	Cell Signalling
IgG cabra-anti-rato AlexaFluor 546	A11081	Molecular Probes
IgG cabra-anti-rato AlexaFluor 488	A11006	Molecular Probes
IgG cabra-anti-rato peroxidase	1031-05	Southern Biotechnology
Anti-IgG de rato PE	11025A	BD Biosciences
Anti-IgG de rato FITC	553929	BD Biosciences
Anti-IgG de rato purificado	553927	BD Biosciences
Anti-IgG de coelho purificada	SC2027	Santa Cruz

4.2.2 Moléculas

As moléculas utilizadas nesse estudo foram: **Hoeschst 33342** (BD Bioscience, 561908) **molécula de fibronectina** (Sigma, F2518); **interleucina 2 recombinante (rIL-2) murina** (R&D Systems, P04351); **rIL-2 humana** (cedida pelo Dr. Jhon Andersson); **TGB- β recombinante** (cedida pela Dra. Mariana Wagab e Dra. Lisa Westerberg); **Live/Dead aqua fluorescent** (Invitrogen, L34966), **streptavidina Alexa 555** (Invitrogen, 532355).

4.2.3 Kits

Os Kits utilizados nesse trabalho foram: **CD4+ T cell isolation Kit** (Miltenyi Biotec, 130104454); **Mouse Pan-B cell Isolation Kit** (Stem Cell, #19844); **Foxp3 Staining Kit** (Invitrogen, 00552300), **Phospho Flow staining Kit** (FIX PERM BD, 557870 e PERM III BD, 558050).

4.3 Obtenção De Células

Os animais foram eutanasiados e, em seguida, foi retirado o timo de cada animal. Os órgãos foram macerados em tecido *voil* utilizando placas de petri de 3,5 cm (Jet Biofil®) ou em cell strainer de 40 µM (Corning®) em 1 mL de meio RPMI + 10% de soro bovino fetal (SBF, Sigma-Aldrich). As células foram passadas para um tubo Falcon® de 15mL, e o volume foi completado com mais 4 mL de RPMI + 10% SBF. Os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos a 4°C (Thermo Scientific, SORVALL ST16R e EPPENDORF CENTRIFUGE 5810R) e os sobrenadantes desprezados. As células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI + 10% SBF e mantidas no gelo. Para a análise de células dendríticas tímicas foi necessário realizar um protocolo de digestão do parênquima tímico. Foi feita uma solução com 1 mg/mL (≥ 100 unidades por mg) de colagenase do tipo 3 (Bionordika/Wothington, LS004180) diluída em RPMI sem soro e o timo foi cortado em fragmentos e adicionado à essa solução por 50 min a 37°C. Após esse tempo foi adicionado RPMI + 10% SBF para parar a reação de lise e os fragmentos foram macerados em cell strainer de 70 µm. As células foram lavadas com PBS/EDTA/SBF 5% e resuspensas nesse mesmo meio. A celularidade foi analisada em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro (Nikon Microscope Eclipse E400) ou em contador de células automático Countess (Thermo Fisher). As suspensões de células foram utilizadas para os ensaios que envolveram citometria de fluxo.

4.4 Fenotipagem de timócitos, tTreg, Células B e Células Dendríticas por Citometria de Fluxo

A quantidade de células distribuídas na placa foi de 1×10^6 células por poço (para avaliar timócitos e tTreg) e de 4×10^6 células (para avaliar células B e células dendríticas), e foram utilizadas placas de PVC, 96 poços, de fundo em “U” (Alfa®, São Paulo, Brasil ou Corning®) para a marcação. Foram adicionados 100 µL de RPMI + 10% SBF em cada poço, e as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4°C. Foram colocados, em cada poço, 50 µL de marcador de viabilidade e as células foram mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente, abrigada da luz. Em seguida foram lavadas com 100 µL de PBS. Então, foram adicionados de 10-20 µL de solução contendo anticorpos contra marcadores de superfície para cada grupo celular e as células mantidas por 30 minutos a 4-8°C. Depois da incubação, as células foram lavadas com 100 µL PBS, sendo preparadas para a marcação intracelular se fosse necessário, ou fixadas com paraformaldeído 4% para posterior leitura no citômetro de fluxo. Para a

marcação intracelular foi utilizada 100 μ L solução fixadora e permeabilizante, contendo paraformaldeído e saponina, de acordo com as instruções do fabricante (solução Fix/Perm, eBioscience - Santa Clara, Califórnia), com incubação a 4-8°C por 40 minutos ou *overnight*. As células foram subsequentemente lavadas com 100 μ L solução permeabilizante contendo saponina (solução Perm, eBioscience), seguida de imunomarcação com solução contendo anticorpos diluídos em solução Perm por 30 minutos. Após duas lavagens com 100 μ L da solução Perm, as células foram ressuspensas em PBS, para análise no citômetro. Os citômetros de fluxo utilizados foram FacsCanto e FacsFortessa (BD Bioscience). Para controle e compensação, foram utilizadas células sem marcação e, também, marcações simples de cada fluorocromo. Foram adquiridos 100.000 eventos (para timócitos e células Treg) ou 1 milhão de eventos (para células B tímicas e para células dendríticas) dentro da região correspondente à população pretendida em gráfico bidimensional com os parâmetros de dispersão frontal (FSC; *forward scatter*) e dispersão lateral (SSC; *side scatter*).

As análises dos dados adquiridos foram realizadas no programa FlowJo. Para as análises percentuais das subpopulações do timo, utilizamos uma sequência lógica de regiões após aquisição no citômetro de fluxo. Para análise de timócitos e células tTreg, primeiramente delimitamos uma região de linfócitos totais, e em seguida, delimitamos o grupo de células *singlets*. A partir dessa população delimitamos as células viáveis e em seguida utilizamos CD4 e CD8 para definição de células CD4 SP, DN, DP e CD8 SP (**Figura 6A**). Dentro do grupo CD4 SP foram delimitadas as regiões de células Treg e células precursoras, definindo as células tTreg (fenótipo, CD25⁺Foxp3⁺), precursoras 1 (fenótipo, CD25⁺Foxp3⁻) e precursoras 2 (fenótipo, CD25⁻Foxp3⁺) (**Figura 6B**). E, dentro dos grupos CD4 SP e CD8 SP avaliamos CD69 e CD62L para classificar as células em imaturas (CD69⁺CD62L⁻) e maduras (CD69⁻CD62L⁺) (**Figura 6C**).

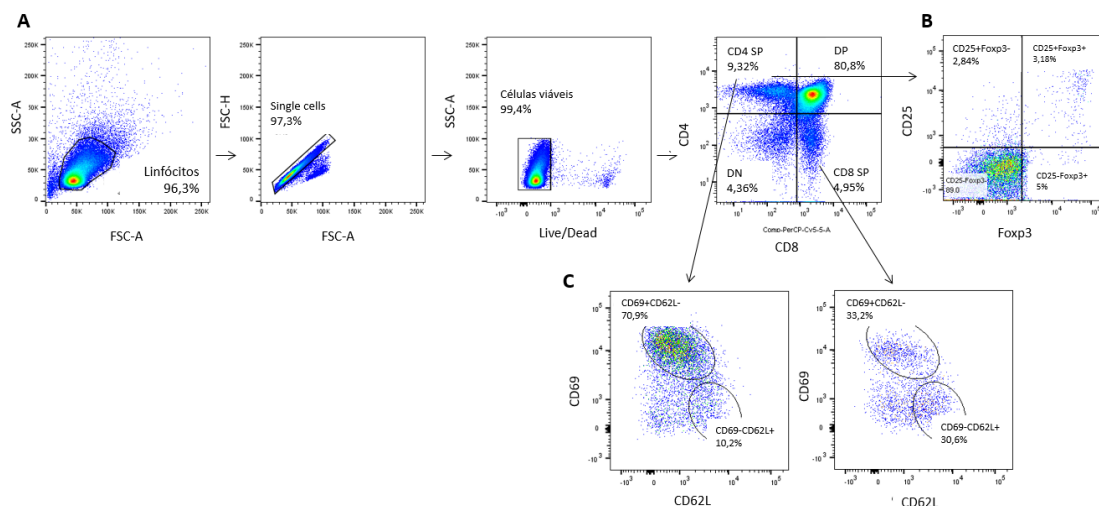


Figura 6 - **Representação do fluxo das análises citofluorométricas I.** A região de linfócitos foi determinada através do FSC-A versus SSC-A, em seguida a população de células *singlets* foram determinadas por FSC-A versus FSC-H. Depois as células viáveis foram determinadas por um marcador de Live/Dead versus SSC-A. As populações T CD4 SP (CD4⁺CD8⁻ simples-positiva), CD8 SP (CD4⁻CD8⁺ simples-positiva), DN (CD4⁻CD8⁻ duplo-negativa) e DP (CD4⁺CD8⁺ duplo-positiva) foram delimitadas em função da expressão dos marcadores CD4 versus CD8 (A). Usando Foxp3 versus CD25 a população T CD4 SP foi dividida em CD25⁺Foxp3⁻, CD25⁺Foxp3⁺, CD25⁻Foxp3⁺ e CD25⁻Foxp3⁻ (B). As análises de maturidade foram acessadas através dos marcadores CD62L versus CD69 nas células T CD4 SP e C8 SP (C).

Para análise de células B tímicas, primeiramente delimitamos uma região de linfócitos totais, e em seguida, delimitamos o grupo de células *singlets*. A partir dessa população delimitamos as células viáveis e em seguida dividimos as células em CD3-B220^{hi} e CD3-B220^{lo} (Figura 7A). Na região de B220^{hi} delimitamos as células CD19⁺ que são as células B, e a partir delas separamos as CD23⁺CD21^{lo}IgM^{hi} e as CD23⁺CD21^{lo}IgM^{lo} (Figura 7B). A partir das B220^{lo} delimitamos as CD19⁺ e em seguida as células precursoras (Figura 7C).

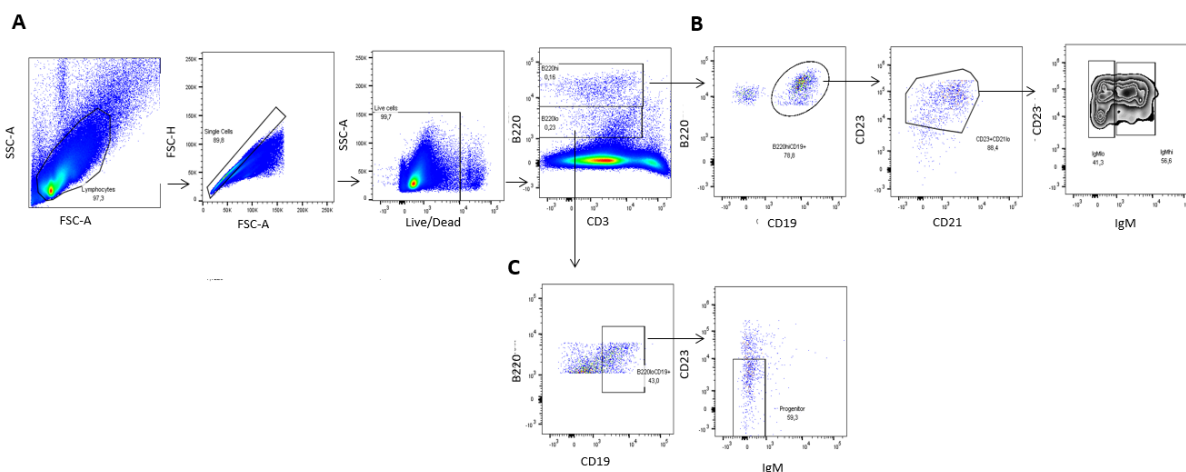


Figura 7 - **Representação do fluxo das análises citofluorométricas II.** A região de linfócitos foi determinada através do FSC-A versus SSC-A, em seguida a população de células *singlets* foram determinadas por FSC-A versus FSC-H. Depois as células viáveis foram determinadas por um marcador de Live/Dead versus SSC-A. As populações CD3⁺B220^{hi} e CD3⁺B220^{lo} foram delimitadas em função da

expressão dos marcadores CD3 *versus* B220 (A). Usando CD19 *versus* B220 delimitamos as células B (CD3⁺B220^{hi}CD19⁺) e em seguida outros marcadores como CD23, CD21 e IgM foram utilizadas para fenotipagem (B). As análises das precursoras foram acessadas através dos marcadores CD19, B220 e IgM (C).

Para análise de células dendríticas tímicas, primeiramente delimitamos uma região de células, e em seguida, delimitamos o grupo de células *singlets*. A partir dessa população delimitamos as células viáveis e em seguida fizemos o *gate* nas células CD3 negativas e dentro dessa população utilizamos CD45RA *versus* CD11c para separar genericamente as células dendríticas convencionais (cDCs) e as plasmocitóides (pDCs) (**Figura 8A**). No *gate* das células pDCs (CD11c⁺CD45RA⁺) fizemos o *gate* nas células Ly6C⁺MHCII^{lo/-} e então utilizamos o B220 para terminar a fenotipagem dessas células (CD11c⁺CD45RA⁺ Ly6C⁺MHCII^{lo/-} B220⁺) (**Figura 8B**). A partir das cDCs delimitamos as células MHCII^{hi} e em seguida separamos em células cDC1 (CD11c^{hi}CD45RA⁻MHCII^{hi}CD8a⁺CD11b⁻) e cDC2 (CD11c^{hi}CD45RA⁻MHCII^{hi}CD8a⁻CD11b⁺) (**Figura 8C**).

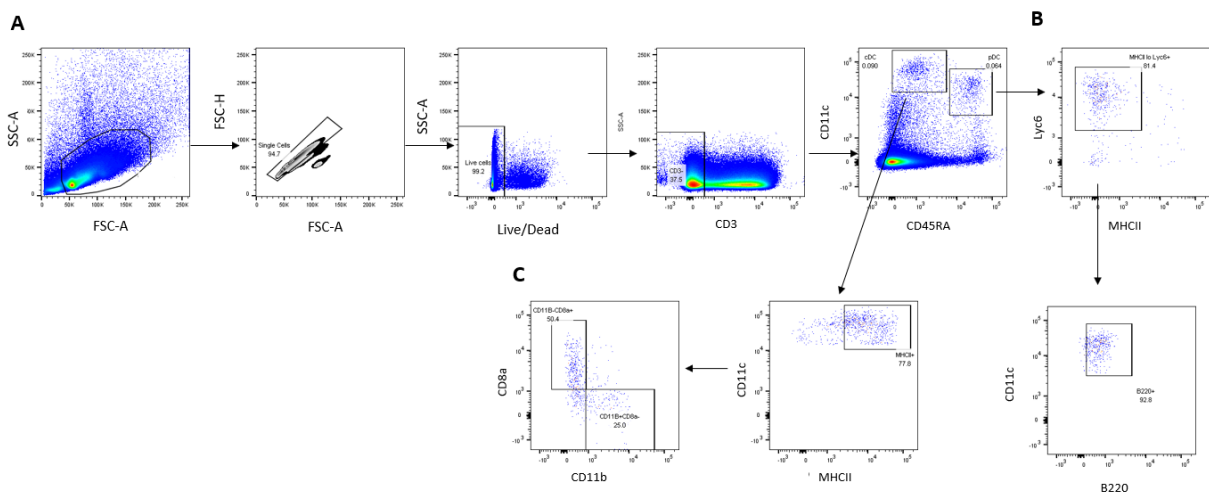


Figura 8 - **Representação do fluxo das análises citofluorométricas III.** A região de células foi determinada através do FSC-A *versus* SSC-A, em seguida a população de células *singlets* foram determinadas por FSC-A *versus* FSC-H. Depois as células viáveis foram determinadas por um marcador de Live/Dead *versus* SSC-A. As população CD3⁻ foi delimitada. Dentro desse *gate*, usamos CD45RA *versus* CD11c e fizemos um *gate* nas células CD11c⁺CD45RA⁺ e nas CD11c^{hi}CD45RA⁻ (A). Dentro da população CD11c⁺CD45RA⁺ definimos a população Ly6C⁺MHCII^{lo} e em seguida as B220⁺ (B). Dentro da população CD11c^{hi}CD45RA⁻ fizemos um *gate* na população MHCII^{hi} e em seguida separamos as células em duas populações distintas que expressam CD8a ou CD11b (C).

4.5 Ensaio de Diferenciação

Os timos foram macerados e ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e contados no contador automático de células

Countess (Thermo Fisher) na presença de Trypan Blue (Sigma Aldrich) para avaliação da viabilidade celular. O número apropriado de células foi utilizado para o isolamento negativo das células T CD4⁺ (MACS - Miltenyi Biotec) e o protocolo foi realizado conforme descrito pelo fabricante. Tivemos uma pureza de 85% e um rendimento de 94%. Os ensaios de diferenciação de células Treg *in vitro* foram realizados em placas de 96 poços com 2 x 10⁵ células T CD4⁺. A placa foi revestida com anticorpo anti-CD3 (5 µg/mL) por 1h e 30 minutos na estufa a 37°C, o excesso foi removido e a placa foi colocada para secar. Depois, as células foram adicionadas diluídas em diferentes combinações de RPMI completo com anti-CD28 (2 µg/mL), IL-2 recombinante (1 µL/mL) e TGF-β recombinante (2 ng/mL) e incubados por 48h e 72h. As células foram coletadas e coradas como protocolo descrito no item 4.4 para análise de FACS. Para testar diferentes concentrações de TGF-β, foram utilizados 0,2 ng/mL, 2 ng/mL e 20 ng/mL) na mistura.

4.6 Ensaio de Proliferação

As células foram isoladas como descrito acima. Depois foram coradas com CFSE (50 nM) por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com RPMI + 10% de SBF pré-aquecido e depois contadas. A placa de 96 poços foi pré-revestida com anti-CD3 e 2 x 10⁵ células foram plaqueadas com os estímulos descritos no tópico 4.6 e incubadas por 24h, 48h e 72h. As células foram coletadas e coradas como protocolo descrito no tópico 4.4 para análise FACS.

4.7 Obtenção de Tecidos

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

4.8 Imunofluorescência Indireta

Criocortes de 5 μm e 50 μm foram realizados e utilizados para a técnica de imunofluorescência através de imunofluorescência indireta. Para bloqueio, os cortes foram incubados com PBS-BSA 1% por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a marcação com mix de anticorpos anti-fibronectina, anti-B220 e anti-Foxp3 diluídos em PBS, durante 60 minutos ou *overnight*, à temperatura ambiente ou a 4°C, respectivamente. Os cortes foram submetidos a 3 lavagens consecutivas de 5 minutos com PBS e, então, incubados com os anticorpos secundários por 45 minutos. Após as lavagens finais, as lâminas foram cobertas com meio de montagem Prolong Gold com DAPI (Life Technologies) e visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss LSM880 (Zeiss, Oberkochen, BW, Germany).

4.9 Marcação de Proteínas Fosforiladas por Citometria de Fluxo

As células foram coradas conforme descrito no protocolo BD Phospho Flow. Resumidamente, as células foram tratadas com estímulos apropriados e incubadas a 37°C por um período de tempo apropriado (1 a 30 minutos). Após o período de estimulação, as células foram imediatamente fixadas adicionando à suspensão celular 10 volumes de Lyse/Fix Buffer pré-aquecido. As células foram incubadas a 37 ° C por 10 a 12 minutos. Depois, a placa foi centrifugada e lavada com Stain Buffer equivalente ao volume de Lyse/Fix Buffer utilizado, centrifugando. As células foram permeabilizadas com Perm/Wash Buffer I durante 30 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugadas. As células foram lavadas e o volume recomendado de anticorpo BD Phosflow foi adicionado por 60 minutos. Após esse período, as células foram lavadas e ressuspensas para análise por citometria de fluxo.

4.10 Ensaio de Adesão

Lâminas de 12 poços foram recobertas com fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD3 (5 $\mu\text{g/mL}$) ou anti-CD3 + fibronectina por 1h em câmara úmida, em seguida, o sobrenadante foi retirado e as placas foram deixadas para secar. Então, as células foram adicionadas (1×10^5 células por poço, sendo essas células provenientes de isolamento prévio contendo apenas células CD4 SP tímicas) diluídas em RPMI sem soro por 20 minutos a 37°C. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa e as células não aderentes foram retiradas através de 3 lavagens consecutivas com PBS a 37°C.

