

Taccyanna Mikulski Ali

**Perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -
catenina em timócitos e linfócitos T CD4+ de
camundongos BALB/c**

São Paulo
2015

Taccyanna Mikulski Ali

**Perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -
catenina em timócitos e linfócitos T CD4+ de
camundongos BALB/c**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor desde que citada a fonte

Ali, Taccyanna Mikulski

Perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos e linfócitos T CD4+ de camundongos BALB/c / Taccyanna Mikulski Ali. -- São Paulo, 2015.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Edecio Cunha-Neto.

Descritores: 1.Proteína HIG2 2.Via de sinalização Wnt 3. Beta catenina
4.Timócitos 5.Linfócitos T CD4 positivos 6.Expressão gênica 7.Homeostase
8.Camundongos

USP/FM/DBD-223/15

Dedico este trabalho a Deus e minha família

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, por ter me dado forças e condições para realizar este trabalho;

A minha família e principalmente aos meus pais, Alberto e Marlene, por sempre acreditarem em mim, me darem base e apoio durante esta jornada e ao meu namorado Ivan, por toda a paciência e compreensão durante esta etapa;

Ao Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por toda confiança depositada em mim durante a realização de um projeto com uma linha de pesquisa nova e pelas discussões enriquecedoras;

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas discussões e sugestões sempre importantes e muito interessantes nas reuniões das quintas-feiras;

A Dra. Susan P. Ribeiro, pela paciência e auxílio na padronização dos experimentos de citometria e *sorting* que foram imprescindíveis para a realização deste estudo;

A Dra. Ludmila P. Ferreira, pela amizade, por todo auxílio nos experimentos, discussões enriquecedoras e almoços sempre animados;

A Dra. Verônica Coelho pelas discussões científicas que me acrescentaram muito ao longo da pós-graduação e aumentaram o gosto pela pesquisa;

Ao Luiz Mundel e Dr. Edilberto Postol, pela assistência em tudo o que foi necessário para o uso dos animais neste estudo;

A Dra. Ana Maria Silva e Prof. Dr. Thales de Brito do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pela colaboração nos experimentos de histologia;

Ao Dr. Fernando Pretel do CEFAP ICB, pela paciência e realização dos procedimentos de *sorting* e também ao Dr. Luiz Sardinha do Hospital Albert Einstein por ter colaborado nos últimos experimentos de *sorting*;

A Msc. Aline Bossa, pela amizade, momentos de descontração e assistência em relação aos aspectos éticos e também a Elaine Lagonegro e Fabiana Pagnam, por todo auxílio prestado nos procedimentos éticos deste projeto;

A Dra. Rosimeire Aparecida, pela amizade, passeios e momentos de descontração no laboratório;

A Msc. Andréia Kuramoto, Dra. Carolina Luque, Msc. Fernanda Romano Bruno, Msc. Priscila Ramos Costa, Dra. Janaína Baptista, Dra. Karen Köhler, Dra. Maristela Hernandez, Msc. Malu Marin, Msc. Raquel, Selma P., Simone Santos, Monique, Isabela e a todos os demais funcionários e alunos do LIM 19 e LIM 60 pela assistência no laboratório, discussões e momentos de descontração;

A Dra. Ana Flavia Popi da UNIFESP, Dr. Dewnton Vasconcelos da FMUSP, Dr. Geraldo Passos da FMRUSP e Dra. Flavia Lima da USP, pelas importantes observações e sugestões ao meu trabalho na etapa de qualificação;

A FAPESP pelo auxílio financeiro durante a realização deste projeto de pós-graduação.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos e unidades

Lista de siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A via Wnt/ β -catenina	23
1.1.1 Receptores Frizzled e co-receptores LRP	25
1.1.2 β -catenina e GSK-3 β	26
1.1.3 Fatores de transcrição TCF/LEF.....	27
1.1.4 Antagonistas e agonistas da via Wnt/ β -catenina	27
1.1.5 Via Wnt/ β -catenina na diferenciação e sobrevivência de timócitos ..	28
1.2 Timo.....	29
1.2.1 Involução do timo.....	30
1.2.2 Desenvolvimento de células T no timo	31
1.3 Células T CD4+ <i>naïve</i> e memória	34
1.4 Justificativa do estudo	35
1.5 Hipótese do estudo	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivo específico.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Obtenção de amostras para estudo.....	40
3.1.1 Obtenção das amostras de timo e baço de camundongo.....	40
3.2 Análises histológicas.....	40
3.2.1 Análises histológicas do lóbulo direito do timo.....	41

3.3 Isolamento dos timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e de linfócitos T CD4+ <i>naïve</i> e memória	41
3.3.1 Preparo das suspensões celulares	42
3.3.1.1 Preparo da suspensão de timócitos totais	42
3.3.1.2 Preparo da suspensão de esplenócitos	42
3.3.2 Marcação das suspensões celulares com anticorpos específicos	43
3.3.2.1 Análise da adequação da marcação	44
3.3.3 Obtenção de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e de linfócitos T CD4+ <i>naïve</i> e memória por <i>sorting</i>	44
3.4 Avaliação da expressão gênica	46
3.4.1 Extração de RNA total	46
3.4.1.1 Concentração, qualidade e integridade do RNA total	46
3.4.1.2 Tratamento do RNA total com DNase I	47
3.4.2 Obtenção de cDNA	47
3.4.3 PCR em tempo real	48
3.4.4 Análise da expressão gênica	48
3.4.5 Análise estatística	49
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Análises histológicas do lóbulo direito do timo	53
5.2 Isolamento de timócitos e células T CD4+ periféricas	54
5.3 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina	54
6 DISCUSSÃO	65
6.1 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos DN	65
6.2 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos DP	67
6.3 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos SP CD4 e SP CD8	69
6.4 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em linfócitos T CD4+ periféricos	70
6.5 Considerações finais	72
7 CONCLUSÃO	74

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9 ANEXOS	88
9.1 Anexo A.....	88
9.2 Anexo B.....	89
9.3 Anexo C	90
9.4 Anexo D	91
9.5 Anexo E.....	92
9.6 Anexo F.....	93
9.7 Anexo G	94
9.8 Anexo H	95
9.9 Anexo I.....	96
9.10 Anexo J	97
9.11 Anexo K.....	98
9.12 Anexo L.....	99
9.13 Anexo M.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina.....	24
Figura 2 -	Localização do timo humano e fotomicrografia do lóbulo tímico humano.....	30
Figura 3 -	Tráfego das células T no timo e a localização dos processos principais durante a seleção das células T	33
Figura 4 -	Corte histológico de lóbulo tímico direito de camundongo BALB/c.....	53
Figura 5 -	Expressão de Frizzled 5, Frizzled 6 e Frizzled 10 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos.....	58
Figura 6 -	Expressão de LRP5 e LRP6 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos	59
Figura 7 -	Expressão de β -catenina e GSK-3 β em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos.....	60
Figura 8 -	Expressão de LEF-1, TCF-1 e TCF-4 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos.....	61
Figura 9 -	Expressão de Bcl- _{XL} , ciclina D1 e HIG2 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos.....	62
Figura 10-	Representação do perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em linfócitos T CD4+ <i>naïve</i> e memória de murinos	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Anticorpos e seus respectivos fluorocromos e diluições de uso para marcação das populações de timócitos murinos 43
- Tabela 2 -** Anticorpos e seus respectivos fluorocromos e diluição de uso para marcação das populações de linfócitos T CD4+ *naïve* memória murinos 43
- Tabela 3 -** Marcadores de superfície para distinção de populações de timócitos e de linfócitos T CD4+ *naïve* e memória de camundongos 45
- Tabela 4 -** Valores de pureza para todas as amostras de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e células T CD4+ *naïve* e memória ... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

18S	RNA ribossomal 18S
28S	RNA ribossomal 28S
AIRE	<i>autoimmune regulator</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
BALB/c	<i>laboratory-bred strain of the House Mouse</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CCR7	receptor de quimiocina C-C do tipo 7
CD25	cluster de diferenciação 25
CD27	cluster de diferenciação 27
CD28	cluster de diferenciação 28
CD3	cluster de diferenciação 3
CD4	cluster de diferenciação 4
CD44	cluster de diferenciação 44
CD45RA	cluster de diferenciação 45 RA
CD45RO	cluster de diferenciação 45 RO
CD62L	cluster de diferenciação 62 ligante
CD8	cluster de diferenciação 8
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CDKs	quinases dependentes de ciclina
cTECs	células epiteliais tímicas corticais
CHs	Corpúsculos de Hassal
CO₂	dióxido de carbono
Ct	<i>cycle threshold</i>
DCs	células dendríticas
DEPC	dietilpirocarbonato
Dkks	<i>Dickkopf proteins</i>
DN1	duplo negativo 1
DN2	duplo negativo 2
DN3	duplo negativo 3
DN4	duplo negativo 4

DN total	duplo negativo total
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	duplo positivo
DTT	<i>dithiothreitol</i>
EDTA	ácido etilênico tetra acético
ETPs	progenitores primários de células T
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FTOCs	cultura de timos fetais
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSK3	glicogênio sintase quinase
GSK3α	glicogênio sintase quinase 3 alfa
GSK-3β	glicogênio sintase quinase 3 beta
HE	hematoxilina-eosina
HIF-1α	fator indutor de hipóxia 1 α
HIG2	gene induzível por hipóxia 2
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno humano leucocitário
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IGFBP-4	<i>insulin-like growth-factor binding protein 4</i>
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-7	interleucina 7
IL-7R	receptor de interleucina 7
IL-15	interleucina 15
LEF-1	<i>lymphoid enhancer factor 1</i>
LiCl	cloreto de lítio
LRP5	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
LRP6	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 6</i>
MAPK	proteínas quinase ativadas por mitógenos
MB	<i>Macs Buffer</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mTECS	células epiteliais tímicas medulares

NK	<i>natural killer</i>
p.H.	potencial hidrogeniônico
PE	<i>R-phycoerythrin</i>
PE Cy7	<i>phycoerythrin-Cy7 conjugated</i>
Pré-TCR	pré-receptor de células T
q.s.p	quantidade suficiente para
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
RoRyt	receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama T
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute médium 1640</i>
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
Rspo	<i>R-spondins</i>
sFRPs	<i>secreted Frizzled-related proteins</i>
SP CD4	simples positivo para CD4
SP CD8	simples positivo para CD8
TRAs	<i>tissue-restricted antigens</i>
TCF1	fator de células T 1
TCF3	fator de células T 3
TCF4	fator de células T 4
TCM	células T de memória central
TCR	receptor de célula T
TCR$\alpha\beta$	receptor de célula T alfa beta
TEM	células T de memória efetora
Th1	<i>T helper 1 cell</i>
Th2	<i>T helper 2 cell</i>
Th9	<i>T helper 9 cell</i>
Th17	<i>T helper 17 cell</i>
WIF-1	<i>Wnt-inhibitory factor 1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	por cento
Δ	delta
μg/μL	micrograma por microlitro
g/L	gramas por litro
M	molar
mL	mililitro
ng	nanograma
ng/amostra	nanograma por amostra
nm	nanômetro
nM	nanomolar
°C	graus <i>Celsius</i>
U/μL	unidade por microlitro
X	vezes
α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
μg	micrograma
μL	microlitro

LISTA DE SIGLAS

CEFAP – USP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMT – USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
InCor HCFMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM 06 – FMUSP	Laboratório de Investigação Médica 06 da Faculdade de Medicina da USP
LIM 60 – FMUSP	Laboratório de Investigação Médica 06 da Faculdade de Medicina da USP
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

ALI, T. M. **Perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos e linfócitos T CD4+ de camundongos BALB/c.** 103p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 2015.