Nesse ponto, as lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente e submetida à imunofluorescência indireta. Após a fixação, os poços foram lavados 2x com PBS/BSA 1% e submetidas a um tampão de permeabilização (PBS/Triton 0,01%) por 5 minutos. Em seguida, o anticorpo anti-Foxp3 biotilado foi diluído em tampão de permeabilização e as células foram marcadas por 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. Após esse período, os poços foram lavados com tampão de permeabilização por 2 vezes, e um mix contendo streptavidina conjugada ao fluorocromo Alexa 546 e faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488 diluídos em tampão de permeabilização foi adicionado aos poços e deixados em temperatura ambiente por 45 minutos. Passado esse tempo, a placa foi lavada 2 vezes com o tampão de permeabilização e em seguida 2 vezes como PBS/BSA 1%. As lâminas foram montadas em meio anti-fade Prolong Gold com DAPI. As lâminas foram analisadas por microscopia confocal (Leica SP8) para análise de interferência de reflexão microscópica (IRM, do inglês Interference Reflectance Microscopy). As análises foram realizadas no ImageJ utilizando a fórmula % Adesão por célula = (Area IRM x 100)/Area faloidina.

4.11 Avaliação Multiplex de Citocinas

Os timos foram processados em tampão de extração de proteínas (RIPA; Thermo Scientific), e, após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado em um ensaio multiplex de acordo com o fabricante (Fireplex®; Abcam) para as citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17 através de citometria de fluxo.

4.12) Análises Estatísticas

As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (unicaudal ou bicaudal) e o método 2-way ANOVA, usando o teste Dunn's multiple comparison test. Os resultados encontrados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de *p* foram inferiores a 0,05 (*), inferiores a 0,005 (**), e 0,001 (***). Software utilizado para análise foi o GraphPad prism versão 8.0. As barras representam a média de cada grupo ± desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Mutações na molécula WASp impactam as populações de timócitos CD4 SP e CD8 SP

O desenvolvimento linfóide no timo de camundongos WASp-KO foi descrito como não apresentando alterações significativas em suas subpopulações (Snapper *et al.* 1998), embora uma diminuição no número de células Treg tenha sido relatada posteriormente (Maillard *et al.* 2007). Por outro lado, as populações de células no timo de camundongos XLN não foram avaliadas anteriormente. Dessa forma, decidimos avaliar em conjunto as subpopulações em diferentes modelos de camundongos geneticamente mutantes em WASp. Medimos os timos e contamos as células de animais WT, deficientes em WASp (WASp-KO) e com ganho de função (I296T-WASp) de idade e sexo correspondentes, e observamos que o timo do camundongo WASp-KO parece apresentar um aumento leve de tamanho, enquanto o timo do animal I296T-WASp é bem menor em termos qualitativos (observação do tamanho macroscopicamente) e quantitativos (contagem dos timócitos totais) (**Figura 9A**). Em seguida, investigamos a subpopulação clássica de células T em desenvolvimento no timo por citometria de fluxo, utilizando marcadores de ativação/maturação como CD4, CD8, CD69 e CD62L (**Figura 9 e Figura 10**). Durante a maturação intratímica, as células CD4 SP e CD8 SP são a maioria das células $\alpha\beta$ que terminam a maturação e emigram do timo para a periferia (revisado em Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007). Corroborando os dados do trabalho de Maillard e colaboradores (Maillard *et al.* 2007), a deficiência em WASp não altera a diferenciação dessas células (**Figura 9B-C**). No entanto, a mutação I296T-WASp altera o número de timócitos CD4 SP (**Figura 9B** - painel inferior) ainda que não tenha mostrado diferenças no número relativo (**Figura 9B**). Os animais L272P-WASp também não apresentaram diferenças significativas (**Figura 9B**). Nenhuma alteração foi encontrada na população de timócitos CD8 SP em nenhum dos grupos analisados (**Figura 9C**).

O CD69 é expresso transitoriamente em células T maduras ativadas e em timócitos submetidos a seleção positiva ou negativa no timo, e sua expressão impede a migração para fora do timo, sendo sua regulação negativa necessária para a saída. No entanto, não apenas o CD69 define se a célula é capaz de migrar (Feng *et al.* 2002; Nakayama *et al.* 2002). Nesse sentido, o CD62L entra como outro marcador para células maduras no timo (Allende *et al.* 2004). Assim, os timócitos SP que expressam altos níveis de CD62L na membrana celular estão, portanto, maduros e prontos para deixar o timo em direção à periferia e entrarem nos

linfonodos através dos vasos de endotélio alto. Além disso, os timócitos maduros expressam maior quantidade de SIP1 e deixam o órgão se houver um gradiente de SIP, que é mais concentrado no sangue do que nos órgãos linfoides (Allende *et al.* 2004).

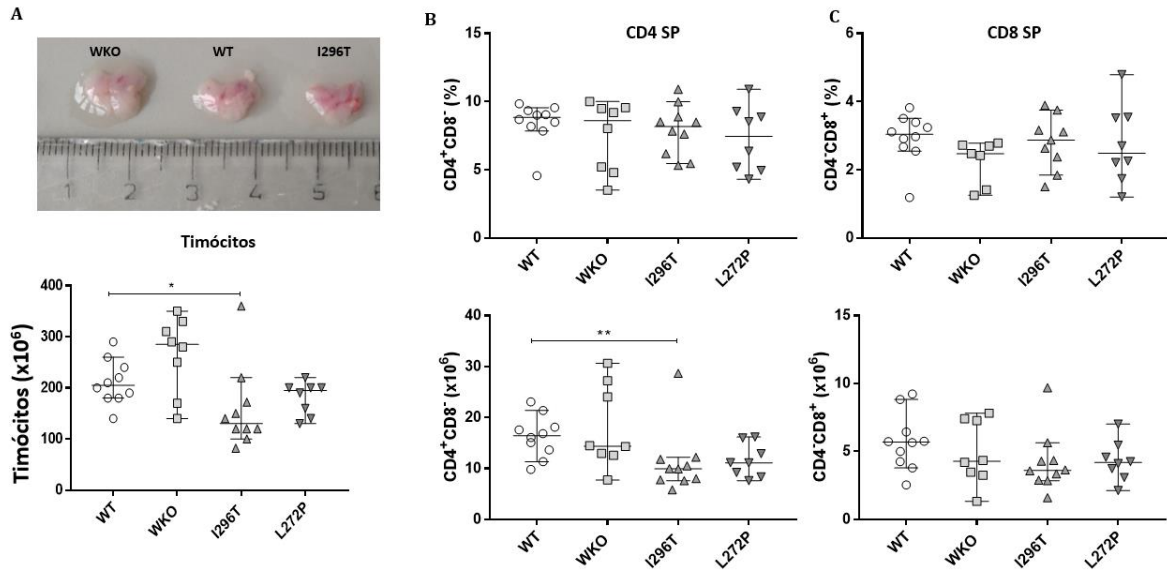


Figura 9 - **O timo do camundongo I296T-WASp tem menor tamanho, número de timócitos e de células T CD4 SP.** Representação fotográfica do timo e o número total de timócitos em camundongos WT, WASp-KO e I296T-WASp (A). Números relativos (painel superior) e totais (painel inferior) de células CD4 SP (B) e CD8 SP (C) de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp. Os dados representam um conjunto de 3 experimentos com total de 10 animais no grupo WT, 8 animais no grupo WASp-KO, 10 animais no grupo I296T-WASp e 8 animais no grupo L272P-WASp. Dunn's multiple comparison test *p<0,05, **p<0,005.

Portanto, procuramos avaliar o estágio de maturação dos timócitos SP de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp baseado na expressão das moléculas CD62L e CD69 (**Fig. 10A-H**). Os resultados mostram uma diminuição significativa dos números relativos de células CD4⁺CD69⁺CD62L⁻ no camundongo WASp-KO, enquanto há uma diminuição nos números absolutos dessa população no timo de camundongo I296T-WASp (**Figura 10A**). Avaliando o MFI, foi observada menor expressão membranar de CD69 no camundongo L272P-WASp (**Figura 10E**). Em relação às células CD4⁺CD69⁻CD62L⁺, observamos aumento nos números relativos, absolutos e na expressão membranar de CD62L nos camundongos WASp-KO (**Figura 10B e 10F**). Avaliando os timócitos CD8 SP, observando a população CD69⁺, os resultados foram semelhantes ao observados nos timócitos CD4 SP (**Figura 10C e 10G**), enquanto, avaliando as células CD62L⁺, observamos aumento significativo nos números relativos, absolutos e MFI em todos os grupos (**Figura 10D e 10H**).

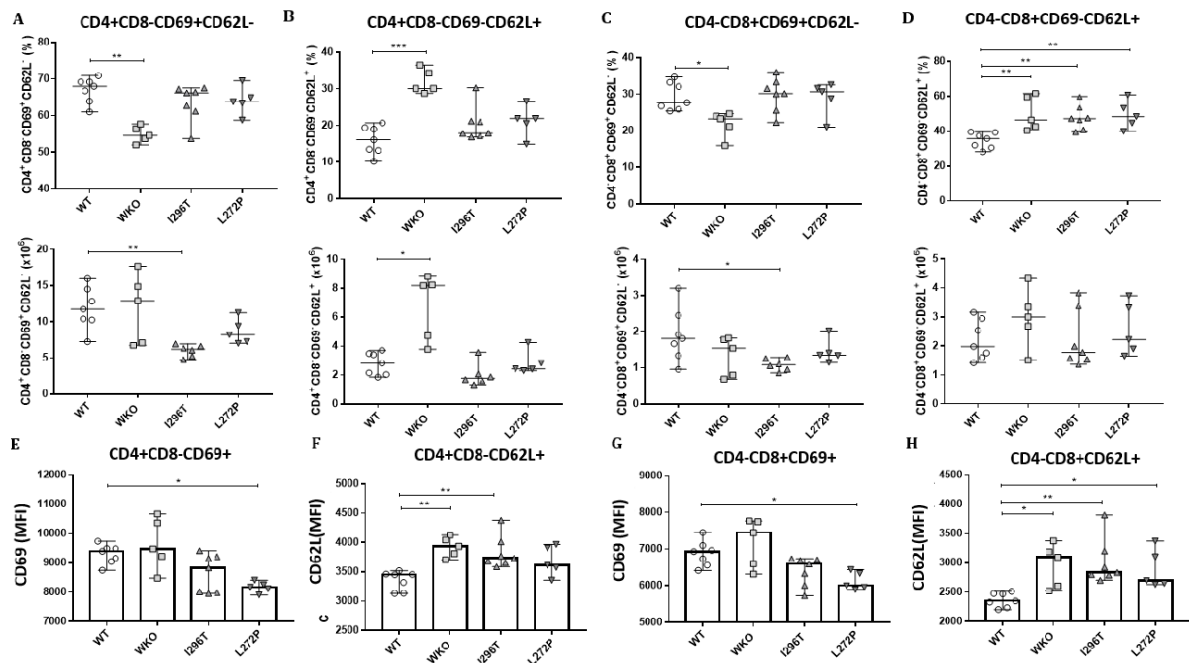


Figura 10 – Camundongo WASp-KO apresenta mais timócitos CD4 SP e CD8 SP no estágio maduro. Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de timócitos CD4⁺CD8⁻CD69⁺CD62L⁻ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (A). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de timócitos CD4⁺CD8⁺CD69⁻CD62L⁺ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (B). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de timócitos CD4⁺CD8⁻CD69⁺CD62L⁻ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (C). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de timócitos CD4⁺CD8⁺CD69⁻CD62L⁺ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (D). Intensidade média de fluorescência (MFI) de CD69 em timócitos CD4 SP (E) e CD8 SP (G). Intensidade média de fluorescência (MFI) de CD62L em timócitos CD4 SP (F) e CD8 SP (H). Os dados representam 2 experimentos com total de 7 animais WT e 5 animais WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp. Dunn's multiple comparison test *p<0,05, **p<0,005.

5.2 Deficiência em WASp impacta a população de células T Reguladoras de origem tímica

Anteriormente, mostramos que a inativação de WASp em camundongos resulta em menor número de células Treg no timo (Maillard *et al.* 2007). No entanto, esse grupo de células não foi avaliado em camundongos XLN. Para determinar se o ganho de função em WASp impactaria na geração dessas células, avaliamos células tTreg e seus precursores em camundongos WT, WASp-KO e XLN por citometria de fluxo (Fig 11A-C). Utilizamos a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 para definir as populações de células tTreg e precursoras. Analisando as células tTreg, fenotipicamente definidas como CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺, observamos que elas diminuíram em número relativo e absoluto apenas em camundongos WASp-KO. Os camundongos I296T-WASp também apresentaram uma

diminuição no número absoluto dessas células (**Figura 11A**). Essa diminuição está em acordo ao menor número de células CD4 SP no grupo I296T-WASp (**Figura 9B**). Dois estágios de células precursoras de tTreg são descritos durante a diferenciação tímica. O clássico ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$) (revisado em Schmetterer *et al.* 2012), que é um grupo enriquecido com precursor, mas também contém células T CD4 SP ativadas, e um novo grupo de precursores ($CD4^+CD25^-Foxp3^+$), que foi descrito levando à diferenciação de células Treg com funções distintas (Marshall *et al.* 2014; Schuster *et al.* 2019). As análises dos animais dos grupos experimentais não mostraram diferença no número desses precursores no camundongo WASp-KO (**Figura 11B-C**), sugerindo que o problema de diferenciação ocorre em etapa mais tardia. Em camundongos com mutações do tipo XLN também não observamos alterações (**Figura 11B-C**).

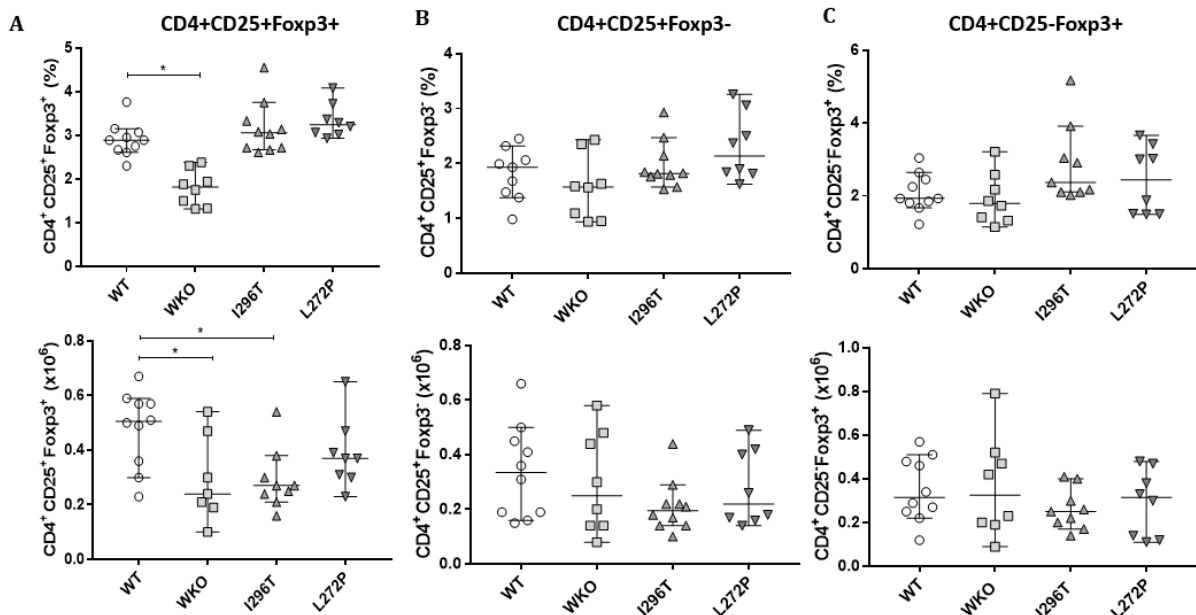


Figura 11 - **Diminuição de células tTreg em animais WASp-KO e I296T-WASp.** Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células T $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (A). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células T $CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^-$ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (B). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células T $CD4^+CD8^-CD25^-Foxp3^+$ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (C). Os dados representam 3 experimentos com total de 10 animais WT e I296T-WASp; e 7 animais WASp-KO e L272P-WASp. Dunn's multiple comparison test * $p < 0,05$.

5.3 Deficiência em WASp impacta a população de células B tímicas, mas não a de células dendríticas tímicas

A diferenciação intratímica das células Treg requer múltiplos sinais e citocinas. As células em desenvolvimento reconhecem com alta afinidade seus peptídeos próprios ao

interagir com o complexo peptídeo-MHC apresentado por diferentes tipos de células apresentadoras de antígeno (APCs), como células epiteliais tímicas medulares (mTECS) e células dendríticas (Aschenbrenner *et al.* 2007; Proietto *et al.* 2008; Josefowicz *et al.* 2012). Analisamos as células dendríticas do timo e não observamos diferença na frequência de células dendríticas convencionais $CD11c^{hi}MHCII^{+}CD45RA^{-}$ entre os grupos experimentais (**Figura 12A**). Apenas as células dendríticas plasmocitóides $CD11c^{+}MHCII^{-/lo}CD45RA^{+}LY6C^{+}B220^{+}$ do grupo L272P-WASp apresentou aumento significativo nos números relativos (**Figura 12B**).

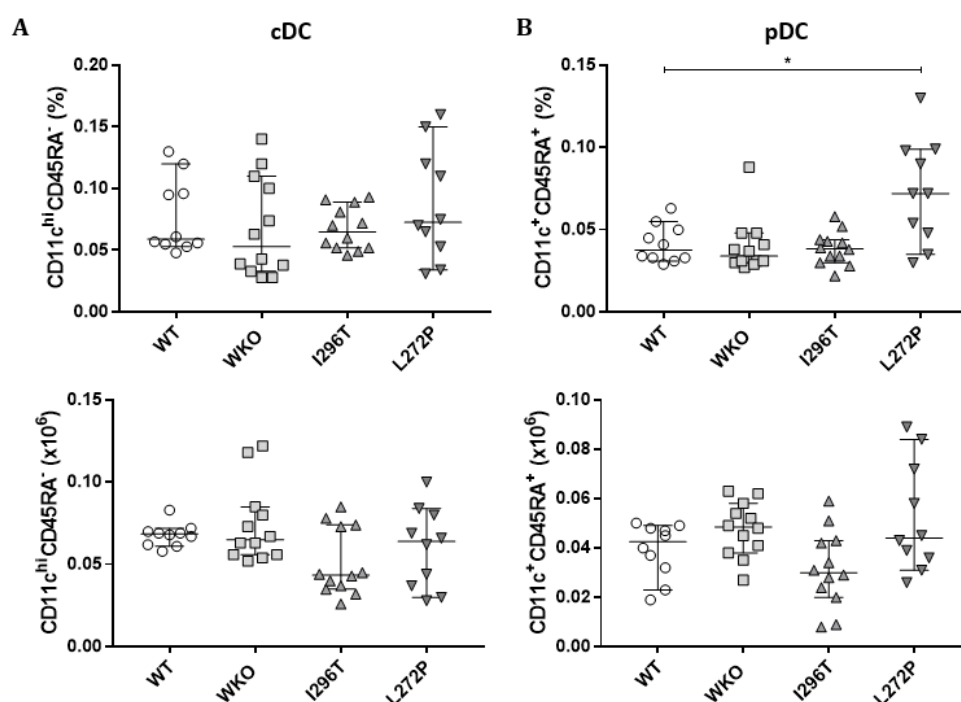


Figura 12 - **Discreta alteração nas células dendríticas tímicas.** Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células $CD11c^{hi}MHCII^{+}CD45RA^{-}$ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (A). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células plasmáticas $CD11c^{+}MHCII^{-/lo}CD45RA^{+}LY6C^{+}B220^{+}$ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (B). Os dados representam 3 experimentos com total de 10 animais WT e L272P-WASp, e 12 animais WASp-KO e I296T-WASp. Dunn's multiple comparison test * $p < 0,05$.