INTRODUÇÃO: A molécula HIG2 pode atuar como agonista da via Wnt/ β -catenina, pois se liga ao receptor Frizzled 10 e induz a expressão de genes da mesma. Dados recentes do nosso grupo mostraram expressão diferencial do gene HIG2 em células mononucleares do sangue periférico e em especial linfócitos T CD4+ *naïve*, mas não em células diferenciadas de memória em indivíduos saudáveis. Também observamos in vitro em linfócitos T CD4+ de indivíduos saudáveis que o peptídeo sintético HIG2 induziu a ativação da via Wnt/ β -catenina, produção de HIG2 e outros produtos da via, além da proliferação de células T CD4+ *naïve* sugerindo um papel do HIG2 na proliferação homeostática de linfócitos T CD4+. **HIPÓTESE:** Como as células T CD4+ *naïve* são diretamente exportadas pelo timo, os níveis aumentados de HIG2 neste tipo celular sejam decorrentes da ativação da via Wnt/ β -catenina nos estágios tardios da diferenciação de timócitos. Portanto, as células T CD4+ *naïve* e timócitos simples positivos para CD4 (SP CD4) apresentariam perfil semelhante de expressão de HIG2 e genes da via Wnt/ β -catenina, incluindo receptores, fatores de transcrição, genes estruturais da via e alvos quando comparadas as demais populações celulares. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão de HIG2 e outros genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos e linfócitos T CD4+ *naïve* e memória de camundongos. **MÉTODOS:** Isolamos timócitos duplo negativos (DN), timócitos duplo positivos (DP), simples positivos para CD4 e CD8 (SP CD4 e SP CD8) de timo e também células T CD4+ *naïve* e memória do baço dos mesmos camundongos pelo procedimento de citometria de fluxo. Analisamos a expressão de vários genes da via Wnt/ β -catenina por PCR em tempo real. **RESULTADOS:** Em timócitos DN há expressão significativa dos genes que codificam para Frizzled 6, LRP5, TCF-1 e TCF-4 em relação as outras populações celulares. Nos timócitos DP há maior expressão dos genes que codificam para LRP5, LRP6, β -catenina, GSK-3 β , TCF-1 e Bcl-x_L em

relação às demais populações. Em timócitos SP CD4 foi detectada expressão diferencial de genes que codificam para Frizzled 10, LRP6, β -catenina, LEF-1 e HIG2 enquanto que na população de timócitos SP CD8 não observamos expressão significativa de nenhum gene da via Wnt/ β -catenina. Nas células T CD4+ *naïve* há expressão significativa de Frizzled 5 e Frizzled 10 quando comparadas a timócitos SP CD8 e células T CD4+ de memória . Já nos linfócitos T CD4+ de memória, detectamos maior expressão de Frizzled 6, TCF-4, Bcl-_{XL} e ciclina D1 em relação as demais populações. **CONCLUSÃO:** Cada população apresenta um perfil distinto de expressão gênica. As maiores semelhanças ocorrem entre os timócitos DN e DP onde as principais diferenças são a expressão de Frizzled 6 e Ciclina D1. Os timócitos SP CD4 e as células T CD4+ *naïve* não apresentaram níveis semelhantes de expressão gênica de elementos da via Wnt canônica, o que não corrobora a hipótese de que o perfil transcripcional de timócitos SP CD4 e linfócitos T CD4+ *naïve* é semelhante. Ainda, não observamos expressão aumentada de HIG2 em linfócitos T CD4+ *naïve* comparados aos de memória, o que contrasta com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo com amostras humanas sugerindo que camundongos não regulam a expressão de HIG2 em linfócitos T CD4+ como os seres humanos.

Descritores: HIG2, via Wnt/ β -catenina, timócitos, células T CD4+ *naïve*

SUMMARY

ALI, T. M. **Gene expression profile of Wnt/ β -catenin pathway elements in thymocytes and CD4 + T lymphocytes of BALB/c mice.** 103p. Dissertation (Master's degree). Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2015.

INTRODUCTION: HIG2 molecule can act as an agonist of Wnt/ β -catenin pathway, because it is able to bind to Frizzled 10 receptor and induce the expression of the genes related to this pathway. Recent data from our group have shown differential expression of the HIG2 gene in peripheral blood mononuclear cells, and particularly in naive CD4 + T cells, but not in memory T cells in healthy individuals. We have also observed that inducing the CD4 + T lymphocytes from healthy individuals with HIG2 synthetic peptide *in vitro*, led to the activation of Wnt/ β -catenin pathway, HIG2 production and expression of other target genes of this pathway and the proliferation of *naïve* CD4 + T cells, suggesting that HIG2 may play a role in homeostatic proliferation of CD4+ T cells. **HYPOTHESIS:** As *naïve* CD4 + T cells are directly exported from the thymus, we have hypothesized that increased levels of HIG2 in this cell type is due to the activation of Wnt/ β -catenin pathway in the later stages of thymocyte differentiation. Therefore, *naïve* CD4 + T cells and CD4 single-positive thymocytes (CD4 SP) may share a similar pattern of gene expression of HIG2 and Wnt/ β -catenin genes (genes that encode receptors and co-receptors, transcription factors, structural and target genes) when compared to other cell populations. **AIM:** our major aim is to evaluate the expression of HIG2 and other genes of the Wnt/ β -catenin in thymocytes, *naïve* CD4 + T lymphocytes and memory CD4+ T cells from mice. **METHODS:** We have isolated thymocytes double negative (DN) T cells, positive double positive (DP) T cells, CD4 and CD8 single-positive thymocytes (CD4 SP and CD8 SP) of thymus from BALB/c mice and we have also isolated *naïve* CD4 + T cells and memory CD4+ T cells of the spleen from the same mice we have used the thymus. We have analysed the expression of several genes of Wnt/ β -catenin by real time PCR **RESULTS:** In DN cells there was expression of the Frizzled 6, LRP5, TCF-1 and TCF-4 genes compared to other cell populations. In DP thymocytes it could be

observed a greater expression of LRP5, LRP6, β -catenin, GSK-3 β , TCF-1 and Bcl-X_L genes compared to other populations. In CD4 SP thymocytes, it was detected differential expression of the Frizzled 10, LRP6, β -catenin, LEF-1 HIG2 genes and in CD8 SP cells we could not observe significant expression of any gene of Wnt/ β -catenin pathway. In *naïve* CD4 + T cells there was a significant expression of Frizzled5 and Frizzled 10 genes when compared to all the samples. In memory CD4 + T cells, we have detected higher expression of Frizzled 6, TCF-4, Bcl-X_L and cyclin D1 genes than in any other populations. **CONCLUSION:** Each population has a distinct gene expression pattern. The biggest similarities occur between DN and DP thymocytes where the main differences are the expression of Frizzled 6 and cyclin D1. However, the pattern of gene expression in SP thymocytes is not similar to those presented by *naïve* CD4+ T cells. Moreover, we have not observed increased expression of HIG2 in *naïve* CD4 + lymphocytes compared to memory CD4+ T cells, which contrasts the results obtained previously by our group with human samples suggesting that mice might not regulate the HIG2 expression in CD4 + T lymphocytes as human beings do.

Descriptors: HIG2, Wnt/ β -catenin pathway, thymocytes, *naïve* CD4+ T cells

1 INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 A via Wnt/ β -catenina

A via Wnt/ β -catenina - também conhecida como Wnt canônica - regula várias funções em vertebrados, incluindo, a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Wodaz e Nüsse, 1998) e é conservada em vertebrados (Chien *et al.*, 2009).

Esta via é ativada quando ocorre a ligação da proteína Wnt aos receptores Frizzled (FZD) e LRP5 e LRP6 (do inglês, LDL receptor-related protein 5/6) (MacDonald *et al.*, 2009). Uma vez que a Wnt se liga ao receptor FZD e ao co-receptor LRP5/6, a proteína Dvl (do inglês, *dishevelled*) é recrutada e fosforilada pela caseína quinase 1 α (CK-1 α) para formar um complexo com a Frat1 e inibir a atividade da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β) (Kishida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Papkoff e Aikawa, 1998).

A formação do complexo Wnt-Frizzled-LRP5/6 também promove a degradação de Axina, mediada por LRP5/6 (Mao *et al.*, 2001). A inibição da atividade da GSK-3 β e a degradação da Axina bloqueiam a formação do complexo formado pelas proteínas GSK-3 β -Axina-APC (do inglês, *adenomatous polyposis coli*). Como não ocorre a formação deste complexo GSK-3 β -Axina-APC, há um acúmulo da β -catenina no citoplasma e posteriormente sua translocação para o núcleo (Ikeda *et al.*, 1998). Esse processo de translocação da β -catenina permanece obscuro (Henderson e Fagotto, 2002; Stadel *et al.*, 2006).

No núcleo, a β -catenina se liga aos fatores de transcrição da família TCF/LEF (do inglês, TCF- *T cell factor*, LEF- *lymphoid enhancer factor*) (Huang e He, 2008). Essa ligação leva à expressão de genes que regulam diversas funções celulares (Staal e Clevers, 2005) tais como Ciclina D1 e Bcl- XL (do inglês, *B-cell lymphoma-extra large*) (Ioannidis *et al.*, 2001). A **figura 1** traz um esquema representativo simplificado da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina.

Na ausência da ligação da proteína Wnt aos receptores, um complexo formado pela proteína Groucho com TCF leva à repressão de genes alvo da via (Cavallo *et al.*, 1998) e a β -catenina presente no citoplasma é sequestrada pelo

INTRODUÇÃO

complexo Axina-APC e é fosforilada pela GSK-3 β e CK-1 α e dirigida para degradação no proteassoma (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Yanagawa *et al.*, 2002; Yost *et al.*, 1996).

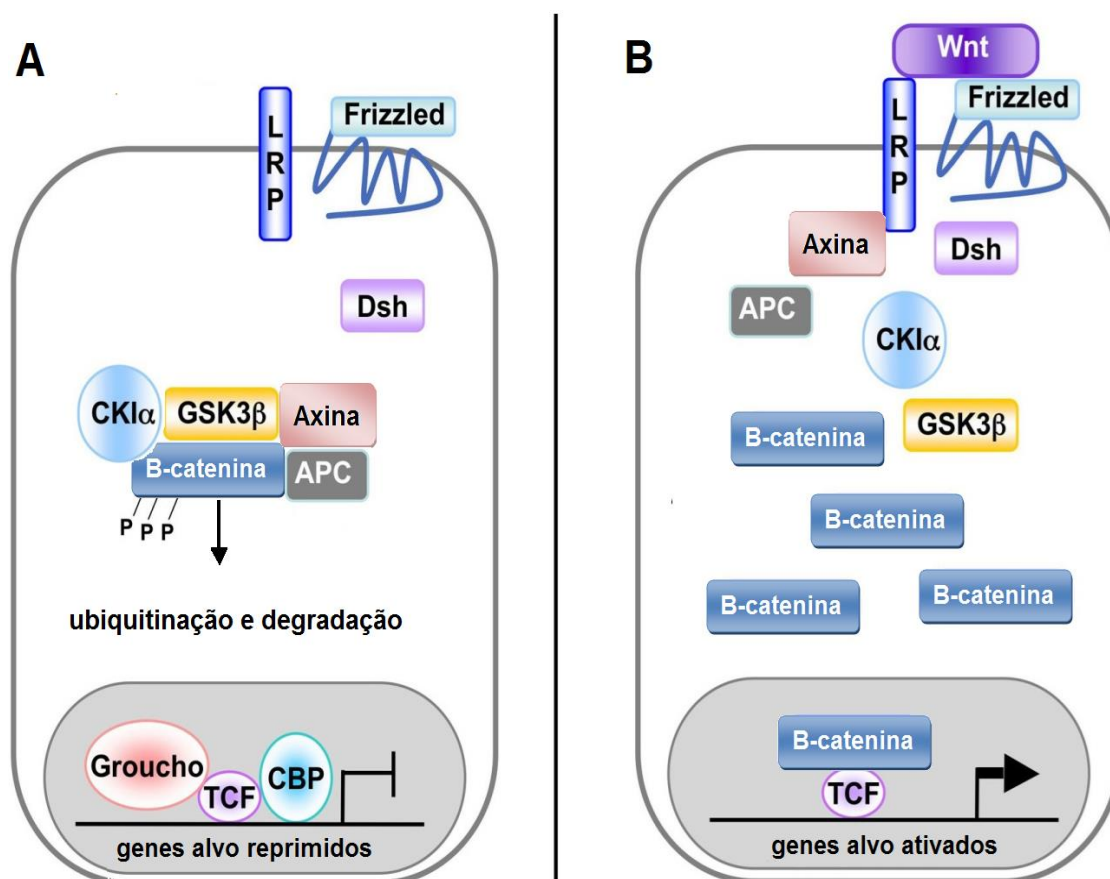


Figura 1. Ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina. **A.** Quando não há ligação das proteínas Wnt aos receptores Frizzled e co-receptores do tipo LRP 5/6, as proteínas CK-1 α , Axina e APC formam um complexo com a proteína GSK-3 β e sequestram a β-catenina no citosol. Ubiquitinada, a β-catenina é degradada no proteassoma. Concomitantemente, as proteínas Groucho e CBP se ligam aos fatores da família de transcrição TCF/LEF e reprimem a transcrição de genes relacionados com a ativação da via Wnt canônica. **B.** Quando as proteínas da família Wnt se ligam ao receptor de membrana Frizzled e aos co-receptores do tipo LRP5/6, não há formação do complexo das proteínas GSK-3 β , APC e Axina e por consequência, ocorre um acúmulo de β-catenina no citosol. A β-catenina é translocada para o núcleo por um mecanismo ainda desconhecido. No núcleo, a β-catenina se associa com fatores de transcrição da família TCF/LEF gerando um complexo fator funcional de transcrição, resultando na ativação de genes-alvo. Fonte: adaptado de Eisenmann, 2005.

INTRODUÇÃO

A desregulação dos níveis e/ou mutações de proteínas envolvidas na sinalização Wnt estão associadas a várias doenças (Moon *et al.*, 2005). Sabe-se que a hiperativação da β -catenina causada pela super-expressão de proteínas Wnt ou a mutação no gene *CTNNB1* (que codifica para a expressão de β -catenina) são causas comuns de carcinomas (Yang *et al.*, 2010 e Ying e Tao, 2009), mutações na expressão de APC levam ao carcinoma colorretal (Powell *et al.*, 1992) e que também a alta expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e proteína de β -catenina correlacionam positivamente com a malignidade histológica de astrocitoma (Sareddy *et al.*, 2009 e Pu *et al.*, 2009).

1.1.1 Receptores Frizzled e co-receptores LRP

Os receptores do tipo Frizzled (FZD) são proteínas encontradas exclusivamente na membrana plasmática da célula em vertebrados e invertebrados. Esses receptores estão localizados em células “Wnt responsivas” (Huang e Klein, 2004).

Até o momento, em humanos foram identificados dez genes FZD (*FZD1-FZD10*) que codificam para a expressão de receptores do tipo Frizzled (Huh e Ornitz, 2010). Os genes *FZD1*, *FZD2* e *FZD7* apresentam aproximadamente 75% de similaridade; *FZD5* e *FZD8* possuem 70% de identidade; *FZD4*, *FZD9* e *FZD10* têm 65% de identidade e os genes *FZD3* e *FZD6* compartilham 50% de similaridade na sequência de aminoácidos (Fredriksson *et al.*, 2003). As funções específicas de cada proteína Frizzled variam de acordo com o tipo celular em que elas estão presentes (Huang e Klein, 2004).

Já as proteínas LRP5 e LRP6 compartilham 71% de homologia e são receptores de membrana celular (MacDonald *et al.*, 2009). Esses dois co-receptores podem apresentar funções redundantes, como por exemplo, no processo de gastrulação em ratos (He *et al.*, 2004), no entanto, foi observado que o LRP6 tem um papel mais dominante e é essencial para a embriogênese, enquanto o LRP5 é dispensável para a embriogênese, mas essencial para a homeostase óssea adulta (He *et al.*, 2004).

INTRODUÇÃO

1.1.2 β -catenina e GSK-3 β

Sabe-se que a β -catenina é uma proteína envolvida nos processos de adesão celular e também é o componente “chave” da via de sinalização Wnt/ β -catenina (Valenta *et al.*, 2012).

A função relacionada à adesão celular foi descoberta no final dos anos 80 (Valenta *et al.*, 2012) e na metade dos anos 90, diversos grupos independentes descobriram que a associação da β -catenina com os fatores de transcrição da família TCF/LEF no núcleo é capaz de induzir a transcrição de genes relacionados à via Wnt canônica (Behrens *et al.*, 1996, Huber *et al.*, 1996, Molenaar *et al.*, 1996, Brunner *et al.*, 1997, Van de Wetering *et al.*, 1997).

Já a GSK3 possui duas isoformas - GSK3- α e GSK3- β - que são codificadas por genes diferentes (Jope *et al.*, 2007). As duas isoformas apresentam uma alta homologia, mas estudos que fizeram uso de modelos geneticamente deficientes demonstraram que as proteínas GSK-3 α e GSK-3 β podem não compensar completamente as funções umas das outras em todos os processos celulares (Wada, 2009 e Force e Woodgett, 2009).

A GSK-3 β é uma proteína quinase serina/treonina que é amplamente distribuída em muitos tecidos, incluindo o cérebro e as células do sangue periférico e sua atividade pode ser regulada farmacologicamente (Young, 2009) e esta proteína está envolvida em uma variedade de processos celulares que incluem desde o metabolismo do glicogênio, proliferação celular, função neuronal, embriogênese a oncogênese (Eldar-Finkelman, 2002, Jope e Johnson, 2004).

Dada à multiplicidade de processos que são regulados pela GSK3, não é surpreendente que esta proteína esteja envolvida em várias vias de sinalização, das quais as mais estudadas são a via da insulina e a Wnt canônica (Rayasam *et al.*, 2009).

INTRODUÇÃO

1.1.3 Fatores de transcrição TCF/LEF

TCF-1 e LEF-1 foram os primeiros membros da família de proteínas TCF/LEF descritos em vertebrados (van de Wetering *et al.*, 1991; Travis *et al.*, 1991, Waterman *et al.*, 1991).

Atualmente em mamíferos, a família TCF/LEF compreende os fatores de transcrição TCF-1, TCF-3, TCF-4 e LEF-1 que são codificados pelos genes *TCF7*, *TCF7L1*, *TCF7L2* e *LEF1*, respectivamente e todos estes genes têm padrões de expressão tecido-específico (Galceran *et al.*, 1999, Korinek *et al.*, 1998, Oosterwegel *et al.*, 1993).