Além de mTECs e células dendríticas, já foi discutida a importância das células B tímicas na geração de células Treg. As células B tímicas são células frequência de 0,1-0,3% no timo normal e têm função na seleção negativa (Frommer e Waisman 2010; Perera *et al.* 2013). Essas células são encontradas na região medular do timo e podem estar em contato próximo com as células tTreg, além de promover sua diferenciação e sobrevivência (Walters *et al.* 2014; Lu *et al.* 2015; Mohammed Ali e Drela 2017). Utilizando como estratégia a análise de células CD3 negativas no timo, avaliamos a população de células B tímicas através dos marcadores B220 e CD19 (**Figura 13A**) ou somente o CD19 (**Figura 13B**). Surpreendentemente, as células B tímicas diminuíram bastante em camundongos WASp-KO (**Figura 13A-B**).

Avaliamos a razão entre o número de células Treg pelo número de células B e observamos um aumento significativo da razão nos camundongos WASp-KO (**Figura 13C**).

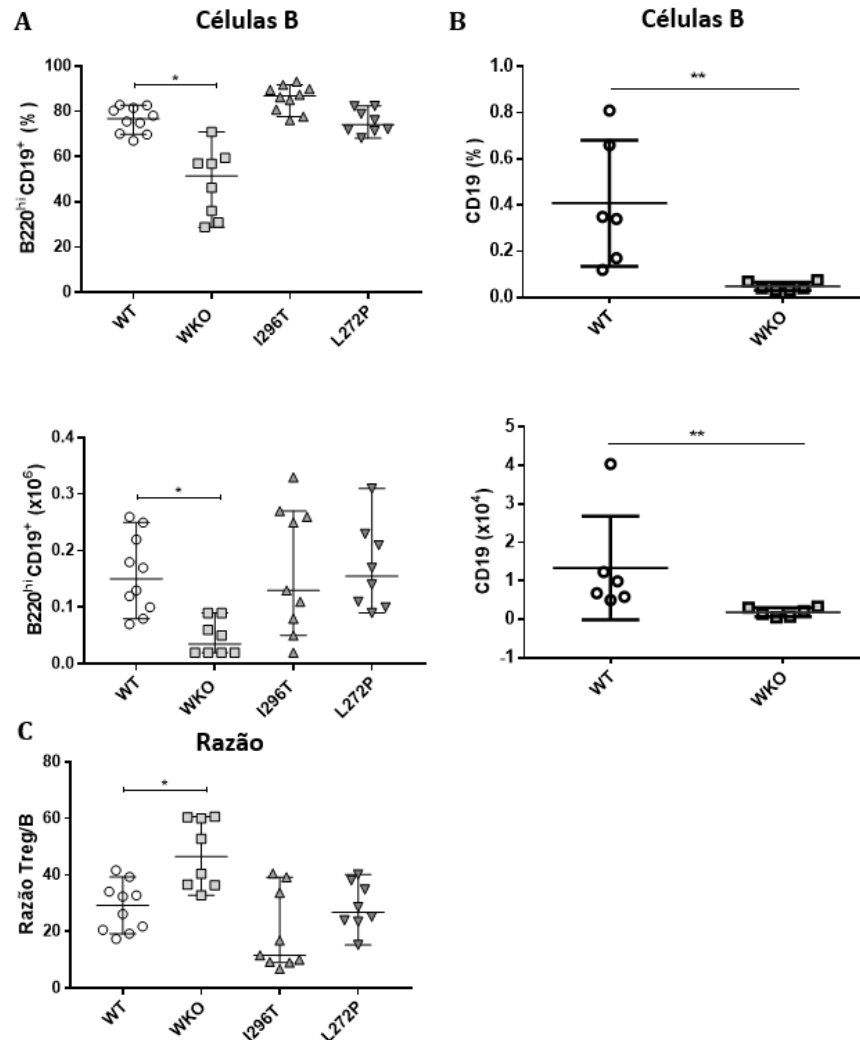


Figura 13- **Diminuição das células B tímicas em animais WASp-KO.** Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células B220^{hi}CD19⁺ em camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (A). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células CD19⁺ em camundongos WT e WASp-KO (B). Razão entre células Treg e células B (C). Os dados representam 3 experimentos com total de 10 animais WT; 8 animais WASp-KO e L272P-WASp e 7 animais I296T-WASp. Os dados representam 2 experimentos com total de 6 animais WT e WASp-KO. Utilizamos Dunn's multiple comparison test *p<0,05 e Mann-Whitney **p<0,005.

Analisando a região medular dos animais WT e WASp-KO, observamos a diminuição de células Treg e, ainda, diminuição da razão de células Treg próximas a fibronectina (**Figura 14A-B**), uma molécula de ECM com presença marcante na medula do órgão (Berrih *et al.* 1985). Além disso, a discrepância numérica das células Treg e B na região medular de camundongos WASp-KO é evidentemente reduzida quando comparado ao timo dos

camundongos WT, I296T-WASp e L272P-WASp (Fig 14C), corroborando os dados de citometria.

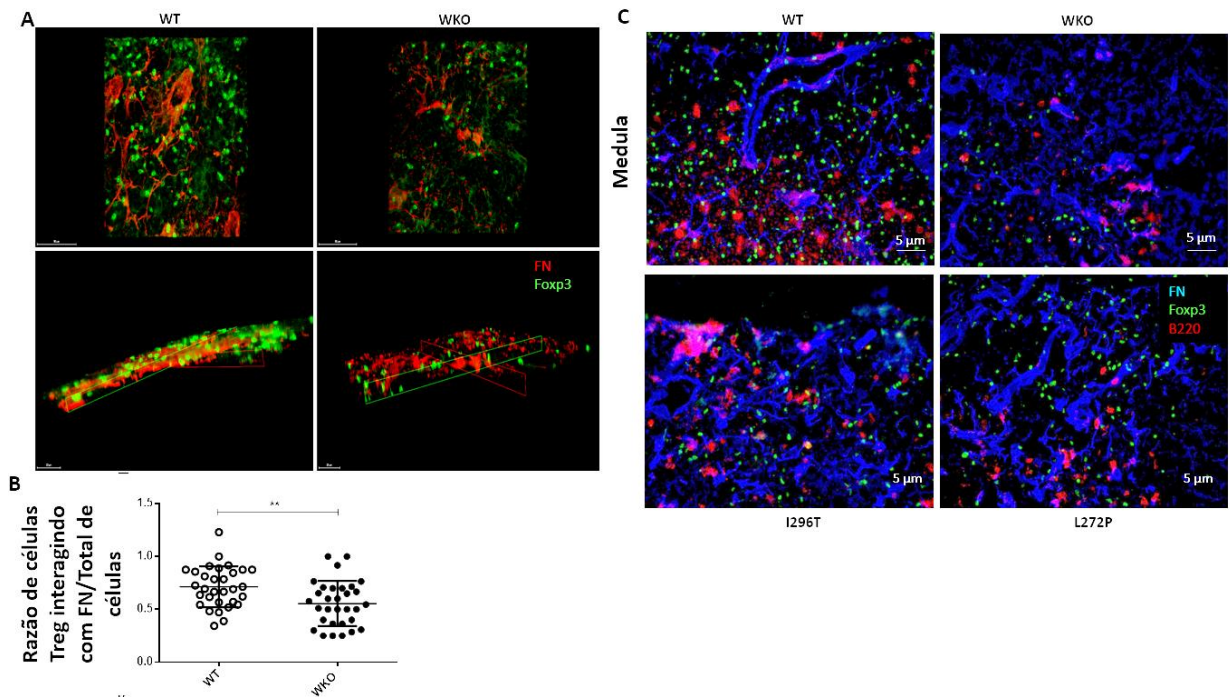


Figura 14 - **Diminuição das células Treg e B tímicas em animais WASp-KO.** Fotomicrografia representativa da região medular de timo com marcação para fibronectina (vermelho) e Foxp3 (verde), as imagens foram adquiridas em microscópio confocal com análise da projeção máxima (painel superior) e da análise tridimensional (painel inferior) em animais WT e WASp-KO (A). Quantificação entre as células Treg que estão em contato com a fibronectina dividido pelo número total de células Treg (B). Fotomicrografia de região medular de timo com marcação para fibronectina (azul), Foxp3 (verde) e B220 (vermelho), as imagens foram adquiridas em microscópio confocal com análise da projeção máxima de animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (C). As letras A e B são relativos a 3 experimentos com total de 3 animais por grupo. A letra C é relativo a 2 experimentos com total de 4 animais por grupo. Mann-Whitney $**p < 0,005$.

5.4 Mutações em WASp impactam na diferenciação *in vitro* de células T Reguladoras

Para avaliar a diferenciação das células tTreg *in vitro*, isolamos células T CD4 SP (descritas nos métodos) e cultivamos as células com diferentes combinações de anti-CD3/anti-CD28, IL-2 recombinante e TGF- β recombinante por 72 h (Figura 15). Utilizando os marcadores fenotípicos CD25 e Foxp3, analisamos por citometria de fluxo quantas células se tornaram CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ após o período de estimulação. Apesar de termos testado diferentes períodos, escolhemos 72h pois apresentava um número suficiente de células vivas e diferenciadas. Observamos que o tratamento com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β foi o melhor estímulo para diferenciar as células Treg, visto que os estímulos sem TGF- β (com anti-

CD3/CD28 + IL-2) ativam as células, aumentando o percentual de células CD25⁺, mas elas parecem permanecer no estágio enriquecido de precursor (**Figura 15 e 16A**). As células derivadas de camundongos WASp-KO não alcançam o estágio precursor (**Figura 16A**) e nem se diferenciam em Treg no estímulo com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β , como as células dos outros grupos (**Figura 16B**). Além disso, foi possível observar que existe um maior número de células no estágio de precursor nos grupos derivados de camundongos com mutações do tipo XLN quando tratadas com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β (**Figura 15**). Estes dados sugerem um defeito intrínseco na diferenciação de Treg que pode ter relação com WASp.

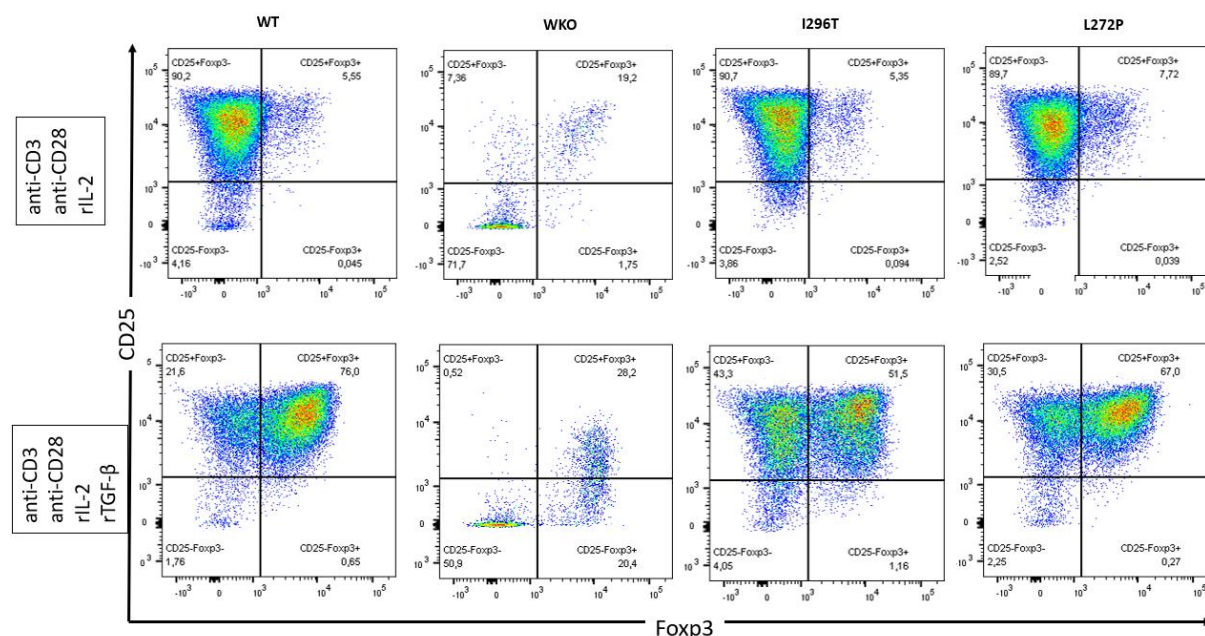


Figura 15 - Animais WASp-KO têm menos células Treg após diferenciação *in vitro*. Dot-plots representativos de células Treg utilizando Fopx3 *versus* CD25 após 72h de estimulação com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 (gráficos superiores) e anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 + TGF- β (gráficos inferiores) nos animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp.

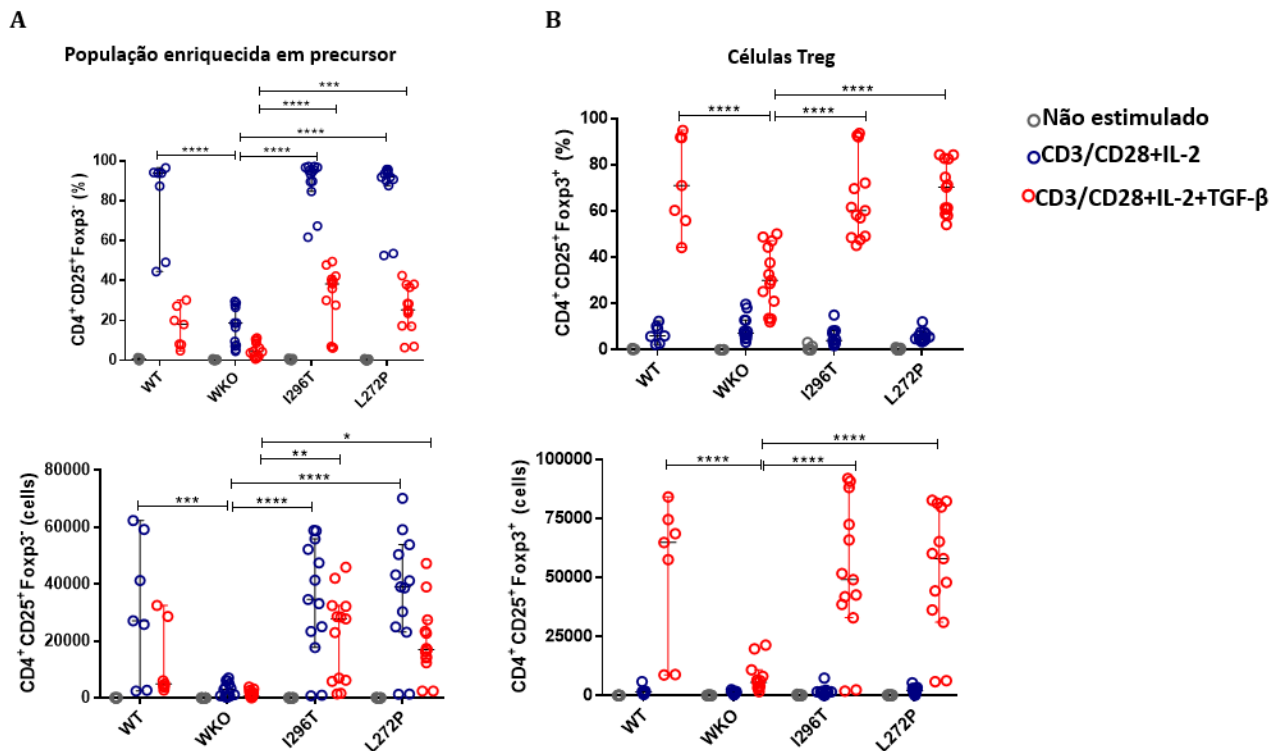


Figura 16 – As células CD4 SP obtidas de animais WASp-KO pouco se diferenciam em células Treg e células precursoras após diferenciação *in vitro*. Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ após 72h de estimulação com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 (azul) e anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 + TGF-β (vermelho) ou sem estimulação (cinza) de células provenientes de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (A). Números relativos (painel superior) e absolutos (painel inferior) de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ após 72h de estimulação com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 (azul) e anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 + TGF-β (vermelho) ou sem estimulação (cinza) de células provenientes de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp (B). Os dados representam 8 experimentos com total de 7 animais WT e 13 animais WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp. Teste Anova *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001.

5.5 Células do camundongo WASp-KO parecem não apresentar defeitos na sinalização de IL-2 e TGF-β, no entanto, a disponibilidade de TGF-β parece estar diminuída no timo

Conforme explicado no tópico anterior, IL-2 e TGF-β são citocinas necessárias para o desenvolvimento de células Treg. Dada a diminuição no número de células Treg diferenciadas *in vitro* a partir de timócitos CD4 SP de animais WASp-KO, avaliamos se células CD4 SP seriam capazes de responder a estimulação com IL-2 e TGF-β, avaliando os componentes das vias de sinalização a jusante STAT5 fosforilado (pSTAT5) e Smad2/3 fosforilado (pSmad2/3), respectivamente. Testamos a estimulação de IL-2 e expressão do pSTAT5 em diferentes

períodos, e em todos os tempos os resultados foram semelhantes em todos os grupos (**Figura 17A-C**). Da mesma forma, as células estimuladas com TGF- β em diferentes tempos mantiveram a expressão de pSmad2/3 em níveis semelhantes em todos os grupos (**Figura 17D-F**). Os dados de pSTAT5 corroboram nossos achados anteriores (dados não publicados).

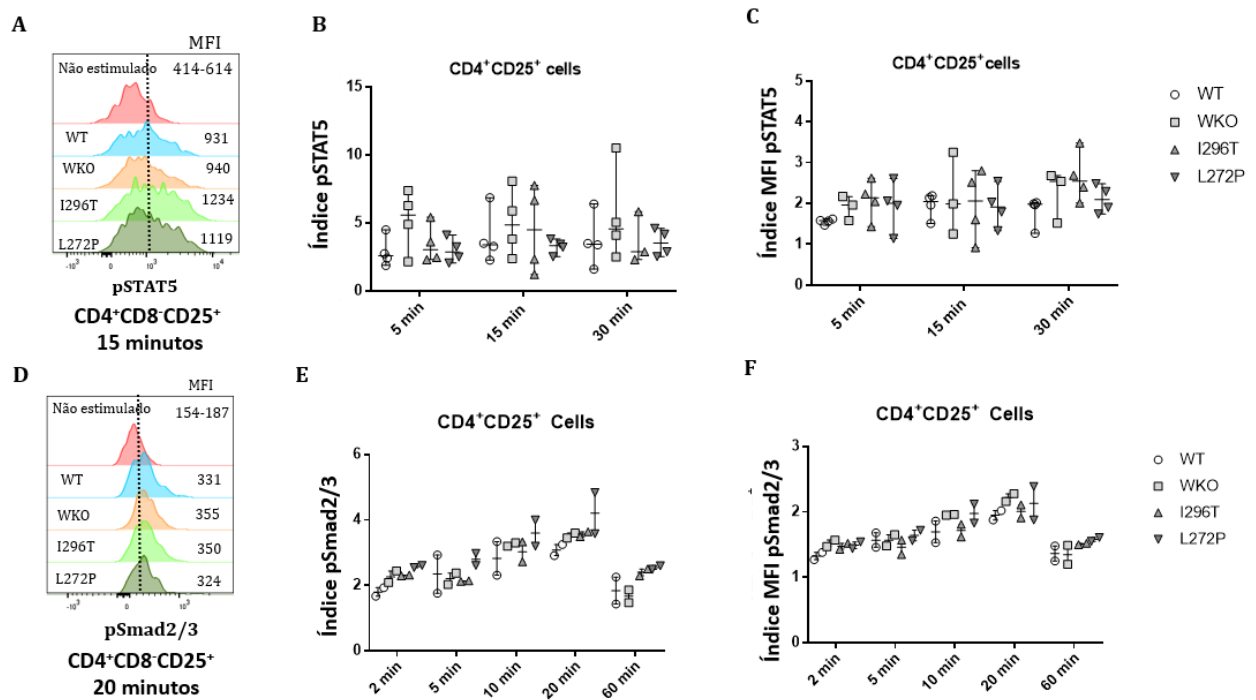


Figura 17 - As células dos animais WT, WASp-KO, L272P-WASp e I296T-WASp apresentam níveis de pSTAT5 e pSmad2/3 semelhantes em resposta à sinalização de IL-2 e TGF- β . Histogramas representativos da expressão intracelular de pSTAT5 (A) e pSmad2/3 (D) em células CD4⁺CD25⁺ de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp após estimulação de 15 minutos com IL-2 recombinante (20 ng/mL) e após 20 minutos de estimulação com TGF- β recombinante (5 ng/mL), respectivamente. Os números dentro de cada histograma representam o MFI de cada grupo. Índice (Valor por tempo/Valor do não estimulado) (B e E) e Índice do MFI (C e F) de pSTAT5 e pSmad2/3 em células CD4⁺CD25⁺ de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp. Os dados representam 2 experimentos com total de 4 animais por grupo para pSTAT5 e 2 animais de cada para TGF- β .