Todos os membros da família TCF/LEF pertencem ao grupo de alta mobilidade (HMG), que por sua vez, engloba as famílias de proteínas que se caracterizam por se ligarem ao DNA nos domínios HMG-box (Roose *et al.*, 1998 e Behrens *et al.*, 1996).

1.1.4 Antagonistas e agonistas da via Wnt/ β -catenina

Vários estudos genéticos e bioquímicos identificaram múltiplas famílias de proteínas que antagonizam ou atuam como agonistas da via Wnt/ β -catenina (MacDonald *et al.*, 2009).

Até o momento são conhecidas seis famílias de proteínas que antagonizam a via Wnt canônica: WIF-1 (do inglês, *Wnt-inhibitory factor 1*), Wise/SOST, Cerberus, IGFBP-4 (do inglês, *insulin-like growth-factor binding protein 4*), Dkk (do inglês, *Dickkopf proteins*) e sFRP (do inglês, *secreted Frizzled-related proteins*) (Cruciat e Niehrs, 2013). Em relação ao antagonismo da via Wnt, duas famílias de fatores de crescimento já foram descritas: Rspo (do inglês, *R-spondins*) e Norrin (Cruciat e Niehrs, 2013).

Em 2005, Togashi e colaboradores (Togashi *et al.*, 2005) reportaram que a proteína HIG2 (do inglês, *hypoxia inducible gene 2*) também pode atuar como agonista da via Wnt canônica, pois ela é capaz de se ligar ao domínio extracelular do receptor Frizzled 10, induzir a expressão do gene *HIG2* (que

INTRODUÇÃO

codifica a proteína também chamada HIG2) pela via Wnt e induzir a proliferação celular.

O gene *HIG2* codifica para a proteína HIG2 que por sua vez, não apresenta nenhuma similaridade com outras proteínas até então descritas (Kenny *et al.*, 2005). Este gene foi identificado primeiramente por Denko e colaboradores (Denko *et al.*, 2000) em uma cultura de células humanas sob a condição de hipóxia e o grupo também observou que a expressão de HIG2 é regulada pelo fator indutor de hipóxia 1 α (HIF-1 α) nessa condição.

Há também muitos trabalhos que utilizaram moléculas pequenas ao invés de proteínas para ativar a via Wnt canônica, entre elas o cloreto de lítio (LiCl) (Klein e Melton, 1996). O lítio em concentrações milimolares é capaz de inibir potently a proteína glicogênio sintase quinase (GSK3) e levar à estabilização da β -catenina (Klein e Melton, 1996).

1.1.5 Via Wnt/ β -catenina na diferenciação e sobrevivência de timócitos

Alguns trabalhos têm reportado tanto a importância da ativação da via Wnt/ β -catenina quanto de seus elementos *downstream* no desenvolvimento da estrutura tímica, diferenciação e maturação de timócitos.

No que diz respeito à estrutura tímica, Mulroy e colaboradores (Mulroy *et al.*, 2002) observaram que camundongos geneticamente deficientes para os genes *Wnt-1* e *Wnt-4* apresentaram timos hipocelulares. Ainda, os dados publicados por Weerkamp e colaboradores (Weerkamp *et al.*, 2006) e Pongracz e colaboradores (Pongracz *et al.*, 2003) mostraram que várias proteínas Wnt são expressas nas células tímicas epiteliais humanas e murinas e Balciunaite e colaboradores (Balciunaite *et al.*, 2002) observaram que em estágios distintos de maturação das células epiteliais tímicas corticais (cTECs) ocorre uma expressão diferencial de genes da via Wnt.

Em relação à diferenciação e maturação de células T, estudos com camundongos nocaute para o gene *TCF7* que codifica para TCF-1 e também geneticamente deficientes para *TCF7* e *LEF1* demonstraram um bloqueio na

INTRODUÇÃO

maturação das células T no timo (Verbeek *et al.*, 1995 e Okamura *et al.*, 1998). Em cultura de timos fetais (FTOCs), a interrupção da interação entre as proteínas β -catenina e TCF-1 resultou numa redução de timócitos DP (Pongracz *et al.*, 2006).

Em outros estudos, também foi observada a expressão gênica e proteica dos receptores das proteínas Wnt (Frizzled 5 e 6; LRP 5 e 6) e da β -catenina em timócitos humanos e murinos em diferentes estágios de maturação (Weerkamp *et al.*, 2006) e Luis e colaboradores (Luis *et al.*, 2009) demonstraram que a deficiência na expressão de Wnt3a afeta os estágios iniciais de desenvolvimento de células T no timo.

1.2 Timo

O timo é um órgão linfoide primário que fornece um microambiente único para o desenvolvimento de linfócitos T, pois é neste órgão que os timócitos (células precursoras de linfócitos T), passam por processos de proliferação, diferenciação e seleção (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

Ele está localizado no compartimento central da cavidade torácica, acima do coração e atrás do esterno (Gordon e Manley, 2011). O timo possui dois lobos encapsulados que são divididos por numerosos septos em múltiplos lóbulos. Cada lóbulo apresenta duas regiões diferentes, *i.e.*, córtex e medula (Petrie e Zúñiga-Pflücker, 2007).

A porção cortical exterior é densamente povoada por linfócitos pré-T (ou timócitos) e a porção medular interna contém poucos linfócitos T, mas totalmente maduros (Petrie e Zúñiga-Pflücker, 2007) e estruturas conhecidas como Corpúsculos de Hassal (CHs) que são raras em espécies de roedores quando comparados a primatas e humanos (Pearse, 2006) e cujo papel permanece vagamente entendido (Matsui *et al.*, 2014). A **figura 2** traz um esquema simplificado da localização do timo e das regiões cortical e medular do lóbulo tímico humano.

INTRODUÇÃO

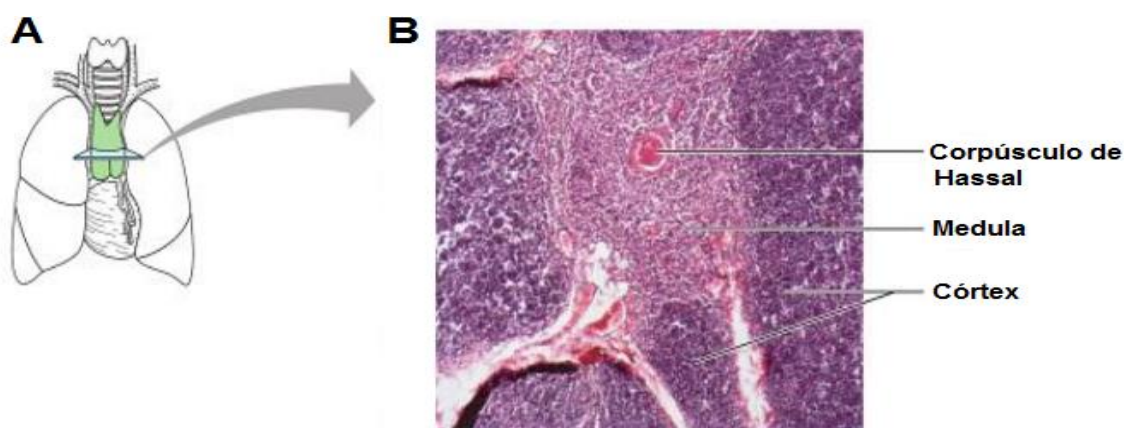


Figura 2. Localização do timo humano e fotomicrografia do lóbulo tímico humano. A. Ilustração esquemática da localização do timo que está destacado em verde. **B.** Fotomicrografia do lóbulo tímico humano mostra a região do córtex e medula (70X). Fonte: adaptado de Marieb e Hoehn, 2009.

O ambiente do timo é formado por macrófagos, células dendríticas (DCs), fibroblastos, células mesenquimais e timócitos (células precursoras de linfócitos T) (Sun *et al.*, 2013) e cTECs, que formam uma malha para proporcionar suporte mecânico e estímulos para a proliferação e desenvolvimento de timócitos (Petrie e Zúñiga-Pflücker, 2007).

1.2.1 Involução do timo

O timo involui tanto em condições fisiológicas normais quanto em patológicas (Gameiro *et al.*, 2010). Em humanos, a involução fisiológica do timo começa após a puberdade e a involução completa é esperada até os 25 anos (Francis *et al.*, 1985). Esse processo é caracterizado pela redução do tamanho da glândula causada pela involução do tecido epitelial (Francis *et al.*, 1985).

Em condições patológicas, em humanos foi observado que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) leva a um “encolhimento” do timo com uma redução dos CHs e perda da delimitação córtex-medula (Napolitano *et al.*, 2002). De acordo com Nunes-Alves e colaboradores (Nunes-Alves *et al.*, 2013) além do HIV, o *Mycobacterium tuberculosis* pode infectar o timo e causar alterações na exportação de linfócitos T para a periferia.

INTRODUÇÃO

A involução do timo em condições patológicas tem sido notada também em modelos experimentais (Nunes-Alves *et al.*, 2013). Stanley e colaboradores (Stanley *et al.*, 1993) observaram que o vírus HIV é capaz de infectar cTECs *in vivo* e induzir a degeneração destas células. Andrade e colaboradores (Andrade *et al.*, 2008) descreveram que a infecção por *Plasmodium bergheii* leva à alterações histológicas, como a perda da delimitação entre as regiões do córtex e medula tímica.

Alterações tímicas também foram reportadas em modelos experimentais em infecções por *Trypanosoma cruzi* (Savino *et al.*, 1989), *Paracoccidioides brasiliensis* (Brito *et al.*, 2003), desnutrição (Savino *et al.*, 2007) e diabetes induzida (Nagib *et al.*, 2010).

1.2.2 Desenvolvimento de células T no timo

O desenvolvimento de linfócitos T é geralmente dividido em três estágios principais: duplo negativo (DN), duplo positivo (DP) e simples positivo (SP) (Yu *et al.*, 2010). No estágio DN, os timócitos não expressam CD4 e CD8 (Anderson *et al.*, 1996) e representam 5% do total dos linfócitos do timo (Gameiro *et al.*, 2010). Ainda, baseado na expressão dos marcadores CD25 e CD44, os timócitos DN podem ser subdivididos em quatro estágios: DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺), DN3 (CD25⁺CD44⁻) e DN4 (CD25⁻CD44⁻); este último é também chamado de estágio pré-DP (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2006).

Os timócitos na fase DN1 e DN2 têm o potencial para se diferenciarem em células não-T, como por exemplo, células *natural-killer* (NK), linfócitos B, monócitos e DC (Ikawa *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2010, Rothenberg *et al.*, 2008). Quando os timócitos chegam à fase DN3, eles estão comprometidos com a linhagem de células T e não podem se transformar em outras linhagens (Rothenberg *et al.*, 2008). No estágio DN3, os timócitos iniciam o rearranjo do locus da cadeia β do receptor de células T (TCR) e apenas os que formarem uma cadeia β competente do TCR são capazes de sobreviver e continuar o processo de diferenciação (Wang *et al.*, 2011).

INTRODUÇÃO

A transição para o estágio DN4 marca o início da recombinação do locus do TCR α e o comprometimento com a linhagem T $\alpha\beta$ (Livak *et al.*, 1999). As células DN4 proliferam intensamente, dando origem a altos números de células da subpopulação seguinte, CD4+CD8+ (duplo-positivas ou DP) (Wack *et al.* 2000). Embora mais de 80% do total de timócitos são DP, apenas 5% são selecionados positivamente em células SP CD4 ou SP CD8. Os timócitos que expressam TCR $\alpha\beta$ que não são capazes de reconhecerem peptídeos próprios apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), morrem por negligência (Goldrath e Bevan, 1999).

Todas as células que passaram pela seleção positiva, sejam específicas para o MHC de classe I ou II, aumentam a expressão do receptor de quimiocina CCR7, o que facilita a migração dessas células para a região medular do timo (Sawicka *et al.*, 2014). Na região medular, os timócitos SP devem sobreviver ao processo de seleção negativa antes de serem exportados para a periferia (Xu *et al.*, 2013).

No processo de seleção negativa, células epiteliais tímicas medulares (mTECs) expressam antígenos tecido-específicos, os chamados TRAs (do inglês, *tissue-restricted antigens*) de forma promíscua (Derbinski *et al.*, 2001). A expressão dos TRAs está sob controle do fator de transcrição AIRE (do inglês, *autoimmune regulator*), o qual promove a transcrição de proteínas que não seriam de outra forma encontradas no timo (Anderson *et al.*, 2002). Estas proteínas próprias são apresentadas aos timócitos pelas mTECs ou por células dendríticas, induzindo a deleção clonal de timócitos que reconhecem estes antígenos com alta avidéz (Liston *et al.*, 2003).

Os timócitos capazes de reconhecer peptídeos próprios com alta afinidade, portanto potencialmente auto-reativos, são induzidos a sofrer morte por apoptose (Nitta *et al.*, 2008 e Werlen *et al.*, 2003). Alguns clones, no entanto, irão sobreviver se diferenciando em células T com propriedades regulatórias (Derbinski *et al.*, 2005). As células SP CD4 e SP CD8 recentemente geradas saem do timo para formar um *pool* de células T *naïve* de longa vida que recirculam dentro dos limites dos tecidos linfóides periféricos (Krogsgaard

INTRODUÇÃO

et al., 2007). Esses linfócitos T pós-tímicos retêm um baixo grau de auto-reatividade que geralmente não é suficiente para causar autoimunidade, mas é essencial para a sobrevivência das mesmas e também aumentar a sensibilidade do TCR para antígenos externos (Krogsgaard *et al.*, 2007). A **figura 3** ilustra os estágios de desenvolvimento das células T no microambiente tímico.

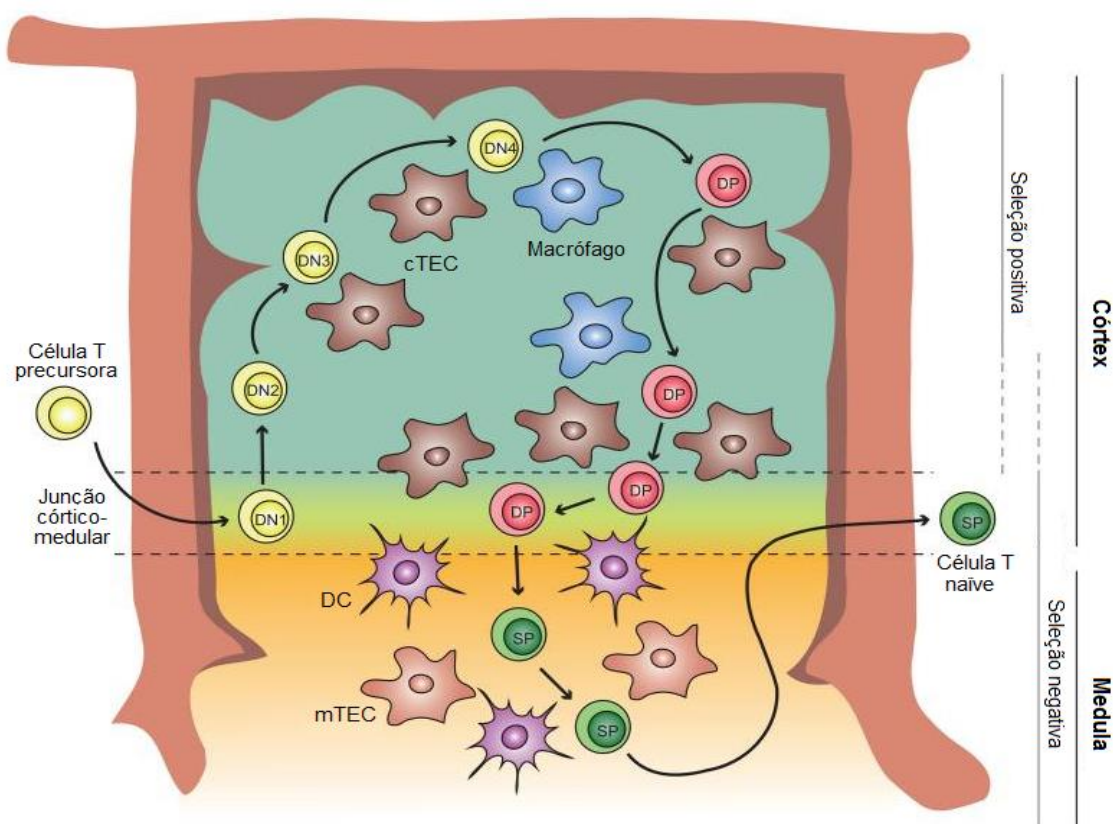


Figura 3. Tráfego das células T no timo e a localização dos processos principais durante a seleção das células T. As células precursoras saem da medula óssea, entram na região córtico-medular do timo e migram para o córtex. Na região do córtex, essas células interagem com o microambiente tímico e recebem sinais para se diferenciarem em timócitos duplo-negativos (DN). Ainda no córtex, os timócitos DN se tornam timócitos duplo-positivos (DP) após interações com células do microambiente tímico. Os timócitos DP migram do córtex para a medula, interagindo com componentes estruturais do timo durante os processos de seleção positiva e negativa. Na medula, timócitos SP (CD3+CD4+ ou CD3+CD8+) são gerados e os timócitos auto-reativos são deletados. Os timócitos SP são exportados pelo timo e migram para órgãos linfóides periféricos. Fonte: adaptado de Nunes-Alves *et al.*, 2013.

INTRODUÇÃO

1.3 Células T CD4+ *naïve* e memória

Os linfócitos T *naïve* são caracterizados pela expressão dos marcadores de superfície CD45RA, CD27, CD28, CD62L, CCR7 e IL-7R (De Rosa *et al.*, 2001 e Swainson *et al.*, 2006). Estes linfócitos são programados para recircular do sangue aos tecidos linfoides secundários e de volta ao sangue por meio dos vasos linfáticos para facilitar o contato com antígenos específicos (Gowans, 1959) e estas populações sobrevivem até encontrarem um antígeno nos tecidos linfoides periféricos (De Boer, 2013). As células T *naïve* são mantidas na periferia por vários mecanismos, como a produção no timo e a proliferação homeostática (De Boer, 2013).

Entretanto, na medida em que a involução do timo progride, a manutenção de um número adequado de células T CD4+ *naïve* com um repertório suficientemente amplo na periferia se torna cada vez mais dependente da expansão homeostática de células T CD4+ *naïve* que saíram do timo anos ou décadas mais cedo (Den Braber *et al.*, 2012). A exposição à interleucina 7 (IL-7) e o contato com moléculas de MHC que apresentam peptídeos próprios pelo TCR no tecido linfóide secundário são essenciais para a homeostase das células T *naïve* (Brocker, 1997, Tan *et al.*, 2001, Den Braber *et al.*, 2012).

As células T CD4+ *naïve* podem se diferenciar em uma diversidade de linfócitos T efetores funcionais, como por exemplo, linfócitos Th1, Th2, Th9 e Th17 (Ashkar *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 1997). A diferenciação das células T CD4+ *naïve* ocorre quando antígenos são captados pelas DCs em tecidos periféricos e as DCs instruem uma resposta primária de células T nos órgãos linfoides secundários (Steinman, 1991). Posteriormente, as DCs que reconhecem um patógeno sofrem um complexo programa de maturação, i.e. elas regulam o MHC e moléculas co-estimulatórias, migram para os linfonodos, interagem com células T patógeno-específicas e secretam citocinas polarizadoras apropriadas (Banchereau e Steinman, 1998). A intensidade dos sinais de TCR transduzidos e o tipo de citocinas que as DCs liberam para os

INTRODUÇÃO

linfócitos T *naïve* determinam a diferenciação destes linfócitos (Swain, 1999 e Sprent, 1997).

Os linfócitos T de memória também têm um papel importante na resposta imune adaptativa às doenças infecciosas e câncer (Hadrup *et al.*, 2013, Youngblood *et al.*, 2013, Kalia *et al.*, 2010, Klebanoff *et al.*, 2006) pois eles respondem muito mais rápido aos antígenos do que os linfócitos T *naïve* (Broere *et al.*, 2011).