Em seguida, decidimos avaliar a disponibilidade dessas citocinas no timo desses animais. Através de análise quantitativa por método citofluorométrico multiplex para detecção de citocinas, avaliamos as citocinas de perfil TH1, TH2 e TH17 e não observamos diminuição em nenhuma delas no timo dos camundongos WASp-KO, no entanto, esse resultado precisa ser mais bem explorado (**Figura 18A-B**). Em relação ao TGF- β , foi necessário utilizarmos a imunofluorescência através de microscopia confocal para avaliar seu conteúdo intratímico. Foi possível observar que a região medular do timo (através da marcação com fibronectina, que apresenta-se mais intensa nessas áreas) dos animais WASp-KO parecem ter menos TGF- β do

que o grupo controle (**Figura 18C**). Análise comparativa da citocina TGF- β no timo dos animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp corroboram o resultado anterior e demonstra que o animal WASp-KO apresenta diminuição qualitativa de TGF- β (**Figura 19**), enquanto os demais animais aparentam ter quantidades semelhantes da citocina.

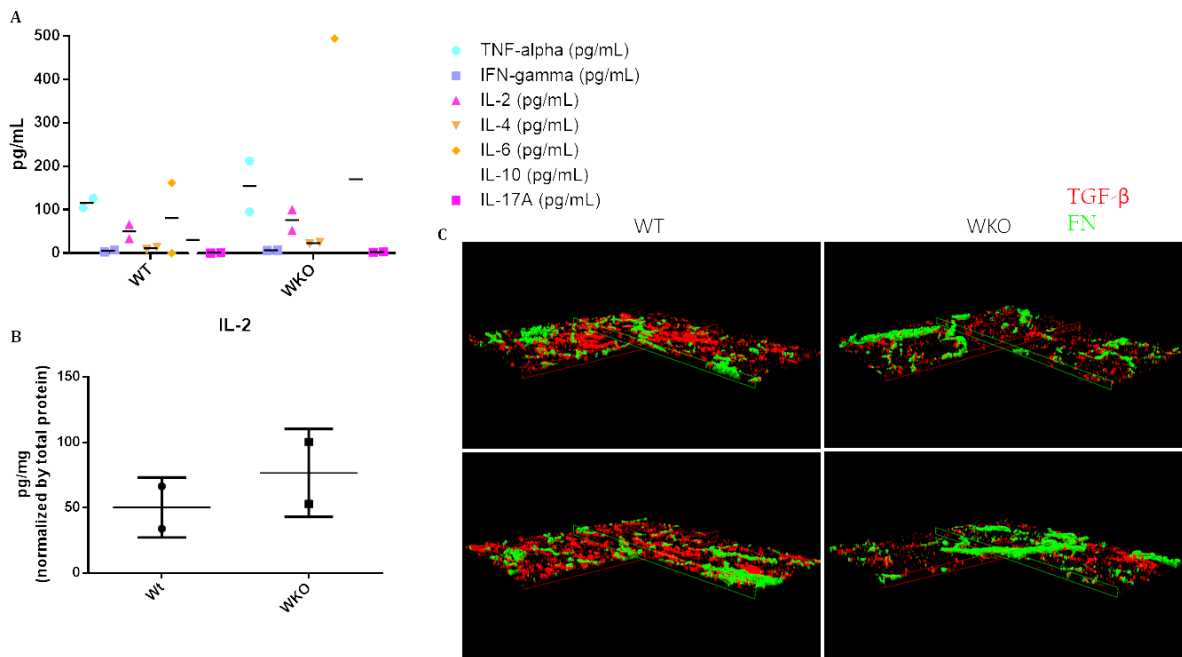


Figura 18 - Diminuição de TGF- β no timo dos animais WASp-KO. Quantidade de citocinas (pg/mL) do tipo Th1, Th2 e Th17 no timo de animais WT e WASp-KO (A). Quantidade de IL-2 (pg/mL) no timo de animais WT e WASp-KO (B). O painel mostra imagens representativas de cortes espessos de timos de camundongos jovens controles (fotos da coluna esquerda) e WASp-KO (fotos da coluna direita), mostrando imunomarcagem de fibronectina (verde) e de TGF- β (vermelho) com volumes semelhantes ao tridimensional (3D) (C). Os dados de multiplex representam 1 experimento com total de 2 animais por grupo, os dados de TGF- β representam um conjunto de 3 experimentos com total de 3 animais por grupo.

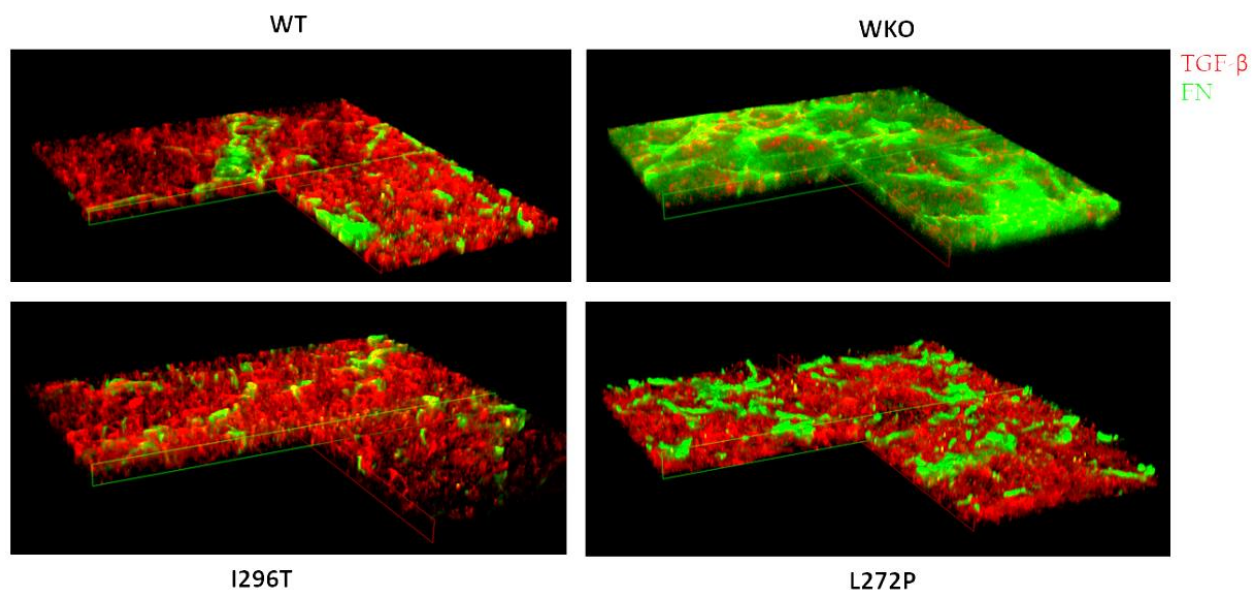


Figura 19 – O animal WASp-KO apresenta redução da citocina TGF- β em relação aos animais WT e com mutações do tipo XLN. Imagens representativas de cortes espessos de timos de camundongos jovens controles, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp mostrando imunomarcagem de fibronectina (verde) e de TGF- β (vermelho) com volume tridimensional (3D). Os dados representam um conjunto de 1 experimento com total de 2 animais por grupo.

5.6 A proliferação das células T reguladoras encontra-se comprometida em células provenientes de animais WASp-KO

A proliferação celular é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento e expansão tímica de células selecionadas (Schmitt *et al.* 2004; Ciofani e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Nesse sentido, os dados de diferenciação *in vitro*, previamente apresentados, apontaram para uma possível desregulação nos eventos concomitantes de proliferação das células de animais WASp-KO. Por conseguinte, isolamos timócitos CD4 SP e os coramos com CFSE. Em seguida, cultivou-se as células com diferentes combinações de anti-CD3/anti-CD28, rIL-2 e rTGF- β por 48h e 72h (**Figura 20**). É possível observar que as células do animal WASp-KO não possuem capacidades proliferativas comparáveis aos camundongos controle e XLN (**Figura 20**).

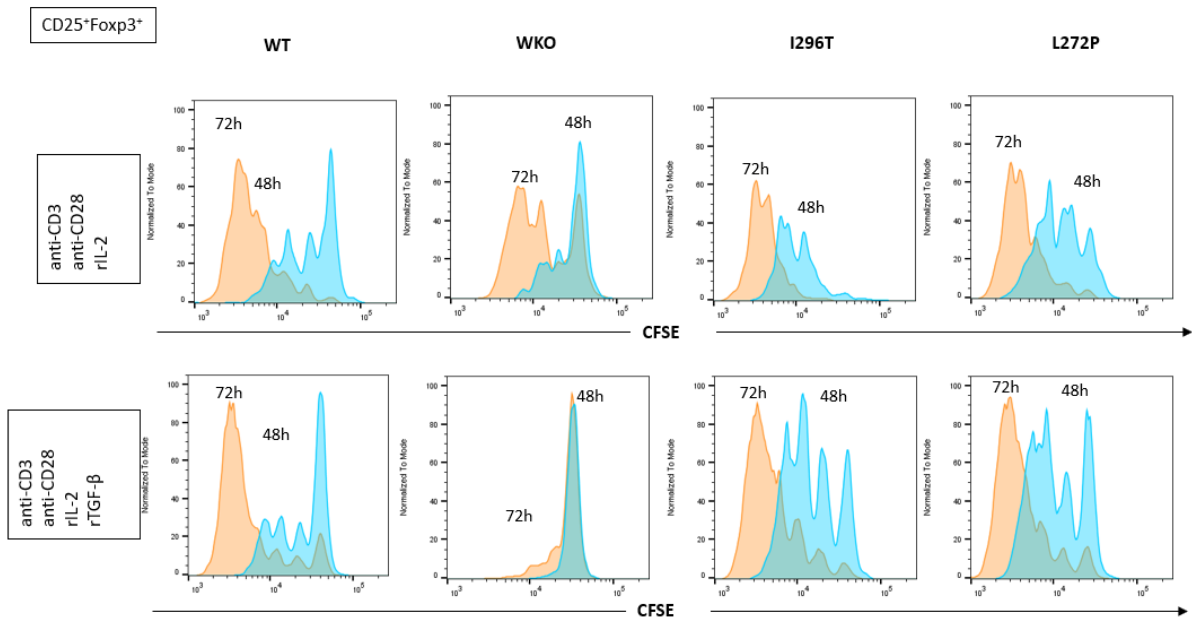


Figura 20 - **Análise dos histogramas demonstram defeito na proliferação de células Treg de células provenientes de animais WASp-KO.** Histogramas representativos da análise de CFSE em células Treg derivadas de animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp após estimulação com anti-CD2/CD28+IL-2 ou anti-CD2/CD28+IL-2+TGF- β por 48h e 72h.

Analisando todos os ensaios, abordamos quantitativamente a capacidade proliferativa celular através dos valores de CFSE não diluídos, ou seja, avaliamos células que possuem 100% de CFSE e, portanto, não proliferaram (**Figura 21A-D**). As células enriquecidas em precursores de WASp-KO tratadas com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 (azul) não proliferaram como as células dos animais WT e com mutações do tipo XLN em ambos os momentos (48h e 72h) (**Figura 21A-B**). Eles ainda apresentam uma proliferação ainda mais prejudicada quando tratados com anti-CD3/anti-CD28 + IL2 + TGF- β , assim como as células do animal WT em comparação com células dos animais com mutações do tipo XLN. Analisando o grupo de células Treg, observamos que em 48h as células WT proliferaram menos do que as derivadas de animais com mutações do tipo XLN; no entanto, a diminuição é ainda mais significativa nas células WASp-KO (**Figura 21C**). Já em 72h, o WT atinge níveis de proliferação semelhante aos animais XLN. As células WASp-KO, quando tratadas apenas com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2, parecem começar a proliferar, mas quando o TGF- β é adicionado, isso não ocorre (**Figura 21D**).

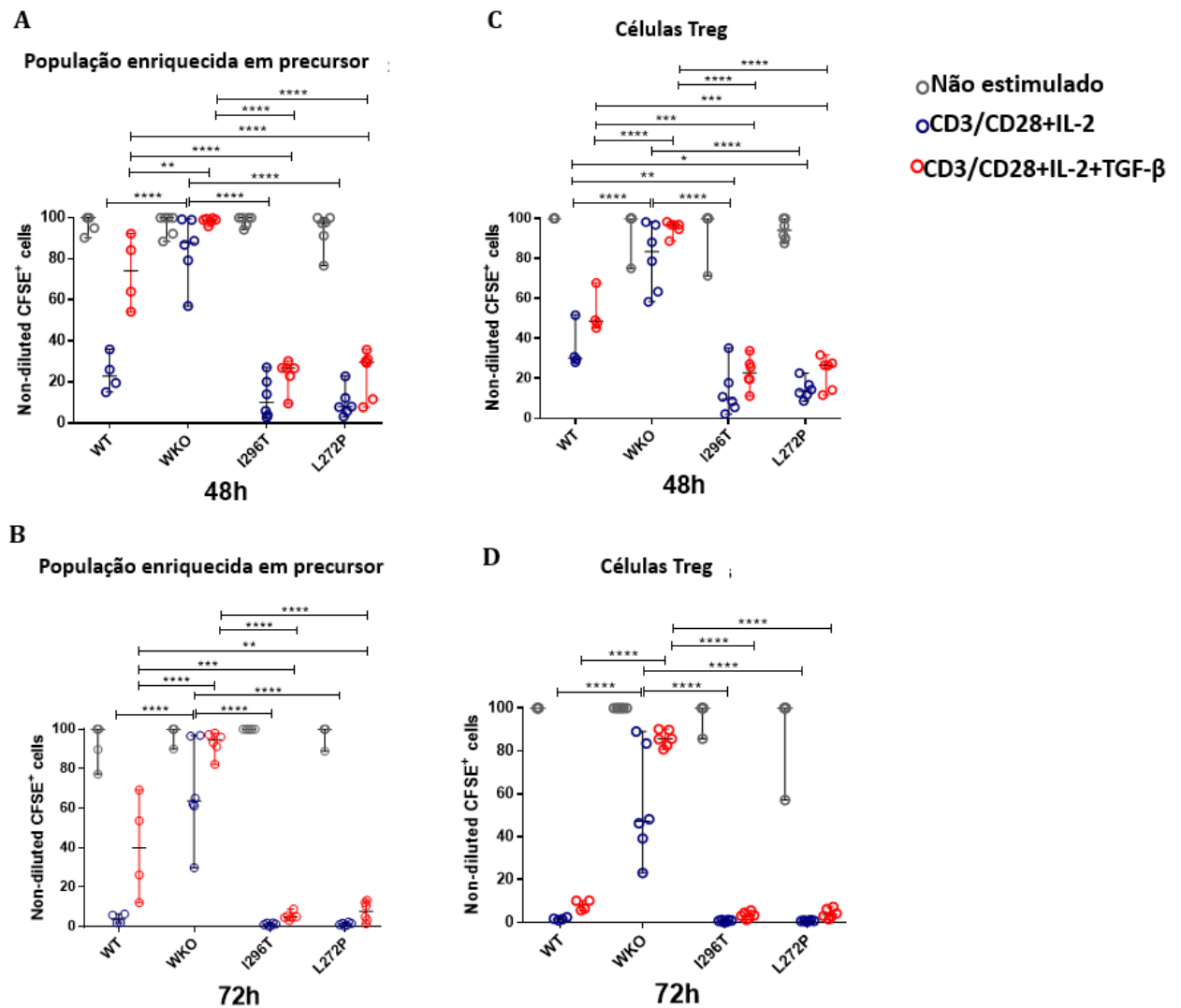


Figura 21 - **Diminuição da proliferação e diferenciação *in vitro* de células Treg provenientes de animais WASp-KO e aumento da proliferação.** Números relativos de células CFSE⁺ não diluídas CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁻ (A-B) e tTreg não diluídas (C-D) de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp não estimuladas (cinza), e após 48 horas (A-C) e 72 horas de estimulação (B-D) com anti-CD3/CD28 + IL-2 (azul) ou anti-CD3 / CD28 + IL-2 + TGF-β (vermelho). Os dados representam 4 experimentos com total de 4 animais por grupo. Teste de Anova * p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005, **** p <0,0001.

Esses dados são ainda mais claros através de análises em gráfico *dot-plot* CFSE *versus* Foxp3, em todos os intervalos de tempo. Utilizando estimulação com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 + TGF-β por 12 horas, a expressão de Foxp3 observada foi a de células Treg que já existiam no pool de células CD4 SP usadas (**Figura 22**). No tempo de 24h, as células começam a regular positivamente o Foxp3 e, em 36h, células em proliferação já foram visíveis (**Figura 22**). Em 48h e 72h, a maioria das células já proliferaram (**Figura 21**). Esses eventos podem ser observados nos grupos de células de camundongos WT e com mutações do tipo XLN (**Figura**

22 e Figura 23). No entanto, no grupo WASp-KO observamos menos células F_{oxp3}⁺ 24h após estímulo. A expressão de F_{oxp3} nas células dos animais WASp-KO parece ter uma leve regulação positiva em 36h, e apenas em 72h após estímulo algumas células começaram a proliferar (Figura 22 e Figura 23C-D). É interessante observar que a maior parte das células provenientes de animais com mutações do tipo XLN já proliferou após 48h de estímulo, mas que há uma grande concentração de células F_{oxp3}⁻ que também proliferaram sem regular positivamente o fator F_{oxp3} (Figura 22 e 23E-H). Esses dados indicam que, apesar de apresentarem uma diferenciação incompleta (em comparação ao animal WT), células de camundongos com mutações do tipo XLN são capazes de gerar Treg.