Em seres humanos, as células T de memória são classicamente distinguidas pela expressão de CD45RO e pela ausência de expressão de CD45RA (CD45RO+CD45RA) (Smith *et al.*, 1986). Estudos recentes indicam que as células T CD4+ e T CD8+ de memória compreendem ao menos dois subtipos distintos funcionalmente: (I) células T de memória central (TCM) que expressam o receptor de quimiocina CCR7 e CD62L e migram para as áreas de células T de órgãos linfoides secundários e (II) células T de memória efetora (TEM) que perderam a expressão de CCR7 e adquiriram a capacidade de migrar para tecidos periféricos não-linfoides (Masopust *et al.*, 2001, Reinhardt *et al.*, 2001, Iezzi *et al.*, 2001, Sallusto *et al.*, 1999).

As células TCM e TEM também podem ser classificadas pelo nível e pelo tipo de secreção de citocinas, sendo que as TCM têm capacidade proliferativa e produção de interleucina-2 (IL-2) maiores enquanto que as TEM possuem maior secreção de citocinas efetoras incluindo interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4) (Sallusto *et al.*, 2004 e Sallusto *et al.*, 1999).

1.4 Justificativa do estudo

Dados recentes do nosso grupo mostraram que linfócitos T CD4+ *naïve* humanos – mas não as células diferenciadas de memória – apresentam expressão aumentada do gene *HIG2*, alvo e ativador autócrino da via Wnt/ β -catenina, e que ele pode estar envolvido na proliferação homeostática de linfócitos T CD4+ *naïve* (Santos *et al.*, em preparação).

INTRODUÇÃO

Como os linfócitos T CD4+ *naïve* são diretamente exportados pelo timo, pode-se hipotetizar que os níveis aumentados de HIG2 neste tipo celular sejam decorrentes da conhecida ativação da via Wnt/ β -catenina nos estágios tardios da diferenciação de timócitos. Apesar do envolvimento da via Wnt/ β -catenina na proliferação e sobrevivência ao longo das etapas de diferenciação de timócitos já ser conhecido, não há estudos que investigaram se o gene HIG2 também estaria expresso em diferentes etapas de maturação de timócitos.

Neste estudo, nós investigaremos principalmente a expressão gênica de HIG2 nas diferentes populações de timócitos murinos, *i.e.* DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e nas células periféricas T CD4+ *naïve* e memória, além de analisarmos o perfil de expressão de alguns genes da via Wnt/ β -catenina incluindo receptores, fatores transcripcionais e genes alvo da via, de maneira de verificarmos a ativação da mesma e genes estruturais da via Wnt/ β -catenina.

Dos outros genes que escolhidos neste estudo, apenas alguns já foram estudados por outros grupos e já têm papel bem conhecido, enquanto que vários ainda não foram averiguados neste contexto. Neste trabalho, optamos por usar células isoladas de camundongos isogênicos, para validá-los como um modelo de estudo da molécula HIG2 em timócitos e linfócitos T CD4+ periféricos.

1.5 Hipótese do estudo

Como as células T CD4+ *naïve* são diretamente exportadas pelo timo, pode-se hipotetizar que os níveis aumentados de HIG2 neste tipo celular sejam decorrentes da ativação da via Wnt/ β -catenina nos estágios tardios da diferenciação de timócitos (SP CD4). Portanto, as células T CD4+ *naïve* e SP CD4 apresentariam perfil semelhante de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina (entre eles, HIG2).

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de HIG2 e outros genes da via de sinalização Wnt/ β -catenina nas populações de timócitos e células T CD4+ periféricas de camundongos.

2.2 Objetivo específico

- Caracterizar o perfil de expressão de HIG2 e outros genes que codificam para receptores, proteínas estruturais, fatores de transcrição e genes-alvo da via de sinalização Wnt/ β -catenina em timócitos duplos negativos (DN), duplos positivos (DP), simples positivos para CD4 e CD8 (SP CD4 e SP CD8) e linfócitos T CD4+ *naïve* e de memória de camundongos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor HCFMUSP). O documento que comprova a aprovação está disponível no **anexo A**.

3.1 Obtenção de amostras para estudo

Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da USP (IMT-USP). O protocolo para uso desses animais foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa da instituição (ver **anexo B**).

3.1.1 Obtenção das amostras de timo e baço de camundongo

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, saudáveis, machos, com quatro semanas de idade foram mantidos no Biotério de Experimentação do IMT-USP, em gaiolas plásticas com tampa gradeada de metal, ambiente com ventilação natural e ração e água *ad libitum*. Para a remoção do timo e baço, estes camundongos foram eutanizados em câmara de dióxido de carbono (CO₂).

O timo e baço de cada animal foram retirados em fluxo laminar, ambiente asséptico. Utilizamos o timo de três camundongos para as análises histológicas. Para o isolamento das populações de interesse preparamos cinco *pools* de timo e de baço (para cada *pool* com dois camundongos).

3.2 Análises histológicas

Todos os processos de preparação das lâminas, coloração e fotografia das mesmas foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Thales de Brito e a Dra. Ana Maria Silva no Laboratório de Investigação Médica 06 da Faculdade de Medicina da USP (LIM06 – FMUSP).

MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Análises histológicas do lóbulo direito do timo

Para a análise de lóbulos do timo murino, nós sacrificamos três camundongos BALB/c, saudáveis, machos de quatro semanas para a retirada do órgão. O timo inteiro de cada animal foi colocado em um recipiente com formol tamponado a 10% e pH 7,2 por no mínimo 24 horas. Posteriormente, todas as amostras que estavam em recipientes com formol foram transferidas para cassetes individuais, para serem processadas em equipamento histotécnico automático para a realização da desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos dos órgãos foram cortados em micrótomo na espessura de 4µm e colocados em lâminas previamente silanizadas. Em cada lâmina foi colocado um corte. Após, os cortes histológicos dos lóbulos tímicos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Ao final desses procedimentos, todas as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico.

3.3 Isolamento de timócitos DN, DP, SP CD4, SP CD8 e de linfócitos T CD4+ *naïve* e memória

Para a obtenção das populações de interesse, inicialmente realizamos o preparo de uma suspensão celular de timócitos e esplenócitos murinos. Posteriormente essas suspensões celulares foram marcadas com anticorpos conjugados à fluorocromos específicos e por fim foi feita a separação das populações DN total (as subpopulações de timócitos DN não foram isoladas), DP, SP CD4 e SP CD8, T CD4+ *naïve* e *pool* de T CD4+ de memória (foram isoladas as populações TCM e TEM, mas ambas foram colocadas no mesmo tubo, após o fim do procedimento) pela técnica de *sorting*. Descrevemos a seguir todas as etapas de preparo da suspensão celular, marcação com anticorpos e *sorting*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Preparo das suspensões celulares

3.3.1.1 Preparo da suspensão de timócitos totais

Para cada preparo de suspensão de *pool* timócitos de camundongos, utilizamos 1 timo de dois camundongos da mesma linhagem, sexo e idade. Preparamos no total, cinco suspensões de timócitos totais. Para o preparo de cada suspensão celular, os dois timos foram macerados em uma placa de Petri juntamente em meio RPMI-1640 (Gibco, Estados Unidos) e posteriormente centrifugados a 1500g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado novamente em RPMI-1640, seguido de centrifugação a 1500 g, por 10 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, o número total de timócitos foi determinado por contagem na câmara de Neubauer e as células também foram avaliadas quanto à viabilidade por coloração com azul de tripano. Ao final, aproximadamente 2×10^8 células de cada *pool* foram resuspendidas em 2 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) e deixadas em gelo para a realização da marcação com anticorpos específicos.

3.3.1.2 Preparo da suspensão de esplenócitos

Para cada preparo de suspensão de esplenócitos de camundongos, utilizamos 1 baço oriundo de dois camundongos da mesma linhagem, sexo e idade. Preparamos no total, cinco suspensões de esplenócitos totais. Para o preparo de cada suspensão celular, os dois baços foram macerados em uma placa de Petri juntamente em meio RPMI-1640 (Gibco, Estados Unidos) e posteriormente centrifugados a 1500g por 10 minutos a 4°C.

Em seguida, o *pellet* foi lavado novamente em RPMI-1640, seguido de centrifugação a 1500g, por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o número total de timócitos foi determinado por contagem na câmara de Neubauer e as células também foram avaliadas quanto à viabilidade por coloração com azul de tripano. Por fim, cerca de 2×10^8 células de cada *pool* foram resuspendidas

MATERIAL E MÉTODOS

em 2mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) e mantidas a 4°C para a marcação com anticorpos específicos.

3.3.2 Marcação das suspensões celulares com anticorpos específicos

Os procedimentos de marcação e análise das amostras foram realizados em colaboração com a Dra. Susan P. Ribeiro no Laboratório de Investigação Médica 60 da Faculdade de Medicina da USP (LIM 60 – FMUSP). Para todas as marcações (isso inclui timócitos e esplenócitos murinos), cerca de 2×10^8 células foram resuspendidas em meio RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) e centrifugadas a 2000g, 4°C por 5 minutos. Os *pellets* foram resuspendidos em MACS Buffer (MB) (PBS1X; 2mM EDTA; 5mg/mL BSA) com os anticorpos/fluorocromos/diluições indicados nas **tabelas 1 e 2** por 45 minutos à 4°C no escuro. Posteriormente a suspensão celular foi lavada com o tampão MB e as células foram resuspendidas em volume final de 4mL de MB.

Tabela 1. Anticorpos e seus respectivos fluorocromos e diluições de uso para marcação das populações de timócitos murinos

Reatividade camundongo	Fluorocromo	Diluição	Empresa fabricante
CD3	PE	1:50	BD PharMingen
CD4	PE Cy7	1:200	BD PharMingen
CD8	APC	1:100	BD PharMingen

Tabela 2. Anticorpos e seus respectivos fluorocromos e diluição de uso para marcação das populações de linfócitos T CD4+ *naïve* e memória de murinos

Reatividade camundongo	Fluorocromo	Diluição	Empresa fabricante
CD3	APC Cy7	1:50	BD PharMingen
CD4	PE Cy7	1:200	BD PharMingen
CD44	PE	1:400	BD PharMingen
CD62L	APC	1:1600	BD PharMingen

MATERIAL E MÉTODOS

3.3.2.1 Análise da adequação da marcação

Para análise das populações e adequação da marcação com as respectivas diluições de anticorpos, foi retirada uma alíquota (máximo de 1×10^6 células) de cada suspensão celular marcada. Antes de realizarmos a aquisição das alíquotas no FACS CANTO, foi feito o ajuste das voltagens. Para ajuste das voltagens do citômetro de fluxo nós utilizamos *beads* de compensação (BD) comerciais. As mesmas foram marcadas individualmente com os fluorocromos empregados em cada painel e foram preparadas proporcionalmente com a adição de 1 gota da *beads* negativa e 1 gota das *beads* positivas a 600 μ L de MB.

Em seguida, 200 μ L dessa suspensão foram distribuídos em diferentes tubos de citometria referentes a cada fluorocromo contido no painel. As mesmas foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida adquiridas no citômetro FACS CANTO para ajuste das voltagens individuais. Após, as amostras foram adquiridas em um citômetro FACS CANTO utilizando o programa DIVA (Tree Star Inc, Estados Unidos). As populações e adequação das marcações com as respectivas diluições foram avaliadas com o programa FlowJo (Tree Star Inc, Estados Unidos).

3.3.3 Obtenção de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e de linfócitos T CD4+ *naïve* e memória por *sorting*

As obtenções das populações DN total, DP, SP CD4 e SP CD8 a partir de timos de camundongos e das populações T CD4+ *naïve* e *pool* de T CD4+ de memória (TCM+TEM) a partir de esplenócitos murinos foram realizadas no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP - USP) no citômetro FACS ARIA III, equipamento que permite a realização de *sorting*.

Como descrevemos anteriormente, para cada *sorting* uma suspensão de 2×10^8 de timócitos totais foi marcada com os anticorpos e fluorocromos de acordo com a configuração do FACS ARIA III. Após essa etapa, a suspensão

MATERIAL E MÉTODOS

celular foi mantida a 4°C e protegida da luz até o momento a realização do *sorting* no CEFAP-USP (menos de 12 horas). No CEFAP-USP, primeiro realizamos o ajuste das voltagens do FACS ARIA II com *beads* de compensação comerciais. Posteriormente a suspensão celular foi filtrada e passada para tubos plásticos de 5mL.

O tubo foi colocado no aparelho e as subpopulações foram isoladas de acordo com a expressão de alguns marcadores descritos na **tabela 3**. As populações de interesse que foram obtidas foram mantidas também em outros tubos plásticos de 5 mL com meio RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos) em gelo. Ao final do procedimento, realizamos o teste de pureza, com a finalidade de observarmos se houve contaminação da subpopulação de interesse com outras. Foram adquiridos de 5.000 a 10.000 eventos no FACS ARIA III para a realização do teste de pureza nas amostras.

Tabela 3. Marcadores de superfície para distinção de populações de timócitos e de linfócitos T CD4+ *naïve* e memória de camundongos

Populações celulares	Marcadores				
	CD3	CD4	CD8	CD44	CD62L
DN	-	-	-	-	-
DP	+	+	+	-	-
SP CD4	+	+	-	-	-
SP CD8	+	-	+	-	-
T CD4+ <i>naïve</i>	+	+	-	-	+
*T CD4+ EM	+	+	-	+	-
*T CD4+ CM	+	+	-	+	+

*Isolamos estas duas populações para fazermos um *pool* de células T CD4+ de memória.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4 Avaliação da expressão gênica

Para a avaliação da expressão gênica nas populações de interesse, primeiro realizamos a extração de RNA total de todas as amostras, avaliamos as concentrações de RNA total e fizemos o tratamento das amostras com a DNase, a fim de remover possíveis contaminantes como o DNA genômico que poderia afetar as etapas futuras. Após essa etapa, foi feita a obtenção de cDNA e por fim, os experimentos de PCR em tempo real. Todas as etapas que envolveram o estudo da expressão gênica estão descritas a seguir.

3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído logo após o procedimento de *sorting* das populações de interesse. Para tal procedimento, utilizamos o *kit* Purelink™ RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies, Estados Unidos) seguindo as especificações do fabricante do produto. As amostras foram resuspendidas em 50µL de água ultrapura (Life Technologies, Estados Unidos).

3.4.1.1 Concentração, qualidade e integridade do RNA total

A concentração e qualidade do RNA total de cada amostra foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Estados Unidos). Para a determinação da pureza da amostra, utilizamos a razão A260/A280 (razão entre as absorbâncias lidas a 260nm (A260) e 280nm (A280)). Consideramos as amostras com “pureza” apropriada para os testes subsequentes as que apresentassem razões A260/A280 entre 1.8 a 2.0. Para avaliar a integridade do RNA, alíquotas de até 100 ng/amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O RNA foi considerado íntegro pela visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal (rRNA) no gel de agarose.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1.2 Tratamento do RNA total com DNase I

O tratamento do RNA com a Dnase I tem a finalidade de eliminar possíveis contaminantes (DNA genômico) nas amostras. Para isso, utilizamos 1µg de RNA total extraído das amostras e adicionamos em cada amostra 0,5µL de DNase I HPLC ultrapure (10U/µL Deoxyribonuclease I bovine pâncreas RNase-Free FPLC pure, Amersham-Biosciences, Estados Unidos), sendo estas incubadas a 37°C por 10 minutos em termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, Estados Unidos). A inativação da enzima foi realizada pela incubação das amostras a 75°C por 5 minutos. Após esse procedimento, partimos para a etapa de transcrição reversa (obtenção de DNA complementar - cDNA).

3.4.2 Obtenção de cDNA

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), 200 ng de RNA total por amostra. Adicionamos por amostra de RNA, 0,5 µL de Oligo dT (500µg/µL, Invitrogen, Estados Unidos), 0,5 µL de Random Primers (3 µg/µL, Invitrogen, Estados Unidos), 1 µL de dNTP *mix* (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP Invitrogen, Estados Unidos) e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen, Estados Unidos) q.s.p 20 µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e depois por 42°C por 2 minutos em termociclador (MJ Research, Estados Unidos). Ao final destes ciclos, adicionamos por amostra 4µL de Tampão 5X (Invitrogen, Estados Unidos), 2 µL de DTT (0,1 M, Invitrogen, Estados Unidos), 1µL de inibidor de RNase (40 U/µL, RNase OUT, Invitrogen, Estados Unidos) e 1µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript, 200U/µL, Invitrogen, Estados Unidos) e esta mistura novamente foi aquecida a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos no termociclador. Ao final da reação, as amostras foram estocadas a -20°C, até o momento de uso para as análises em PCR em tempo real para análise da expressão gênica.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.3 PCR em tempo real

Para avaliarmos a expressão de genes da via Wnt canônica, utilizamos a técnica de PCR em tempo real. Utilizamos ensaios prontos customizados pela empresa Life Technologies. Foram utilizadas seis placas de 96 poços cada, customizadas com 13 genes que codificam para elementos importantes da via Wnt canônica (HIG2, Frizzled 5, Frizzled 6, Frizzled 10, LRP5, LRP6, β -catenina, GSK-3 β , TCF-1, TCF-4, LEF-1, Bcl-x_L e ciclina D1) e 3 genes endógenos (18S, GAPDH e HPRT). Pipetamos 50 ng de cDNA e 18 μ L de Taqman Master Mix (Life Technologies, Estados Unidos) em cada poço das placas de PCR. Em cada placa, corremos uma única população celular, ou seja, na primeira reação, utilizamos todos os timócitos DN, na segunda placa foram analisados os timócitos DP e assim por diante. No **anexo L** está disponível o esquema das placas de PCR em tempo real com os genes que utilizamos neste projeto. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas usando o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 *sequence detection system*” (Applied Biosystems, Estados Unidos).

3.4.4 Análise da expressão gênica

Para a análise da expressão gênica, utilizamos o cálculo da expressão gênica relativa, método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, proposto por Livak e Schmittgen (Livak e Schmittgen, 2001), onde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ alvo (gene da via Wnt canônica)} - Ct \text{ referência (18S)} ;$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Amostra alvo} - \Delta Ct \text{ Amostra controle (células T CD4+ naïve)}$$

Primeiro, realizamos o cálculo do valor de ΔCt de todas as amostras (isto inclui todas as populações que nos propusemos a estudar). Para o cálculo de ΔCt de cada amostra, realizamos a subtração do valor de Ct de um gene da via Wnt canônica pelo valor de Ct do gene endógeno da mesma. No caso,

MATERIAL E MÉTODOS

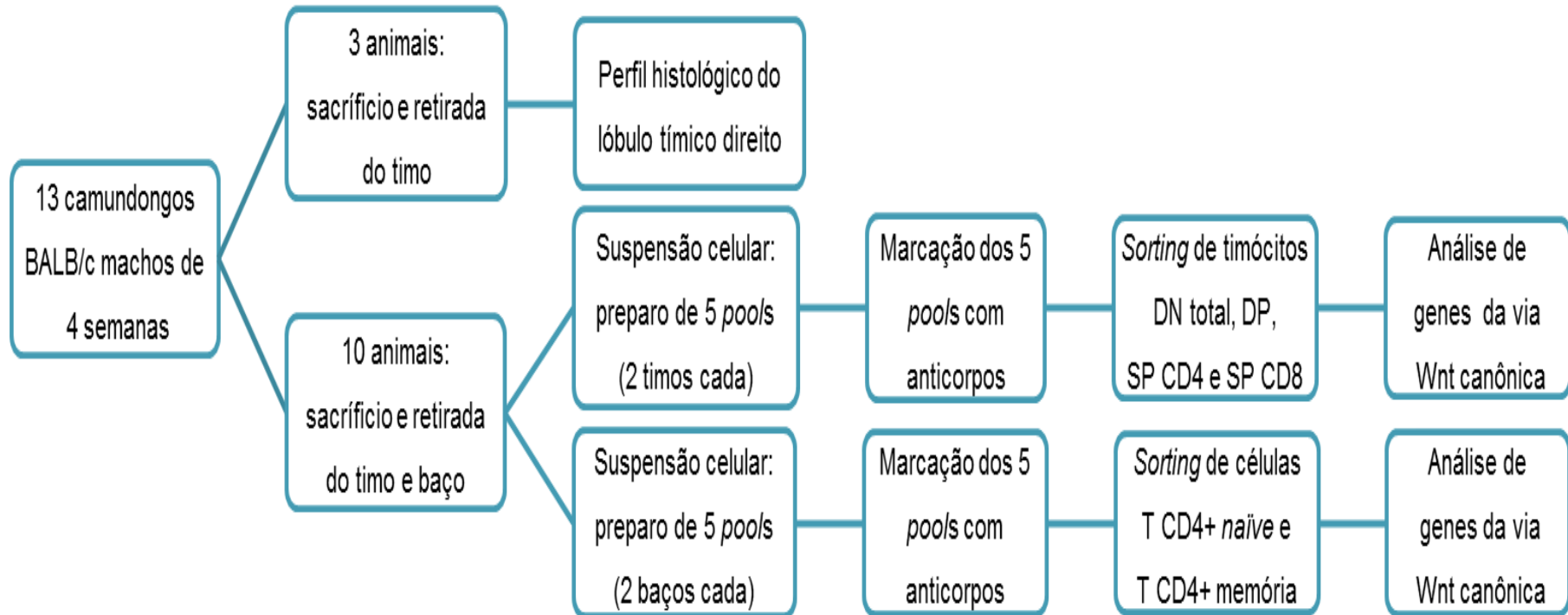
optamos pelo gene 18S, endógeno que apresentou menos variação de Ct em todas as reações. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. Depois fizemos o cálculo de $\Delta\Delta Ct$, onde subtraímos o valor ΔCt de uma população (esta pode ser uma população DN, DP, SP CD4, SP CD8 ou T CD4+ de memória) pelo valor de ΔCt médio da população T CD4+ *naïve*.