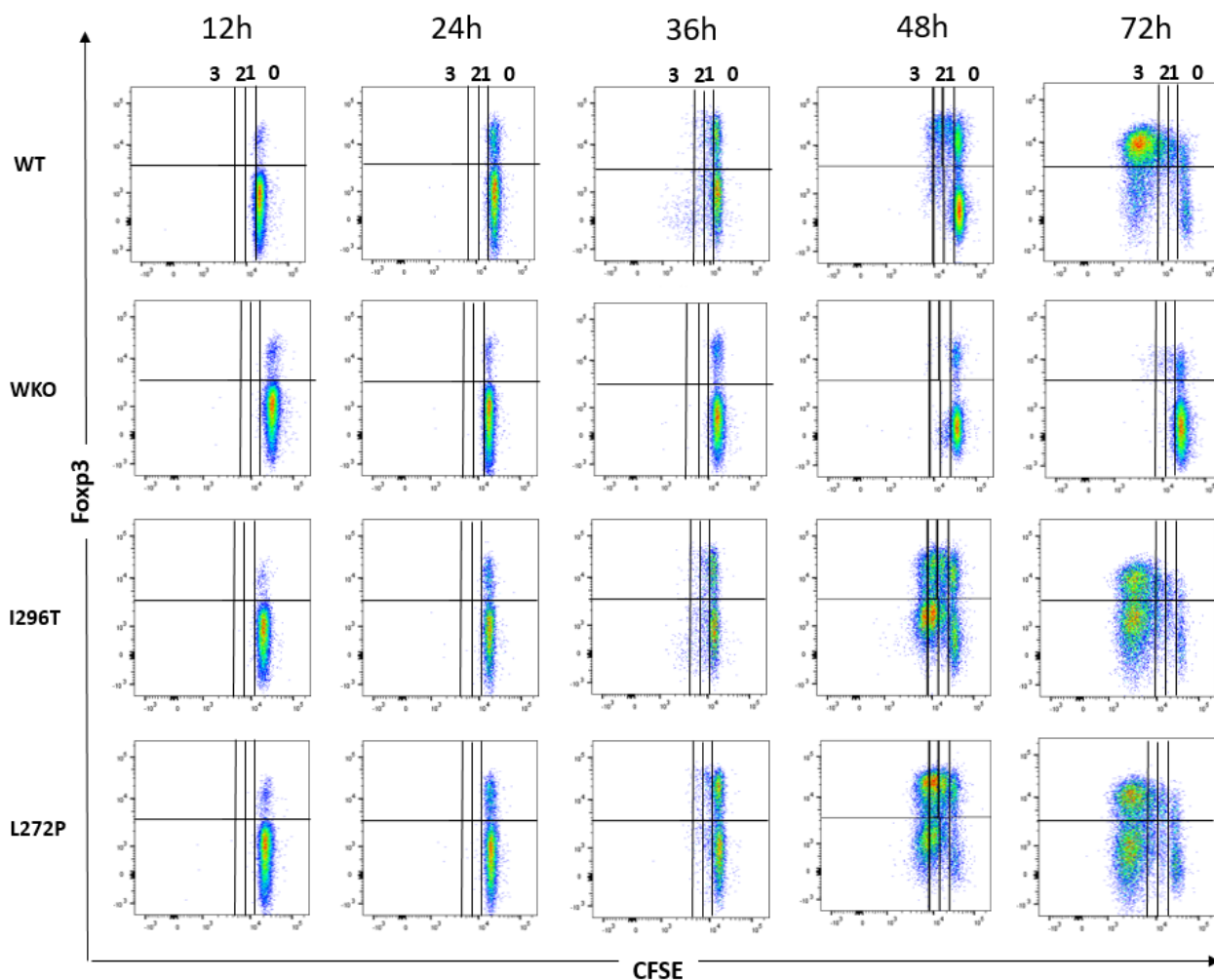


Figura 22 - A diferenciação/proliferação *in vitro* de Treg começa a partir de 36h nas células obtidas do animal WT, mas o mesmo não acontece para as células do WASp-KO. Histogramas representativos da expressão de F_{oxp3} versus CFSE em timócitos CD4 SP de animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L292P-WASp após estimulação com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 72h. Os dados representam 4 experimentos com total de 4 animais por grupo.

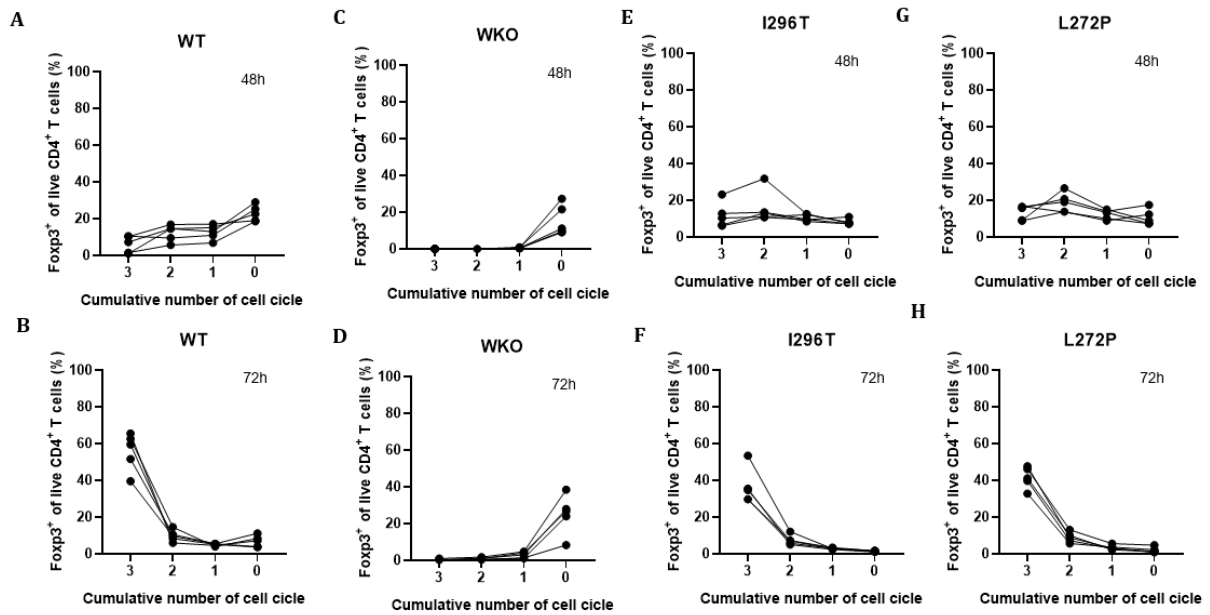


Figura 23 - **Porcentagem de células Foxp3^+ nas diferentes gerações do ciclo celular.** Números relativos de células Foxp3^+ (A-H) em cada ciclo cumulativo de células nos camundongos WT (A-B), WASp-KO (C-D), I296T-WASp (E-F) e L272P-WASp (G-H), após estimulação de 48 horas (A,C,E,G) e 72 horas (B, D, F, H). Os dados representam 4 experimentos com total de 4 animais por grupo.

Ao avaliar a expressão de CD25 *versus* a diluição de CFSE após estimulação com anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 + TGF- β foi possível observar uma pequena regulação positiva de CD25 nas células do WASp-KO apenas no tempo de 72 horas (**Figura 24**), enquanto nas células WT esse processo se inicia em 24h. É possível observar também que praticamente todas as células do WT se tornam CD25 positivas e apresentam diversos ciclos de proliferação até 72h (**Figura 24**), enquanto poucas células do WASp-KO proliferam nesse período.

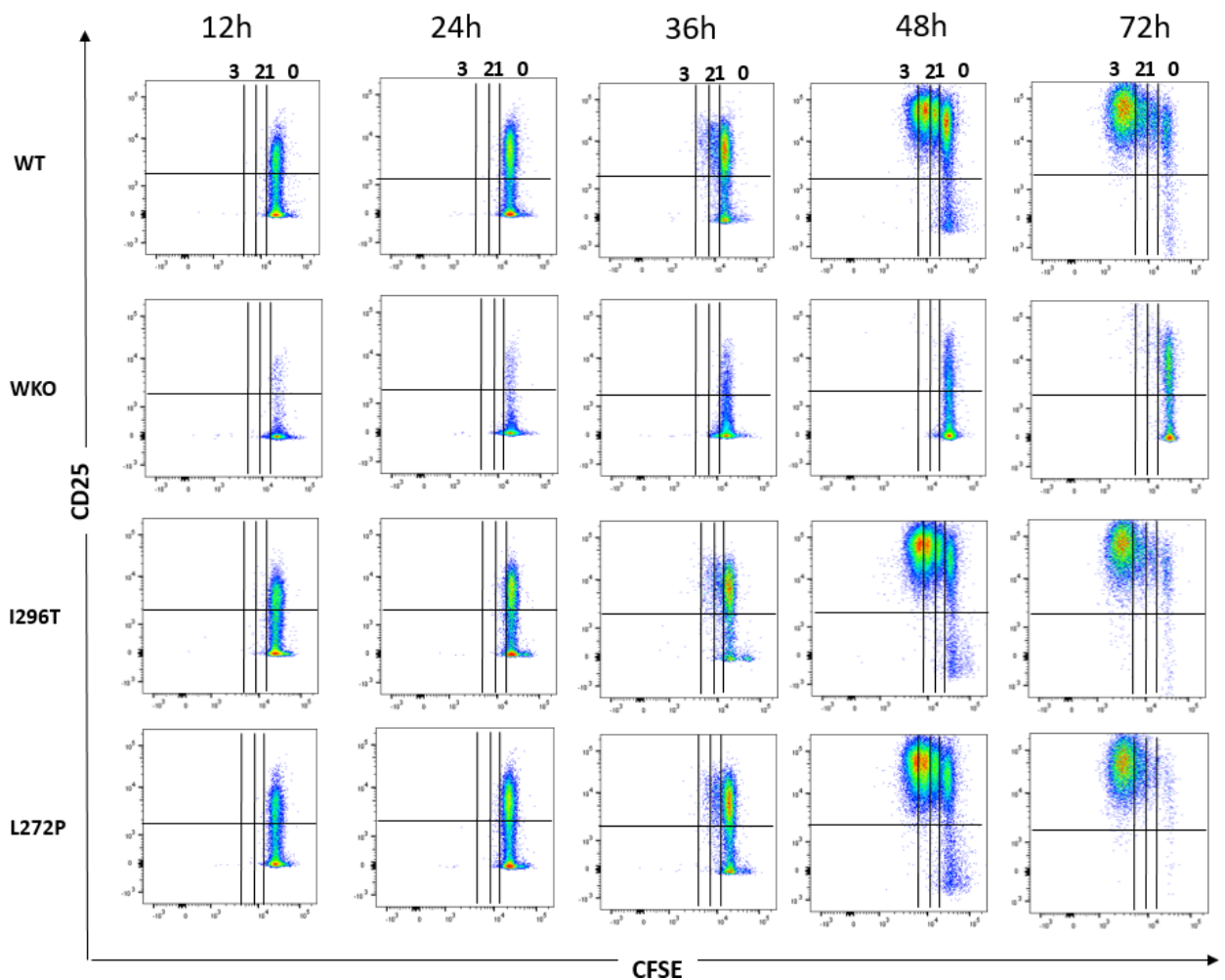


Figura 24 - A regulação positiva de CD25 é atrasada nas células provenientes do WASp-KO. Histogramas representativos de CD25 *versus* CFSE em timócitos CD4 SP de animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L292P-WASp após estimulação com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β (0,2 ng/mL) ou anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β (2ng/mL) nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 72h. Os dados representam 4 experimentos com total de 4 animais por grupo.

5.7 O TGF- β bloqueia a diferenciação e proliferação *in vitro* de células T reguladoras e inibe a regulação positiva de Foxp3 em células WASp-KO

Foi demonstrado que a molécula WASp restringe a secreção de TGF- β 1 de maneira dependente de quinases das famílias Cdc42 e Src (Kim *et al.* 2013), mas não foi avaliado se a ausência de WASp pode bloquear a sinalização de TGF- β exógena. Para avaliar se o TGF- β tem alguma relação com a menor diferenciação e proliferação de células Treg em camundongos WASp-KO, usamos diferentes concentrações de TGF- β e avaliamos a diferenciação contra diferentes estímulos (**Figura 25A**). As células WASp-KO responderam melhor com menores quantidades de TGF- β , na presença de IL-2, quando comparadas aos outros grupos. No entanto,

com esses resultados, percebemos que, mesmo sem IL-2 as células WT e provenientes dos animais com mutações do tipo XLN apresentaram boa diferenciação em células Treg. No entanto, ao remover a IL-2 do tratamento, as células WASp-KO não se diferenciaram (**Figura 25A-C**). Em relação as células do WT, mesmo na ausência de IL-2, muitas se diferenciaram em Treg células (**Figura 25A-B**). O mesmo ocorreu com as células do provenientes de animais com mutações do tipo XLN (**Figura 25D-E**).

5.8 Há uma morte pronunciada nos tímócitos provenientes dos animais WASp-KO após 72h de estímulo em cultura

De forma a investigar se a baixa capacidade proliferativa de células WASp-KO, durante a diferenciação *in vitro*, poderia estar correlacionada com a indução de morte celular pela estimulação, decidimos quantificar a morte nas culturas. Assim, observamos que em 48h todos os grupos e estímulos têm valores semelhantes de células mortas (**Figura 26A**). No entanto, em 72h, as células não-estimuladas de todos os grupos morreram mais, e as células estimuladas apenas com anti-CD3/anti-CD28+IL-2 do WT e do WASp-KO morreram mais que as dos animais XLN (**Figura 26B**). O grupo WASp-KO com o estímulo de anti-CD3/anti-CD28+IL-2+TGF- β , apresenta pronunciada morte de células (**Figura 26B**). De fato, aproximadamente 80% das células em cultura estão mortas no grupo WASp-KO após 72h, enquanto WT e XLN têm valores entre 20-60%.

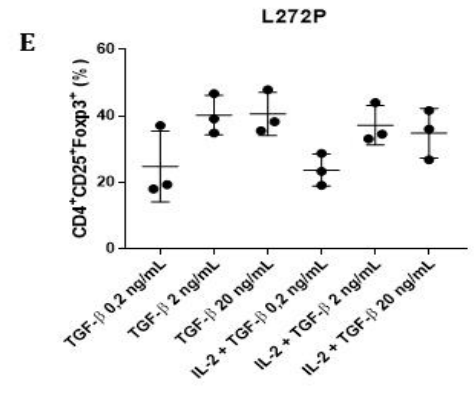
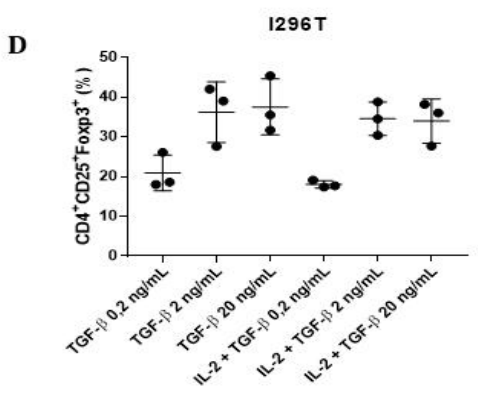
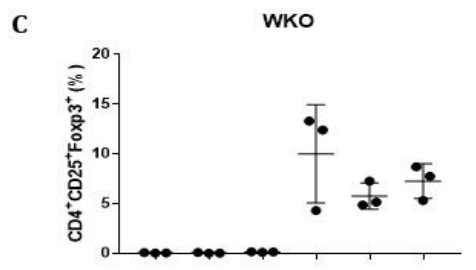
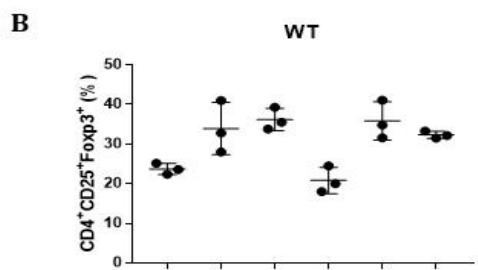
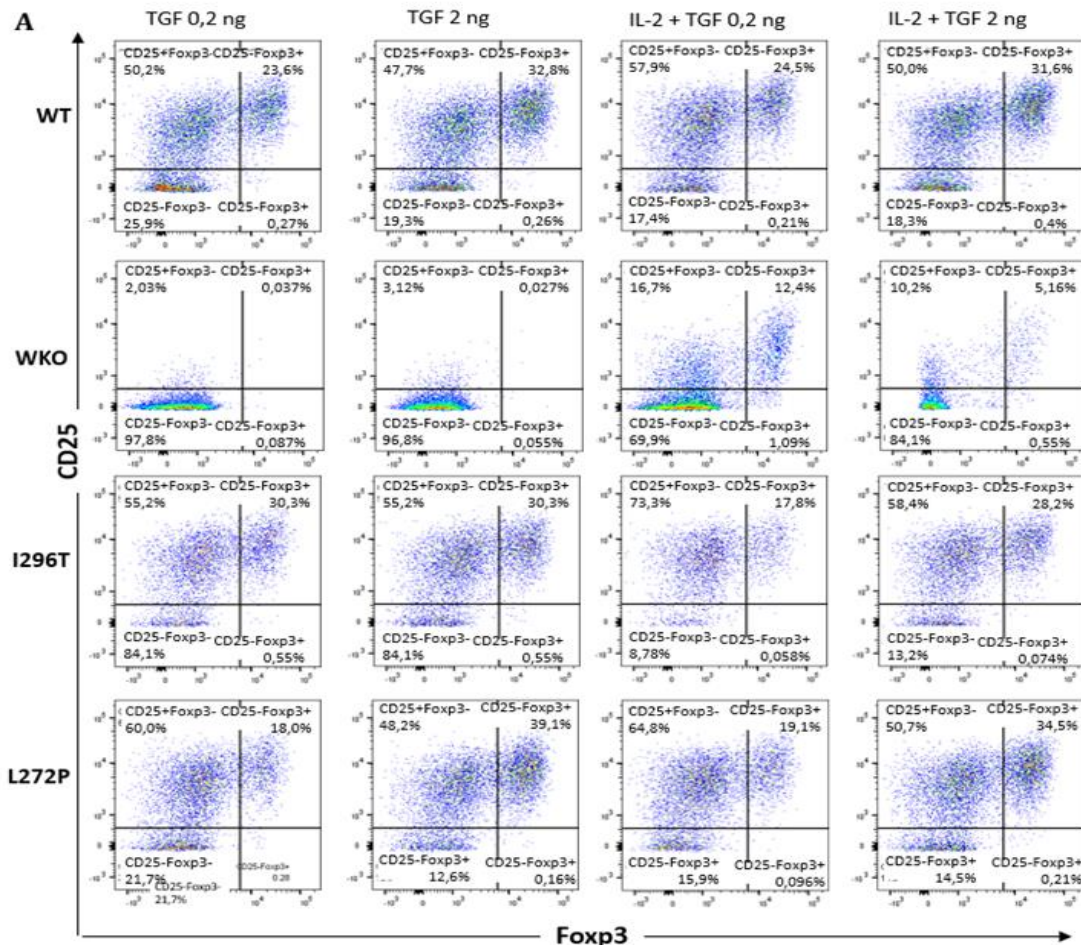


Figura 25 - TGFb bloqueia a diferenciação e proliferação de células do animal WASp-KO em células Treg *in vitro*. Histogramas representativos de Fopx3 versus CD25 na subpopulação de células

Treg de camundongos WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp, após estímulos com anti-CD3/CD28+TGF- β (0,2 ng/mL), anti-CD3/CD28+TGF- β (2 ng / mL), anti-CD3/CD28+TGF- β (20 ng/mL) e anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (0,2 ng/mL), anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (2 ng/mL) ou anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (20 ng/mL) por 36 horas (A). Números relativos de células tTreg (B-E) dos camundongos WT (B), WASp-KO (C), I296T-WASp (D), L272P-WASp (E), após estimulação de 36 horas com anti-CD3/CD28+TGF- β (0,2 ng/mL), anti-CD3/CD28+TGF- β (2 ng / mL), anti-CD3/CD28+TGF- β (20 ng/mL) e anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (0,2 ng/mL), anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (2 ng/mL) ou anti-CD3/CD28+IL-2+TGF- β (20 ng/mL). Os dados representam 3 experimentos com total de 3 animais por grupo.

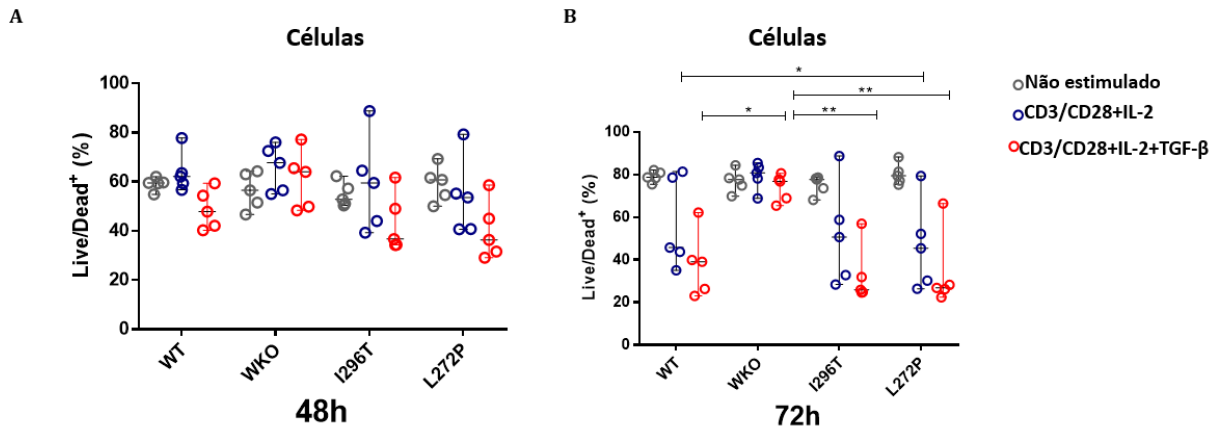


Figura 26 – **Percentual de células mortas na cultura em 48h e 72h.** Números relativos de células mortas (Live/Dead+) obtidas do timo dos animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp, após estímulos com anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β (0,2 ng/mL) ou anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF- β (2ng/mL) em 48h (A) e 72h (B). Os dados representam 5 experimentos com total de 5 animais por grupo. Os experimentos foram realizados na Suécia. Teste de Anova * p <0,05, ** p <0,005.

5.9 A adesão das células provenientes do camundongo WASp-KO está alterada no estímulo com anti-CD3

Moléculas de adesão participam diretamente das interações celulares no timo e os eventos de adesão e de-adesão são processos fundamentais nas diversas etapas do desenvolvimento intratímico de células T (Savino et al. 2003). Dessa forma, decidimos investigar possíveis alterações em eventos adesivos de timócitos CD4 SP utilizando ensaios com a fibronectina, proteína de ECM mais abundante no timo, e o anti-CD3 como simulador de contato com MHC-peptídeo. Para esses ensaios, células CD4 SP foram isoladas e colocadas em lâminas pré-tratadas com os estímulos por 10 minutos. Após remoção de células não-aderentes avaliamos a expressão de Foxp3 e a organização do citoesqueleto de actina (**Figura 27A**). A adesão foi medida pela análise do processo de IRM (IRM, do inglês *Interference Reflectance Microscopy*), onde as áreas escuras mostram os focos de adesão e as áreas claras são as regiões sem contato de adesão celular (**Figura 27B**). Observamos que apenas células CD4 SP de camundongos WASp-KO apresentaram menor resposta adesiva ao anti-CD3 (**Figura 27C**), e que a resposta adesiva à fibronectina, sozinha ou em associação ao anti-CD3,

não pareceu estar alterada nas células (particularmente, nem nas células Treg) de nenhum dos grupos estudados (**Figura 27D**).

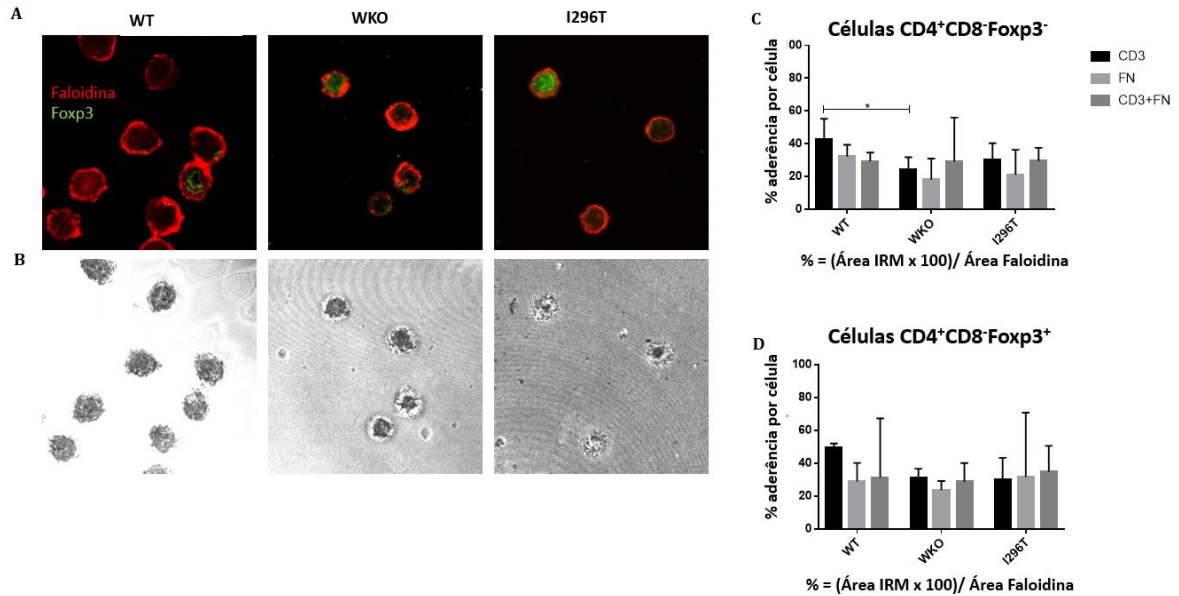


Figura 27 - Adesão de timócitos CD4 SP do WASp-KO é menor ao anti-CD3. Fotomicrografias de células T com marcação para faloidina (vermelho) e Foxp3 (verde) (A) e da IRM (B), as imagens foram adquiridas em microscópio confocal com análise da reflexão de interferência. Números relativos da aderência por célula TCD4 SP (C) e células Treg (D) após adesão em anti-CD3 (0,5 µg/mL), fibronectina (FN) (10µg/mL) ou anti-CD3 + FN (0,5+10µg/mL). Os dados representam 2 experimentos com total de 3 animais por grupo. Teste Anova * p <0,05.

6. DISCUSSÃO

Existe uma importante disfunção em células Treg de pacientes com WAS e de camundongos deficientes em WASp (Adriani *et al.* 2007; Humblet-baron *et al.* 2007b; Maillard *et al.* 2007; Marangoni *et al.* 2007). No entanto, o impacto da ativação constante de WASp, como ocorre na imunodeficiência XLN, só foi avaliada na periferia. Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar subpopulações celulares tímicas em camundongos com deficiência (WASp-KO) e com ativação constante em WASp (mutações do tipo XLN). Além disso, buscamos avaliar a diferenciação de células tTreg a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na diminuição dessas células no timo de camundongos WASp-KO.

Dessa forma, a primeira parte do trabalho envolveu caracterizar o timo e as principais subpopulações de células em animais WT, WASp-KO, I296T-WASp e L272P-WASp. Nosso objetivo foi avaliar como as mutações em WASp poderiam afetar o desenvolvimento intratímico de linfócitos. Nossa hipótese era de que os fenótipos entre os animais fossem opostos, por terem mutações de perda e ganho de função. De fato, ao avaliarmos o órgão macroscopicamente, observamos que o timo do animal WASp-KO era ligeiramente maior do que o timo do animal WT e que o timo do animal I296T-WASp apresentava uma redução em tamanho. Estudando as subpopulações principais de timócitos SP, observamos redução no número de células CD4 SP nos animais I296T. O que pode corroborar a diminuição no número total de timócitos, visto que a população de células CD4 SP são aproximadamente 10% do timo, ou seja, similar ao número encontrado em animais controle. Foi observado por Westerberg e colaboradores que os linfócitos T periféricos de animais I296T-XLN apresentam instabilidade genética, como quebras cromossômicas, cromossomos fusionados ou duplos e tetraploidia (Westerberg *et al.* 2010). Essa instabilidade também pode ocorrer no timo e levar a um aumento da seleção positiva e negativa durante a diferenciação dessas células. No entanto, essa hipótese precisa ser mais bem estudada. Estudamos mais detalhadamente essas populações através dos marcadores de ativação/maturação CD69 e CD62L, que juntos são capazes de diferenciar as células que estão no início da maturação; onde temos as células expressando CD69, com expressão constitutiva em SP ($CD69^+CD62L^-$) e as que estão no estágio final de maturação quando perdem o CD69 e começam a regular positivamente o CD62L ($CD69^-CD62L^+$), ou seja, aptas para deixar o timo rumo à periferia, onde realizarão suas funções no sistema imunitária (Feng *et al.* 2002; Nakayama *et al.* 2002; Allende *et al.* 2004). Observamos redução de timócitos SP $CD69^+$ e aumento de timócitos SP $CD62L^+$ em camundongos WASp-KO. Nos camundongos I296T-WASp observamos diminuição percentual de timócitos SP expressando

CD69⁺ e aumento de números percentuais de timócitos SP CD62L⁺. Os resultados demonstram que alterações no WASp podem estar envolvidas com alterações na diferenciação de linfócitos T, que podem estar relacionadas a distúrbios nos processos seletivos, na velocidade de maturação e emigração.

Como dito anteriormente, a diminuição em número e função de células Treg em camundongos deficientes em WASp já foi descrita (Adriani *et al.* 2007; Humblet-baron *et al.* 2007b; Maillard *et al.* 2007; Marangoni *et al.* 2007). Em contrapartida, o timo de camundongos com mutações do tipo XLN nunca foi avaliado em relação a essas células. Portanto, utilizando CD25 e Foxp3 como marcadores de células Treg, confirmamos a deficiência em células Treg nos camundongos WASp-KO e uma redução numérica dessas células no camundongo I296T-WASp. Neste caso, a falta ou ganho de função tem o mesmo efeito no fenótipo final. A aparente discrepância pode ser explicada por um número menor de células CD4 no camundongo I296T-WASp que leva a uma menor diferenciação de células Treg, enquanto no animal WASp-KO o problema parece ser intrínseco da célula em diferenciação.

Avaliamos também dois precursores tímicos para Treg, o clássico CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻, que apesar de ser um grupo enriquecido em precursores também pode conter células CD4 SP que foram ativadas (Schmetterer *et al.* 2012), e um segundo grupo de precursores CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺, que se diferencia por uma rota alternativa dependente de IL-15 de origem estromal (Marshall *et al.* 2014; Schuster *et al.* 2019). Não observamos diferenças entre os grupos de precursores estudados, o que sugere que a deficiência no número de células Treg em WASp-KO possivelmente ocorre em uma etapa posterior.

As células do microambiente tímico e a ECM emitem múltiplos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos, e que são essenciais para a manutenção da população de células T circulantes. Em resposta a estes sinais, os timócitos em desenvolvimento são induzidos a proliferar e migrar através do parênquima tímico, diferenciando-se em linfócitos T maduros (Savino *et al.* 2004; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Durante a diferenciação e migração, os timócitos encontram vários componentes do microambiente tímico, como uma rede de TECs, que é distinta no córtex e na medula, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, componentes da ECM, além de componentes solúveis como fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas. Todo esse arranjo tridimensional vai dirigindo os timócitos através do parênquima tímico levando às seleções positiva e negativa (Savino *et al.* 2003). Nesse contexto, decidimos avaliar duas populações minoritárias no timo, mas que têm relação com a diferenciação de

células Treg, as DCs e as células B tímicas. Um estudo recente demonstrou que as DCs CD8 α ⁺ apresentam um papel importante na tolerância central; no entanto, elas foram dispensáveis para a diferenciação de células Treg (Herbin *et al.* 2016). Apesar disso, um grupo de DCs Sirp α ⁺ foi capaz de auxiliar na produção de células Treg (Proietto *et al.* 2008; Herbin *et al.* 2016). Diante disso, avaliamos essas células nos camundongos, mas só observamos aumento relativo de DCs plasmocitoides (pDCs) em animais L272P-WASp. No entanto, essas células não foram vistas como importantes na geração de Treg (Proietto *et al.* 2008). Sendo assim, as mutações em WASp parecem não impactar a população de DCs tímicas envolvidas na geração de células tTreg.

Partimos então para avaliar o grupo de células B tímicas. No timo, essas células se diferenciam a partir de uma célula progenitora B220^{lo}CD43⁺Ig⁻, que ao sofrer indução por IL-7 e Flt3L se diferenciam para células B220^{hi}CD43-IgM⁺. Embora as células B tímicas sejam mais comuns na área medular tímica, também podem ser encontradas no córtex, totalizando 0,2% das células em um timo saudável. (Perera *et al.* 2013; Melchers 2015). Os nossos dados demonstram que há diminuição significativa dessas células no timo de camundongo WASp-KO, mas não nos outros grupos. Como é descrito, essas células podem ajudar na diferenciação e na sobrevivência de células Treg (Walters *et al.* 2014) e, sendo assim, a diminuição delas no timo do WASp-KO poderia ser um dos motivos pelos quais as células Treg nesses animais têm menor diferenciação. Ao identificar esses dados, tentamos isolar as células B tímicas e colocar em cultura com timócitos CD4 SP, juntamente com outros estímulos, e avaliar se a adição de células B tímicas era capaz de recuperar a diferenciação tímica de células Treg no camundongo WASp-KO. No entanto, por ser uma população muito pequena, mesmo usando artifícios para eliminar todas as células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, via separação magnética, o rendimento era muito reduzido para experimentos subsequentes. Além disso, seguimos o protocolo descrito por Lu e colaboradores (Lu *et al.* 2015) e não obtivemos os resultados sugeridos por eles. O nível de morte celular foi muito alto, não permitindo o prosseguimento do experimento. Ainda testamos outras concentrações e tempos, mas não obtivemos resultados reprodutíveis que justificassem a utilização de grande número de animais e persistência no protocolo (dados não mostrados). Embora não tenhamos tido êxito para avaliar o papel de células B tímicas na diferenciação das células Treg em camundongos WASp-KO diretamente, resolvemos explorar melhor esta relação, realizando a análise da razão entre Treg e células B tímicas. Os resultados nos indicam que há mais células Treg se diferenciando por linfócitos B presentes no timo no WASp-KO,

sugerindo que os baixos números de células B intratímicas no camundongo deficiente em WASp não são o motivo para o menor número de células Treg encontradas nos animais WASp.

A diferenciação *in vitro* de células Treg já é utilizada como metodologia para a transferência adotiva de células Treg em abordagens de terapia gênica (Golubovskaya e Wu 2016; Biswas *et al.* 2018). Tais metodologias utilizam células periféricas isoladas de pacientes que são colocadas em cultura com determinados estímulos e são reintroduzidas nos pacientes, ou também via estimulação com citocinas *in vivo*. Em alguns casos, a modificação genética, como edição gênica de bases, ou simplesmente adição de estímulos para uma melhor diferenciação/expansão dessas células são realizadas para que elas ajam como potenciais terapêuticos. Utilizando metodologias descritas para diferenciação de células Treg periféricas (Fantini *et al.* 2007; Schmidt *et al.* 2016), realizamos pequenas alterações para diferenciar *in vitro* células Treg tímicas. Colocamos os timócitos CD4 SP em cultura com diferentes combinações de estímulos: anti-CD3 e anti-CD28, para mimetizar a ativação do TCR, IL-2 recombinante e TGF- β recombinante, por diferentes períodos, como fatores de crescimento essenciais para a diferenciação dessas células. Esse tipo de protocolo não é bem estabelecido na literatura para células de origem tímica, portanto tivemos que padronizar todas as concentrações e tempos utilizados. A análise de todos os estímulos e tempos nos levou a concluir que, com 72h, esse conjunto de estímulos resultavam nas melhores quantidades de células vivas e diferenciadas. De forma relevante, os nossos dados revelam que as células derivadas do WASp-KO não conseguem se diferenciar na mesma proporção que os outros grupos no tempo observado. Esse resultado sugere um problema intrínseco nas células do WASp-KO que respondem de maneira inapropriada aos estímulos dados, culminando com uma diferenciação deficiente em até 72h. No entanto, não conseguimos ir adiante pois mais de 90% das células em cultura estavam mortas após esse período. De fato, a metodologia para diferenciação de células Treg a partir de células tímicas funcionou, mas experimentos futuros são necessários para verificar se essas células são funcionais e capazes de exercer seu papel na periferia. É sabido que células Treg isoladas na periferia e diferenciadas *in vitro* podem ser funcionais e capazes de desempenhar seus papéis no sistema imunitária de forma semelhante às células Treg geradas *in vivo*, pois várias terapias celulares utilizam esse modelo de expansão/diferenciação de células Treg (Golubovskaya e Wu 2016; Biswas *et al.* 2018). Sendo assim, acreditamos que existe um grande potencial das células Treg tímicas diferenciadas *in vitro* também apresentarem capacidade imunorregulatória.

Diante dos resultados apresentados até aqui, nos questionamos se as células provenientes do WASp-KO poderiam ter algum defeito na sinalização de IL-2 e TGF- β . Para avaliar essa questão, tratamos as células com as respectivas citocinas em uma cinética utilizando a concentração que utilizamos para diferenciação. Nós avaliamos a proteína fosforilada STAT5 (pSTAT5) para abordar a sinalização de IL-2. Essa proteína é translocada para o núcleo e está envolvida na indução da expressão do gene *Foxp3* (Burchill *et al.* 2007; Soper *et al.* 2007). De forma interessante, não observamos diferenças na sinalização entre os grupos, tendo o grupo WASp-KO resposta semelhante aos outros grupos, concluindo que as células conseguiam responder à IL-2 de maneira apropriada. Também avaliamos a proteína fosforilada SMAD2/3 (pSMAD2/3), que é um forte indutor de *Foxp3* (Chen e Konkel 2015), como abordagem da sinalização pelo TGF- β . Os resultados mais uma vez se mostraram surpreendentes, pois não observamos diferenças claras entre os grupos e principalmente no grupo WASp-KO. Dessa forma, concluímos que as prováveis alterações na diferenciação das células Treg em animais WASp-KO não estão relacionadas com problemas claros na via principal de sinalização intracelular por IL-2 e TGF- β . No entanto, os dados não descartam que outras vias possam estar alteradas. Além disso, a simples ativação com anti-CD3 e anti-CD28 pode estar prejudicada. Alguns resultados *ex vivo* de ativação celular demonstraram que as células do WASp-KO respondem menos a esses ativadores (dados não publicados). Dessa forma, é necessária uma avaliação de ativação de TCR nas células tTregs desses animais.

Nós também avaliamos a disponibilidade de IL-2 e TGF- β no timo dos animais. Utilizando um imunoenensaio multiplex de quantificação de citocinas do tipo TH1/TH2/TH17 chamada FirePlex (Abcam), não observamos diferenças significativas entre os animais WASp-KO e os animais controle, apesar de serem necessários mais experimentos para confirmação já que o número de amostras utilizado foi baixo. Os membros da superfamília TGF- β produzem sinais de grande influência na diferenciação de células T e na homeostase do timo. Elas são principalmente produzidas localmente por células estromais do timo, especialmente as TECS, mas elas também podem agir como fator parácrino, vindas de outros órgãos através da corrente sanguínea, ou, até mesmo, serem produzidas pelos próprios timócitos (Schluns *et al.* 1995; Heng *et al.* 2008; Loffredo *et al.* 2013). Os resultados mostram uma diminuição da disponibilidade de TGF- β 1 no timo dos animais WASp-KO. Esse resultado pode explicar a diminuição da diferenciação *in vivo* de células Treg no timo de camundongos WASp-KO. No entanto, esse dado não correlaciona com o defeito observado na diferenciação *in vitro*, onde o

fornecimento exógeno de quantidades idênticas de TGF- β para as células dos diferentes grupos resultam em respostas de diferenciação distintas.

Nesse sentido, é importante levar em consideração a demonstração prévia que WASp restringe a secreção de TGF- β 1 de maneira dependente de quinase da família Src e da pequena GTPase Cdc42 em plaquetas (Kim *et al.* 2013). Sendo assim, nos questionamos se a regulação intrínseca estaria interferindo no resultado da diferenciação *in vitro*. No entanto, não existem evidências de que isso também ocorra em linfócitos e células T. De fato, avaliar essas moléculas em células provenientes do WASp-KO seria interessante para estabelecer se a ausência de WASp afeta a regulação intrínseca ao TGF- β 1. Além disso, embora já tenha sido descrita deficiência na regulação da produção das células Treg *in vitro* (Maillard *et al.* 2007), outros ensaios funcionais não foram avaliados, como a análise das citocinas produzidas pelas células Treg tímicas, ou por outras células tímicas no contexto de ausência ou hiperexpressão de WASp.

Diante disso, nossa hipótese era de que as células Treg dos animais WASp-KO teriam algum problema funcional *in vitro*. Os eventos de adesão e de-adesão são processos migratórios fundamentais durante a diferenciação tímica (Savino *et al.* 2003). Durante a migração intratímica a força de interação dos eventos adesivos são cruciais para que uma célula não se diferencie bem. Utilizando a técnica microscópica de IRM, utilizamos a reflexão da célula para avaliar os eventos de adesão celular ao substrato. Esse tipo de análise parece ser mais fidedigno que experimentos clássicos de adesão em placa, pois quantifica de fato a área de contato de adesão por célula e estímulo. Apesar de termos observado diminuição da adesão das células CD4 SP WASp-KO em substrato com anti-CD3, não pudemos observar nenhuma diferença nos grupos na presença de fibronectina ou fibronectina com anti-CD3. Esse resultado sugere que os eventos adesivos permanecem funcionais, mesmo na ausência ou na hiperexpressão de WASp. Dessa forma, a adesão não parece estar comprometida durante a diferenciação das células CD4 SP em células Treg. No entanto, essas análises são bidimensionais, e a migração no timo ocorre em um ambiente tridimensional com muitas variáveis envolvidas. De fato, análises em matriz tridimensional podem ser interessantes para avaliar não somente a adesão como a migração das células Treg em ambiente similar ao que ocorre no timo.

Outro ensaio funcional muito importante que decidimos avaliar foi a proliferação celular. Conforme descrito anteriormente, a proliferação celular é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento e expansão tímica de células selecionadas (Schmitt *et al.* 2004; Ciofani

e Zúñiga-Pflücker 2007; Petrie e Zúñiga-Pflücker 2007). Assim, decidimos avaliar primeiramente a proliferação durante o ensaio de diferenciação de células Treg através da marcação com CFSE (Lyons e Parish 1994). Nossos dados demonstraram que as células provenientes dos animais com mutações do tipo XLN proliferavam mais rapidamente que o controle; de fato, em 48h já era possível ver nesses grupos a maior parte de células Foxp3⁺ em proliferação. Mas, em 72h, as células do WT conseguiam proliferar de forma semelhante às células provenientes dos animais com mutações do tipo XLN. É possível observar no grupo XLN um número interessante de células que não regulam positivamente o Foxp3 e continuam no estágio enriquecido em precursor (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻). Mesmo com muitas células “estacionadas” nesse estágio, a avaliação geral de todos os experimentos demonstra que as células provenientes dos animais com mutações do tipo XLN têm diferenciação comparável ao controle, ou seja, não havendo prejuízo à diferenciação. Apesar desses resultados em WT e XLN, um dado nos chamou atenção. De forma interessante, o grupo WASp-KO demonstrou uma proliferação deficiente, mesmo após 72h, tanto no grupo enriquecido em precursor quanto no grupo de células Treg. Esse resultado reforça que a ausência de WASp tem papel fundamental na diferenciação, proliferação e homeostasia de células Treg. De fato, já foi demonstrado que a deficiência em WASp e N-WASp estão relacionados com alterações na proliferação de timócitos em estágio DN3 (Cotta-de-Almeida *et al.*, 2007) e de células B periféricas (Westerberg *et al.* 2012). Esses achados indicam que o problema observado na diferenciação *in vitro* pode estar relacionado à ausência de WASp que impacta a proliferação das células Treg no timo dos animais WASp-KO.

As quinases dependentes de ciclina (CDK) são peças principais na regulação da progressão no ciclo celular. E de modo interessante, Foxp3 tem algumas regiões para a ligação de CDK, sendo a CDK2 um regulador negativo da função de Foxp3 por fosforilação. A CDK2 pode cortar 4 diferentes motivos, ou regiões, na porção repressora N-terminal do Foxp3, sendo essas regiões necessária para a repressão de IL-2, importante função de Foxp3. Sendo assim, foi demonstrado que a inibição de CDK2 com roscovitina aumentou a síntese de Foxp3 e CD25 (Chunder *et al.* 2012; Morawski *et al.* 2013). Esses dados nos levam à hipótese de que os animais WASp-KO tenham níveis aumentados de CDK2, uma desregulação que poderia desestabilizar o ciclo celular e a diferenciação concomitante de células Treg. Nesse sentido, será importante investigar se WASp poderia regular a via de CDK2, apesar de um estudo prévio mostrar que N-WASp e CDK2 estão em vias de sinalização distintas (Prehoda e Lim 2002).

Para avaliar se o TGF- β teve alguma relação com a menor diferenciação e proliferação de células Treg em camundongos WASp-KO, usamos diferentes concentrações de TGF- β e avaliamos a diferenciação contra diferentes estímulos. Utilizando o tempo de 36h como o melhor tempo para avaliação dessa sinalização, observamos que quanto mais TGF- β menor a diferenciação observada em camundongos WASp-KO, demonstrando um bloqueio em altas concentrações. Um dado muito interessante desse conjunto de dados é a observação de que as células dos grupos WT, I296T-WASp e L272P-WASp são capazes de começar a diferenciação em células Treg mesmo na ausência de IL-2, demonstrando que essa citocina não seja fundamental para diferenciação *in vitro* nesses grupos. Outra explicação plausível seria que células tímicas de animais WT e com mutações com ganho de função são capazes de produzir alguma IL-2 e desta forma suprir a sinalização mínima via IL-2 que parece indispensável para a diferenciação de Tregs. No entanto, no caso das células derivadas dos animais WASp-KO, a IL-2 parece ter um papel fundamental. Neste caso, podemos propor que a capacidade intrínseca de sinalização para diferenciação de Treg, assim como a necessidade de IL-2 deve ser diferente na ausência de WASp.

A importância do TGF- β já foi demonstrado diversas vezes, tendo papel na diferenciação e na função de células Treg (Ouyang *et al.* 2010; Freudenberg *et al.* 2018). Um estudo interessante, no entanto, demonstrou que as células diferenciadas *in vitro* com TGF- β e IL-2 (iTreg) apresentam especificidade para antígenos diferentes das células nTreg. Além disso, a citocina IL-6 é capaz de converter células tTreg em TH17, mas as células diferenciadas com IL-2 e TGF- β *in vitro* são resistentes a essa citocina, sendo capazes de manter a função supressora em ambientes inflamatórios (Horwitz *et al.* 2008). Dessa forma, é importante salientar que as células que diferenciamos *in vitro* podem não apresentar função igual às células *in vivo*.

Em resumo, os animais WASp-KO apresentam diminuição de células Treg tanto *in vivo* quanto na população de células diferenciadas *in vitro*. Esses dados nos levam a postular que essas diferenças consequentes à ausência de WASp modifica as vias de proliferação e diferenciação destas células.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações de ganho-de-função e perda-de-função em WASp levam a duas síndromes distintas com patologias específicas. A WAS, que ocorre quando há perda parcial ou total da proteína, relacionada à uma síndrome rara que acomete meninos em uma taxa de incidência de 1 a 10 em um milhão de nascidos vivos, gera distúrbios de imunodeficiência e cursam com quadros de imunodesregulação. Particularmente, foi demonstrado que a colite tem relação com a disfunção de células Treg em animais nocaute (Maillard *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2007) para a proteína. A XLN é uma doença rara (<1 caso por milhão) onde ocorre ativação constitutiva da proteína WASp levando a severa neutropenia e monocitopenia. Pouco se sabe sobre essa síndrome, principalmente no que tange o timo, órgão responsável pelo desenvolvimento de linfócitos T. Dessa forma, o presente estudo buscou entender o papel de WASp na diferenciação de células Treg tímicas, assim como avaliar as alterações tímicas em camundongos com mutações do tipo XLN, correlacionando com animais controle saudáveis e WASp-KO.

Nossos achados estão sumarizados na Figura 29 e demonstram que os animais I296T-WASp apresentam pequena diminuição do timo e do número total de timócitos e essa diminuição ocorre dentro da subpopulação de timócitos CD4 SP (**Figura 28A**). No entanto, os animais *knock-in* com a mutação L272P não apresentam o mesmo fenótipo, demonstrando que cada mutação pode ocasionar diferentes alterações tímicas. Em relação ao timo do WASp-KO, além da diminuição de células Treg, observamos diminuição de células B tímicas (**Figura 28A**) que, apesar de estarem implicadas na geração de células Treg, precisam ser melhor investigadas para entender a relação empregada.

Ao avaliarmos a diferenciação de células Treg *in vitro* na presença de estímulo apropriado, observamos que as células dos animais WASp-KO não se diferenciam como as dos outros grupos. Nossos achados indicam que o problema está relacionado à proliferação ineficiente, a uma desregulação em resposta à citocina TGF- β e à maior suscetibilidade a morte dos timócitos em cultura (**Figura 28B**). As células dos animais com mutações do tipo XLN apresentam uma boa diferenciação, com uma rápida proliferação celular e mesmo com um acúmulo de células no estágio enriquecido em precursor, as células se diferenciam como as do controle. Estas alterações são certamente decorrentes de defeitos intrínsecos na resposta à sinalização trans-membranar, assim como possivelmente na produção de fatores autócrinos que influenciam a diferenciação celular. Entender esses mecanismos ajudaria a entender melhor a diferenciação de células tTreg e contribuir para o desenvolvimento de protocolos de geração das mesmas para efeitos terapêuticos.

A mutação em I296T-WASp apesar de apresentar uma redução numérica de timócitos CD4 SP, as células Treg se diferenciam normalmente *in vitro*, demonstrando que o problema provavelmente se dá por uma diminuição das células CD4 SP. E o resultado mais interessante é de que WASp tem papel fundamental na proliferação e diferenciação, e sua ausência prejudica esses eventos no timo. Dessa forma, esse trabalho traz novidades na biologia celular do timo com alterações de WASp, assim como novos conhecimentos sobre as deficiências promovidas pela ausência ou hiperexpressão dessa proteína na biologia das células Treg.

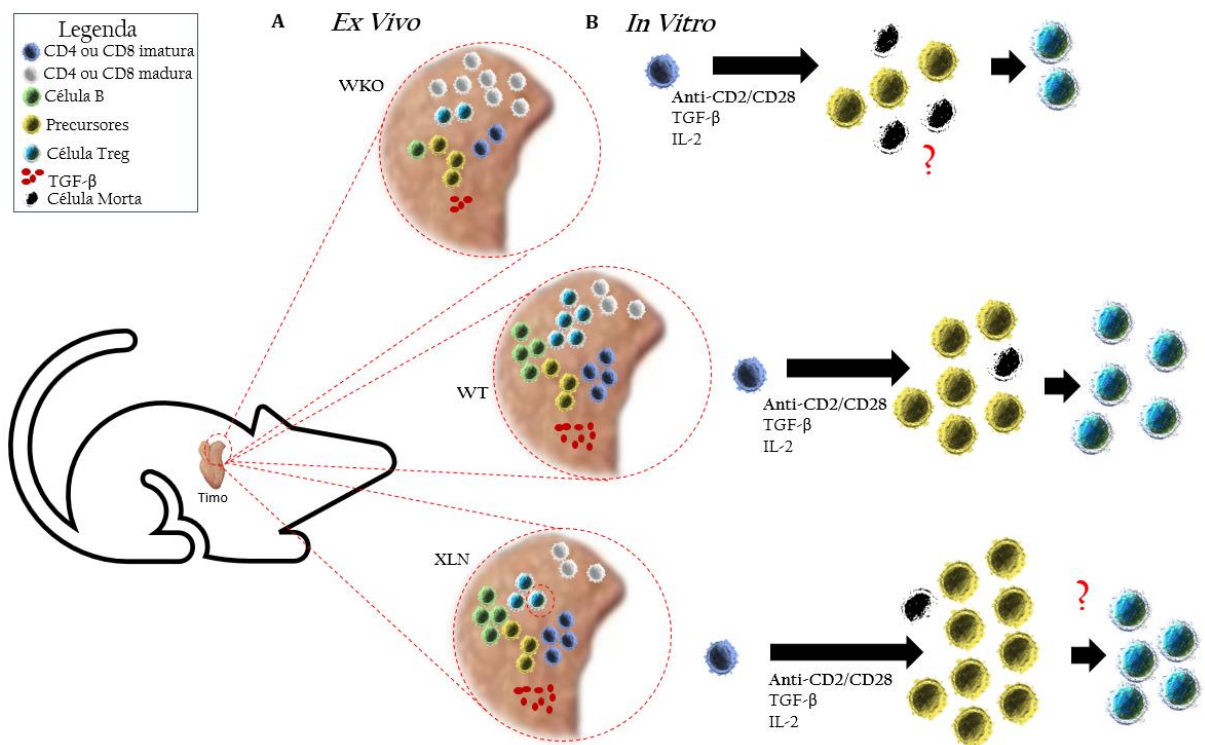


Figura 28 - **Resumo.** Resultados *ex vivo* (A) demonstram diminuição no número de células CD4 SP em camundongos I296T-WASp, assim como diminuição de células Treg em camundongos WASp-KO e I296T-WASp. Diminuição qualitativa de TGF-β1 no parênquima tímico do camundongo WASp-KO. Aumento de células mortas nos animais WASp-KO. Diminuição de células B tímicas nos camundongos WASp-KO. Os resultados *in vitro* (B) demonstram diminuição da diferenciação e proliferação de células provenientes de animais WASp-KO e aumento da morte celular. Os animais com mutações do tipo XLN parecem proliferar mais e ter um acúmulo de células no estágio de precursor, mas no final têm números de Treg semelhantes ao controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Benoist C, Bluestone J a, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* [Internet]. 2013;14(4):307–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2554%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/ni.2554>
- Adriani M, Aoki J, Horai R, Thornton AM, Konno A, Kirby M, et al. Impaired in vitro regulatory T cell function associated with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol*. 2007;124(1):41–8.
- Adriani M, Jones K a., Uchiyama T, Kirby MR, Silvin C, Anderson SM, et al. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells. *Blood*. 2011;117(24):6608–11.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8).
- Aldrich R, Steinberg A, Campbell D. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*. 1954;13:133–9.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15396–401.
- Almeida ARM, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of Peripheral CD4 + T Cells: IL-2R α and IL-2 Shape a Population of Regulatory Cells That Controls CD4 + T Cell Numbers . *J Immunol*. 2002;169(9):4850–60.
- Amado IF, Berges J, Luther RJ, Mailhé M-P, Garcia S, Bandeira A, et al. IL-2 coordinates IL-2-producing and regulatory T cell interplay. *J Exp Med* [Internet]. 2013;210(12):2707–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3832933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood*. 2006;108(7):2182–9.
- Aschenbrenner K, D’Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, et al. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. 2007;8(4):351–8.
- Baecher-Allan C, Brown J a, Freeman GJ, Hafler D a. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245–53.
- Baine I, Basu S, Ames R, Sellers RS, Macian F. Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(3):1008–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3558938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Baptista MAP, Keszei M, Oliveira M, Sunahara KKS, Andersson J, Dahlberg CIM, et al. Deletion of Wiskott-Aldrich syndrome protein triggers Rac2 activity and increased cross-presentation by dendritic cells. *Nat Commun*. 2016;7.

- Becker-Herman S, Meyer-Bahlburg A, Schwartz M a., Jackson SW, Hudkins KL, Liu C, et al. WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *J Exp Med*. 2011;208(10):2033–42.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
- Beyer M, Huehn J. Epigenetic orchestration of thymic T reg cell development. *Nat Immunol* [Internet]. 2017;18(2):144–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3660>
- Biswas M, Kumar SRP, Terhorst C, Herzog RW. Gene therapy with regulatory T cells: A beneficial alliance. *Front Immunol*. 2018;9(MAR).
- Von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: Receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol*. 2004;84(1977):201–38.
- Bollyky PL, Falk B a, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3⁺ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol*. 2009;183(4):2232–41.
- Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 SUPPL. 2):460–75.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Mitri D Di, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225–33.
- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Frontline: Neuropilin-1: A surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(3):623–30.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild K a, Paepfer B, Clark LB, Yasayko S a, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68–73.
- Buhlmann JE, Elkin SK, Sharpe AH. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol*. 2003;170(11):5421–8.
- Burchill M a, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar M a. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* [Internet]. 2007;178(1):280–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182565> <http://www.jimmunol.org/content/178/1/280.full.pdf>
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio C-WJ, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* [Internet]. 2008;28(1):112–21. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761307005870>
- Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, Thrasher AJ. Maturation of DC Is Associated with Changes in Motile Characteristics and Adherence. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004;57(2):118–32.
- Burns SO, Killock DJ, Moulding DA, Metelo J, Nunes J, Taylor RR, et al. A congenital activating mutant of WASp causes altered plasma membrane topography and adhesion under flow in lymphocytes. *Blood*. 2010;115(26):5355–65.

- Burrell B, Nakayama Y, Xu J, CC B, Bromberg J. Treg induction, migration, and function in transplantation. *J Immunol*. 2012;189(10):4705–11.
- Bystry RS, Aluvihare V, Welch K a, Kallikourdis M, Betz a G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1126–32.
- Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2000;30(6):1538–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898488>
- Chatila T a., Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000;106(12):75–81.
- Chen W, Konkel J. The development of thymic Foxp3+ regulatory T cells: TGFβ matters. *Eur J Immunol*. 2015;(C):2005–8.
- Chunder N, Wang L, Chen C, Hancock WW, Wells AD. Cyclin-Dependent Kinase 2 Controls Peripheral Immune Tolerance. *J Immunol*. 2012;189(12):5659–66.
- Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. janeiro de 2007 [citado 4 de junho de 2013];23:463–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506693>
- Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol*. 1999;162(5):2546–54.
- Cotta-de-Almeida V, DuprÃ© L, Guipouy D, Vasconcelos Z. Signal Integration during T Lymphocyte Activation and Function: Lessons from the Wiskottâ€“Aldrich Syndrome. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(February):1–11. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00047/abstract>
- Cotta-de-Almeida V, Westerberg L, Maillard MH, Onaldi D, Wachtel H, Meelu P, et al. Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 25 de setembro de 2007;104(39):15424–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3350364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: an anatomist’s view of the immune system. *Trends Immunol* [Internet]. abril de 2004 [citado 25 de maio de 2013];25(4):210–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039048>
- Croft M. The TNF Family in T cell Differentiation and Function – Unanswered Questions and Future Directions. *Semin Immunol*. 2015;26(3):183–90.
- Crompton T, Moore M, MacDonald HR, Malissen B. Double-negative thymocyte subsets in CD3?? chain-deficient mice: Absence of HSA+CD44-CD25- cells. *Eur J Immunol*. 1994;24(8):1903–7.
- Curotto de Lafaille M a., Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* [Internet]. 2009;30(5):626–35. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>
- Dale D., Link, D C. The Many Causes of Severe Congenital Neutropenia David. *N Engl J Med*. 2009;27(4):339–51.

- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* [Internet]. 2007;204(6):1257–65. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20062512>
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* [Internet]. 1994;78(4):635–44. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8069912&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/0D88F1B1-FB6F-4717-B379-7DB9578A2E39>
- Devriendt K, Kim a S, Mathijs G, Frints SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet*. 2001;27(3):313–7.
- Ding Y, Xu J, Bromberg J. T regulatory cell migration during an immune response. *Trends Immunol*. 2012;33(4):174–80.
- Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich ARM, Ohlen C, et al. Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*. 2004;20(3):293–303.
- Drennan MB, Elewaut D, Hogquist K a. Thymic emigration: Sphingosine-1-phosphate receptor-1-dependent models and beyond. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):925–30.
- Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday a C. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity*. 1994;1(2):83–93.
- van Ewijk W, Wang B, Hollander G, Kawamoto H, Spanopoulou E, Itoi M, et al. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol* [Internet]. fevereiro de 1999;11(1):57–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950752>
- Fantini MC, Dominitzki S, Rizzo A, Neurath MF, Becker C. In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1789–94.
- Feng C, Woodside KJ, Vance BA, El-Khoury D, Canelles M, Lee J, et al. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol*. 2002;14(6):535–44.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):47–59.
- Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med*. 2005a;202(7):901–6.
- Fontenot JD, Gavin M a, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330–6.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*. 2005b;22(3):329–41.
- Francisco L, SAge P, Sharpe A. PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011;236:219–42.
- Franckaert D, Dooley J, Roos E, Floess S, Huehn J, Luche H, et al. Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3+ and Foxp3– T cells.

- Immunol Cell Biol [Internet]. 2014;93(4):417–23. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2014.108>
- Freudenberg K, Lindner N, Dohnke S, Garbe AI, Schallenberg S, Kretschmer K. Critical role of TGF- β and IL-2 receptor signaling in Foxp3 induction by an inhibitor of DNA methylation. *Front Immunol*. 2018;9(FEB):1–13.
- Frommer F, Waisman A. B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4⁺ T cells. *PLoS One*. 2010;5(10):1–9.
- Furtado GC, Curotto de Lafaille M a, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*. 2002;196(6):851–7.
- Gallego MD, Santamaría M, Peña J, Molina IJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood*. 1997;90(8):3089–97.
- Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adh Migr* [Internet]. 1 de julho de 2010 [citado 4 de junho de 2013];4(3):382–90. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/celladhesion/article/11789/>
- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723–37.
- Getnet D, Grosso J, Goldberg M, Harris T, Yen H, Bruno T, et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Mol Immunol*. 2010;47(7–18):1595–600.
- Gies V, Guffroy A, Danion F, Billaud P, Keime C, Fauny JD, et al. B cells differentiate in human thymus and express AIRE. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):1049-1052.e12.
- Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2016;8(3).
- Gray MJ, Wey JS, Belcheva A, McCarty MF, Trevino JG, Evans DB, et al. Neuropilin-1 suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors. *Cancer Res*. 2005;65(9):3664–70.
- Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, et al. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *J Immunol*. 2009;183(7):4360–70.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21(4):589–601.
- Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int Immunol*. 2008;20(3):307–15.
- Heng TSP, Painter MW, Elpek K, Lukacs-Kornek V, Mauermann N, Turley SJ, et al. The immunological genome project: Networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1091–4.
- Herbin O, Bonito AJ, Jeong S, Weinstein EG, Rahman AH, Xiong H, et al. Medullary Thymic Epithelial Cells and CD8 α ⁺ Dendritic Cells coordinately regulate central tolerance but

- CD8 α ⁺ cells are Dispensable for Thymic Regulatory T cell production. *J Autoimmun.* 2016;75:141–9.
- Hinterberger M, Aichinger M, da Costa OP, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(6):512–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1874>
- Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS.* 2004;112(10):629–41.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057–61.
- Horwitz D a., Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3+CD4+ CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 2008;29(9):429–35.
- Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol.* 1995;25(9):2718–21.
- Humblet-baron S, Sather B, Anover S, Becker-herman S, Kasprowicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest.* 2007a;117(2):407–18.
- Humblet-baron S, Sather B, Anover S, Becker-herman S, Kasprowicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. 2007b;117(2).
- Iellem a, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 2001;194(6):847–53.
- Iizuka-Koga M, Nakatsukasa H, Ito M, Akanuma T, Lu Q, Yoshimura A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun.* 2017;83:113–21.
- Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Gene.* 2004;103(2):456–64.
- Imai K, Nonoyama S, Ochs HD. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2003;3(6):427–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612666>
- Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, et al. CCR7 with S1P 1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3 + regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol* [Internet]. 2012;180(1):199–208. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.027>
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Simizu J, Otsuka F, et al. CD25 +CD4+ Naturally Anergic and Thymus and Autoimmunity: Production of Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J Immunol.* 1999;162:5317–26.
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):531–64.

- Jurberg AD, Vasconcelos-Fontes L, Cotta-de-Almeida V. A Tale from TGF- β Superfamily for Thymus Ontogeny and Function. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(August):1–15. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00442/abstract>
- Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M, Nishioka T, Takahashi T, Sakaguchi S, et al. Costimulation via Glucocorticoid-Induced TNF Receptor in Both Conventional and CD25+ Regulatory CD4+ T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2004;172(12):7306–14. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.12.7306>
- Kenney D, Donnel E, Peterson J, Rosen F. Morphological abnormalities in the lymphocyte of Patients with the Wiskott-Aldrich. *Blood*. 1986;68(6):1329–32.
- Keszei M, Record J, Kritikou JS, Wurzer H, Geyer C, Thiemann M, et al. Constitutive activation of WASp in X-linked neutropenia renders neutrophils hyperactive. *J Clin Invest*. 2018;128(9):4115–31.
- Khaldoyanidi S, Denzel a, Zöller M. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol*. 1996;60(5):579–92.
- Khattari R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337–42.
- Kim a S, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu G a, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*. 2000;404(6774):151–8.
- Kim H, Falet H, Hoffmeister KM, Hartwig JH. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) controls the delivery of platelet transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem*. 2013;288(48):34352–63.
- Kishore M, Cheung KCP, Fu H, Bonacina F, Wang G, Coe D, et al. Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity* [Internet]. 2017;47(5):875–889.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.017>
- Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenberg A, Hirota K, Kawakami R, et al. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol*. 2017;18(2):173–83.
- Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur J Immunol* [Internet]. 2015;45(1):11–6. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201444577>
- Klein C, Nguyen D, Liu CH, Mizoguchi A, Bhan AK, Miki H, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: Rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 2003;101(6):2159–66.
- Kleinewietfeld M, Kleinewietfeld M, Puentes F, Puentes F, Borsellino G, Borsellino G, et al. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25. *Animals*. 2005;105(7):2877–86.
- Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* [Internet]. 2014;20(1):62–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362934>
- Kumar P, Marinelarena A, Raghunathan D, Ragothaman VK, Saini S, Bhattacharya P, et al. Critical role of OX40 signaling in the TCR-independent phase of human and murine thymic Treg generation. *Cell Mol Immunol*. 2018;(December 2017):1–16.

- de la Fuente M a, Sasahara Y, Calamito M, Antón IM, Elkhali A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):926–31.
- Le PT, Singer KH. Human thymic epithelial cells: adhesion molecules and cytokine production. *Int J Clin Lab Res* [Internet]. 1993;23(2):56–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8518415>
- Lee H, Hsieh C. Rare development of Foxp3⁺ thymocytes in the CD4⁺CD8⁺ subset. *J Immunol*. 2009;183(4):2261–6.
- Leventhal DS, Gilmore DC, Berger JM, Nishi S, Lee V, Kline DE, et al. Dendritic cells coordinate the development and homeostasis of organ-specific regulatory T cells. *Immunity*. 2016;44(4):847–59.
- Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*. 2002;196(10):1335–46.
- Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*. 2008;180(9):5916–26.
- Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell – driven B cell responses. *J Clin Invest*. 2004;114(11):1640–9.
- Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 2007;8(4):359–68.
- Liu T, Soong L, Liu G, König R, Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4⁺ Treg cells. *Biol Direct* [Internet]. 2009;4:40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liu W. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* [Internet]. 2006;203(7):1701–11. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20060772>
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(6):632–40.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* [Internet]. 2013;153(4):828–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.015>
- Lu F-T, Yang W, Wang Y-H, Ma H-D, Tang W, Yang J-B, et al. Thymic B cells promote thymus-derived regulatory T cell development and proliferation. *J Autoimmun* [Internet]. 2015;61:62–72. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841115000797>
- Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz D a. Characterization of Protective Human

- CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells Generated with IL-2, TGF- β and Retinoic Acid. *PLoS One*. 2010;5(12):1–12.
- Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;171(1):131–7.
- M Y, C L, D D, JM G. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*. 2012;190(7):995–1004.
- Mahmud S a, Manlove LS, Schmitz HM, Xing Y, Wang Y, Owen DL, et al. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2014;15(5):473–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633226>
- Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):381–91.
- Mailloux AW, Young MRI. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit Rev Immunol*. 2010;30(5):435–47.
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med*. 2003;197(1):111–9.
- Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):369–80.
- Marshall D, Sinclair C, Tung S, Seddon B. Differential Requirement for IL-2 and IL-15 during Bifurcated Development of Thymic Regulatory T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2014;193(11):5525–33. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402144>
- Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007;7(2):144–54. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2023>
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo C a., Young D a., Shevach EM, Collins M, et al. CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;16(2):311–23.
- Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2203–10.
- Melichar HJ, Ross JO, Taylor KT, Robey E a. Stable Interactions and Sustained TCR Signaling Characterize Thymocyte-Thymocyte Interactions that Support Negative Selection. *J Immunol* [Internet]. 2014;194(3):1057–61. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400169>
- Miki H, Miura K, Takenawa T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15(19):5326–35.
- Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*. 1998;391(6662):93–6.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and

- differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899–911.
- Mohammed Ali HH, Drela N. Role of thymic B cells in the development of thymus-derived regulatory T cell in vitro. *Immunol Lett* [Internet]. 2017;185:56–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.03.007>
- Molina IJ, Kenney DM, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med*. 1992;176(3):867–74.
- Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* [Internet]. 1993;151(8):4383–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409409>
- Moratto D, Giliani S, Bonfim C, Mazzolari E, Fischer A, Ochs HD, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 Wiskott-Aldrich Syndrome patients treated by hematopoietic cell transplantation between 1980 – 2009 : an international collaborative study. *Transplantation*. 2011;118(6):1675–85.
- Morawski PA, Mehra P, Chen C, Bhatti T, Wells AD. Foxp3 protein stability is regulated by cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem*. 2013;288(34):24494–502.
- Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol*. 2012;13(2):121–8.
- Moulding DA, Blundell MP, Spiller DG, White MRH, Cory GO, Calle Y, et al. Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J Exp Med*. 2007;204(9):2213–24.
- Mullen C a, Anderson KD, Blaese RM. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood*. 1993;82(10):2961–6.
- Muto S, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, et al. Clinical significance of expanded Foxp3⁺ Helios⁻ regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2015;47:2082–90. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2015.3196>
- Nakayama T, Kasprovicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, et al. The Generation of Mature, Single-Positive Thymocytes In Vivo Is Dysregulated by CD69 Blockade or Overexpression. *J Immunol*. 2002;168(1):87–94.
- Nguyen DD, Maillard MH, Cotta-de-almeida V, Klein C, Fuss I, Nagler C, et al. Lymphocyte-dependent and TH2 cytokine-associated colitis in mice deficient in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1188–97.
- Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the Gonad after neonatal thymectomy in mic. *Science*. 1969;166:753–5.
- Nishizuka Y, Sakakura T, Tanaka Y. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology*. 1971;89(3):886–93.
- Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, Aria CD, Gandellini F, Ravelli C, et al. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia Brief report Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*. 2002;99(6):2268–9.

- Nunes-Cabaço H, Caramalho Í, Sepúlveda N, Sousa AE. Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *Eur J Immunol.* 2011;41(12):3604–14.
- Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol.* 2007;179(6):3578–87.
- Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, et al. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;174(11):6993–7005.
- Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:725–38; quiz 739.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* [Internet]. 21 de março de 2013 [citado 24 de maio de 2013];38(3):414–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521883>
- Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: Roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010;32(2):95–106.
- Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2003;198(2):259–66.
- Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10113–8.
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* [Internet]. 2010;32(5):642–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.012>
- Pandiyani P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353–62.
- Park H, Dovas A, Lastrucci C, Cougoule C, Chem JB. Cell Biology : Tyrosine Phosphorylation of WASP by Hck Regulates Macrophage Function. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7897–906.
- Park JY, Kob M, Prodeus a. P, Rosen FS, Shcherbina a., Remold-O'Donnell E. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: Possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):104–10.
- Passos GA, Mendes-da-Cruz DA, Oliveira EH. The Thymic Orchestration Involving Aire, miRNAs, and Cell–Cell Interactions during the Induction of Central Tolerance. *Front Immunol* [Internet]. 2015;6(July):1–7. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00352/abstract>
- Perera J, Meng L, Meng F, Huang H. Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(42):17011–6. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1313001110>
- Perry JSA, Russler-Germain E V., Zhou YW, Purtha W, Cooper ML, Choi J, et al. CD36 Mediates Cell-Surface Antigens to Promote Thymic Development of the Regulatory T

- Cell Receptor Repertoire and Allo-tolerance. *Immunity*. 2018;48(5):923-936.e4.
- Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser a, Crispe IN, Shortman K. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med*. 1993;178(2):615–22.
- Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* [Internet]. janeiro de 2007 [citado 28 de fevereiro de 2013];25:649–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291187>
- Piccirillo C a, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*. 2002;196(2):237–46.
- Prehoda KE, Lim WA. How signaling proteins integrate multiple inputs: A comparison of N-WASP and Cdk2. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(2):149–54.
- Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D’Amico A, Steptoe RJ, et al. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19869–74.
- Puklin-Faucher E, Sheetz MP. The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 2):179–86.
- Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol*. 2006;176(5):2808–16.
- Recher M, Burns SO, De La Fuente M a., Volpi S, Dahlberg C, Walter JE, et al. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood*. 2012;119(12):2819–28.
- Redecke V, Chaturvedi V, Kuriakose J, Häcker H. SHARPIN controls the development of regulatory T cells. *Immunology*. 2016;148(2):216–26.
- Reicher B, Joseph N, David a., Pauker MH, Perl O, Barda-Saad M. Ubiquitylation-Dependent Negative Regulation of WASp Is Essential for Actin Cytoskeleton Dynamics. *Mol Cell Biol*. 2012;32(15):3153–63.
- Rengan R, Ochs HD, Sweet LI, Keil ML, Gunning WT, Lachant N a, et al. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood*. 2000;95(4):1283–92.
- Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer A-C, Abramson J, et al. Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue [Internet]. 1º ed. Vol. 136, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117315001465>
- Rosen F, Cooper M, Wedgwood R. The primary immunodeficiencies. *Med Prog*. 1995;333(7):431–40.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6(4):345–52.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained

- by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151–64.
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe a, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431–40.
- Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* [Internet]. 2008;28(3):402–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.012>
- Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* [Internet]. 2007;204(6):1335–47. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20070081>
- Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz D a, et al. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res* [Internet]. agosto de 2003;36(8):1015–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886455>
- Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc* [Internet]. novembro de 2010 [citado 22 de maio de 2013];69(4):636–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860857>
- Savino W, Mendes-da-Cruz D, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* [Internet]. junho de 2002;23(6):305–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072370>
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015; Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2015.168>
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc ...* [Internet]. 2004 [citado 4 de junho de 2013];75(June):951–61. Available at: <http://www.jleukbio.org/content/75/6/951.short>
- Schluns KS, Grutkoski PS, Cook JE, Engelmann GL, Le PT. Human thymic epithelial cells produce TGF- β 3 and express TGF- β receptors. *Int Immunol*. 1995;7(10):1681–90.
- Schmetterer KG, Neunkirchner a., Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J*. 2012;26(6):2253–76.
- Schmidt A, Éliás S, Joshi RN, Tegnér J. In vitro differentiation of human CD4+FOXP3+ induced regulatory T cells (iTregs) from naïve CD4+ T cells using a TGF- β -containing protocol. *J Vis Exp*. 2016;2016(118):1–10.
- Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med*. 2004;200(4):469–79.

- Schneider M a, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007;204(4):735–45.
- Schuster M, Plaza-Sirvent C, Visekruna A, Huehn J, Schmitz I. Generation of Foxp3+CD25–Regulatory T-Cell Precursors Requires c-Rel and IκBNS. *Front Immunol.* 2019;10(July):1–6.
- Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* [Internet]. 2009;30(5):636–45. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3(2):135–42.
- Singer A, Adoro S, Park J. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4/CD8 lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 2009;8(10):788–801.
- Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:905–29.
- Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, Cohen P, Khan W, Liu CH, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity.* 1998;9:81–91.
- Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith M a. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171(10):5042–50.
- So T, Seung-Woo L, Croft M. Immune Regulation and Control of Regulatory T cells by OX40 and 41BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:253–62.
- Soper DM, Kasprovicz DJ, Ziegler SF. IL-2R?? links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1817–26.
- Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc London.* 2001;356:609–16.
- Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol.* 2006;18(8):1197–209.
- Sullivan KE, Mullen C a., Blaese RM, Winkelstein J a. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125(6 I):876–85.
- Sun X, Wei Y, Lee PP, Ren B, Liu C. The role of WASp in T cells and B cells. *Cell Immunol* [Internet]. 2019;341(January):103919. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.04.007>
- Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. Vol. 372, *Nature.* 1994. p. 100–3.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med.* 2003;198(6):889–901.
- Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem.* 2002;277(10):7766–75.

- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*. 2005;6(2):152–62.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998;10(12):1969–80.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303–10.
- Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, et al. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2015;67(6):1491–502. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.39091>
- Teh CE, Lalaoui N, Jain R, Policheni AN, Heinlein M, Alvarez-Diaz S, et al. Linear ubiquitin chain assembly complex coordinates late thymic T-cell differentiation and regulatory T-cell homeostasis. *Nat Commun*. 2016;7.
- Thornton a M, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287–96.
- Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo C a, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*. 2004;172(11):6519–23.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(7):3433–41. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0904028>
- Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(3):182–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2724>
- Tuovinen H, Pekkarinen PT, Rossi LH, Mattila I, Arstila TP. The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. *Immunol Cell Biol*. 2008;86(6):523–9.
- Vasconcelos-Fontes L, Ferreira-Reis R, Ortigão-Farias JR, Jurberg AD, Cotta-de-Almeida V. Development of Thymic Regulatory T Lymphocytes. *Thymus Transcr Cell Biol*. 2019;255–72.
- Verhagen J, Wraith D. Comment on “Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells”. *J Immunol*. 2010;184:3433–41.
- Villa a, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnoni D, et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet*. 1995;9(4):414–7.
- Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R. Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Receptors. *Intern Rev Immunol*. 1998;16:205–26.

- Walker LSK, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*. 2003;198(2):249–58.
- Walters SN, Webster KE, Daley S, Grey ST. A Role for Intrathymic B Cells in the Generation of Natural Regulatory T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2014;193(1):170–6. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302519>
- Weist BM, Kurd N, Boussier J, Chan SW, Robey E a. Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;(May). Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3171>
- Westerberg L, Larsson M, Hardy SJ, Fernández C, Thrasher AJ, Ferna C. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Immunobiology*. 2005;105(3):1144–52.
- Westerberg LS, Dahlberg C, Baptista M, Moran CJ, Detre C, Keszei M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for peripheral B-cell development and function. *Blood*. 2012;119(17):3966–74.
- Westerberg LS, Meelu P, Baptista M, Eston MA, Adamovich DA, Cotta-de-Almeida V, et al. Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207(6):1145–52. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20091245>
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18–20.
- Wong WF, Kohu K, Chiba T, Sato T, Satake M. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: The role of Runx. *Immunology*. 2011;132(2):157–64.
- Wu L. T lineage progenitors: The earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(2):121–6.
- Xing Y, Hogquist K a. T-Cell tolerance: Central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:1–15.
- Xu H, Liew LN, Kuo IC, Huang CH, Goh DLM, Chua KY. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology*. 2008;125(2):218–28.
- Xu L, Kitani A, Stuelten C, McGrady G, Fuss I, Strober W. Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I. *Immunity* [Internet]. 2010;33(3):313–25. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310003249>
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16(11):1643–4656.
- Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Ogata K, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, et al. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol*. 2006;7(1):67–75.
- Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the

migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* [Internet]. 2008;181(12):8391–401. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2752441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park B V., Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios + regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7(3):1–10.

Zhang Q, Cui F, Fang L, Hong J, Zheng B, Zhang JZ. TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol* [Internet]. 2013;85–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243069>

Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz D a. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*. 2007;178(4):2018–27.

Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz D a. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol*. 2006;176(6):3321–9.

Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-hogan M, Mottram P, et al. Bone Marrow Is a Reservoir for CD4 + CD25 + Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12 / CXCR4 Signals Bone Marrow Is a Reservoir for CD4 γ CD25 γ Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12 / CXCR4 Signals. *Cancer Res*. 2004;64:8451–5.