3.4.5 Análise estatística

Para a análise estatística da expressão de genes entre os grupos, utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. Foi considerada diferença significativa (estatística) entre grupos quando $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$ e $***p \leq 0.001$. Estas análises e também os gráficos foram feitos com o auxílio do programa Graph Prisma 6.0 (GraphPad Software, Inc, Estados Unidos).

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5 RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 Análises histológicas do lóbulo direito do timo

As análises histológicas foram realizadas nos timos de três animais, para ter certeza de que os órgãos dos animais do mesmo grupo e linhagem que utilizamos para a obtenção dos timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8, não apresentavam alterações estruturais. Histologicamente, o córtex possui coloração mais escura e contém muitos linfócitos imaturos que ofuscam a população de células epiteliais escassa; a medula é a região que apresenta uma coloração mais clara, com menor densidade celular do que o córtex, e contém mais células T mais maduras. Como pode ser observado na **figura 4**, não há alterações no tecido avaliado e todas as outras amostras também apresentaram o mesmo perfil histológico.

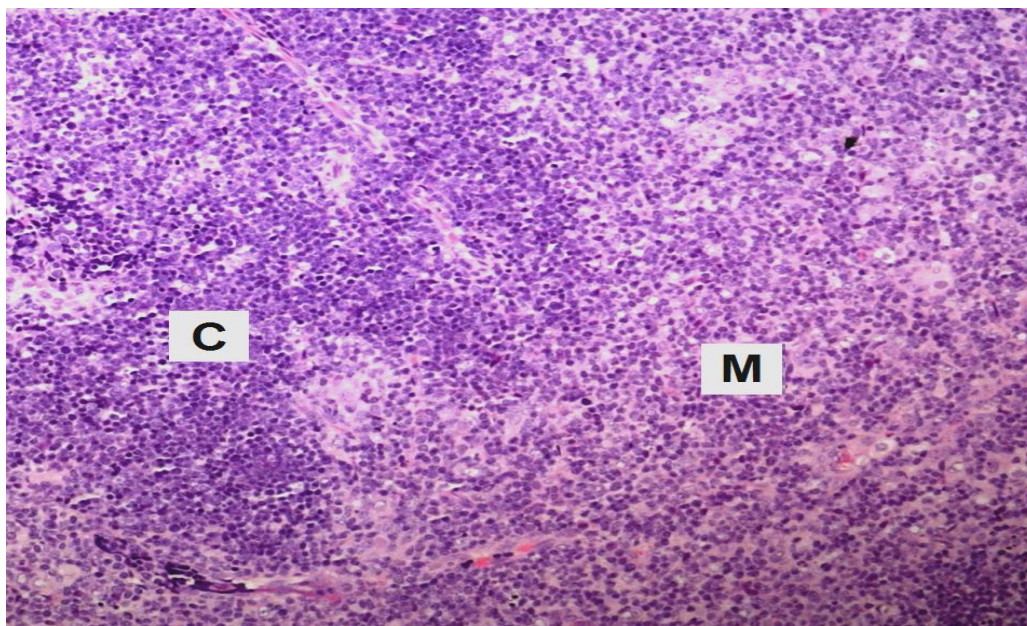


Figura 4. Corte histológico de lóbulo tímico direito de camundongo BALB/c. Os timos foram fixados com formol tamponado 10% e processados conforme descrição na seção de material e métodos. Foi utilizado o método de coloração hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas no microscópio ótico, com aumento total de 100X. **Medula (M); Córtex (C)**

RESULTADOS

5.2 Isolamento de timócitos e células T CD4+ periféricas

A **tabela 4** resume os valores de pureza de todas as amostras de timócitos e linfócitos T CD4+ periféricos. As figuras representativas das estratégias utilizadas para isolamento e análise da pureza das populações de timócitos e linfócitos T CD4+ periféricos podem ser observadas no **anexo C-J**. Todas as populações isoladas de amostras murinas apresentaram pureza acima de 90%, o que demonstra que realmente trabalhamos com amostras pouco contaminadas com outras populações.

Tabela 4. Valores de pureza para todas as amostras de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e células T CD4+ *naïve* e memória

<i>Pools</i>	Populações celulares					
	DN	DP	SP CD4	SP CD8	T CD4+ <i>naïve</i>	*T CD4+ memória
<i>Pool 1</i>	99%	95,9%	99,2%	99,3%	94%	>90%
<i>Pool 2</i>	98,5%	97,4%	98,7%	97,8%	95%	>90%
<i>Pool 3</i>	99,7%	91%	91,3%	99,7%	91%	>90%
<i>Pool 4</i>	99,4%	98,1%	98,3%	99,7%	91,7%	>90%
<i>Pool 5</i>	98,5%	96,4%	99,1%	97,8%	95,4%	>90%

***As populações de TEM e TCM foram adquiridas em tubos separados e após o final do procedimento, realizamos o teste de pureza de cada uma delas. Como todas as populações de memória tiveram pureza acima de 90%, consideramos o valor de >90% para este *pool*.**

5.3 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina

Avaliamos em timócitos e células T CD4+ *naïve* e memória, a expressão dos genes que codificam para várias proteínas da via Wnt/ β -catenina, como receptores da família Frizzled, co-receptores LRP, fatores de transcrição TCF/LEF, β -catenina, GSK-3 β , Bcl-x_L, ciclina D1 e HIG2.

RESULTADOS

Primeiro, avaliamos a expressão de genes que codificam para receptores da família de proteínas Frizzled. Na **figura 5**, podemos observar que Frizzled 5 é expresso em todas as populações celulares analisadas; entretanto, há maiores níveis de mRNA de Frizzled 5 em células T CD4+ *naïve* em relação aos timócitos SP CD8. Frizzled 6, outro membro da mesma família de receptores de membrana, está expresso em todas as amostras analisadas, mas notamos maior expressão de Frizzled 6 em timócitos DN do que em timócitos DP, SP CD8 e células T CD4+ *naïve*. Os níveis de mRNA de Frizzled 6 também são maiores em células T CD4+ de memória do que em T CD4+ *naïve*. O último membro da família Frizzled que investigamos foi o gene que codifica para Frizzled 10, outro receptor da via Wnt/ β -catenina e ligante da molécula HIG2 em humanos. Conforme a **figura 5**, os valores de expressão relativa para Frizzled 10 nas amostras avaliadas, estão abaixo de 2. A expressão de Frizzled 10 é maior em linfócitos T CD4+ *naïve* que em timócitos DP e SP CD8. A expressão de Frizzled 10 também é maior em timócitos SP CD4 em relação aos timócitos DP.

Posteriormente, avaliamos os co-receptores LRP5 e LRP6. O gene que codifica para o co-receptor LRP5 pôde ser detectado em todas as populações celulares, conforme **figura 6**. Mas este gene apresentou valores de expressão mais altos em timócitos DN e DP em relação os linfócitos T CD4+ periféricos (T CD4+ *naïve* e T CD4+ de memória). A expressão de LRP6 é também detectada em todas as populações celulares avaliadas, mas há maior expressão deste gene em timócitos DP do que em células T CD4+ *naïve*; e em timócitos SP CD4 do que em células SP CD8 e T CD4+ *naïve*.

Depois, averiguamos a expressão de genes que codificam para dois elementos importantes da via Wnt/ β -catenina: β -catenina e GSK-3 β . Na **figura 7**, vemos que o gene que codifica para β -catenina pode ser detectado em todas as populações celulares analisadas e os níveis de mRNA são maiores que 2 somente na população DP. Entretanto, há maiores níveis de mRNA em timócitos DN quando comparados aos timócitos DP; também a expressão de β -catenina é maior em timócitos DP em relação as populações SP CD8 e T CD4+ *naïve*. Em timócitos SP CD4 há maiores níveis de mRNA de β -catenina do que

RESULTADOS

em SP CD8. No que diz respeito ao gene que codifica para GSK-3 β , a população de timócitos DP também foi a única que apresentou valores de expressão relativa superiores a 2 e, ainda pode ser notado que a expressão neste tipo celular é maior do que as observadas em células SP CD8 e T CD4+ *naïve*.

Depois, analisamos os genes LEF-1, TCF-1 e TCF-4 da família de transcrição TCF/LEF. Como pode ser observado na **figura 8**, em todas as populações avaliadas, os níveis de mRNA de LEF-1 foram menores que 2. Entretanto, a expressão deste gene é maior em timócitos SP CD4 do que em timócitos DN e células T CD4+ de memória. Na mesma figura, é possível observar que TCF-1, outro membro da família TCF/LEF, apresentou valores de expressão relativa maiores que 2 em timócitos DN, DP e SP CD4. Há expressão aumentada de mRNA de TCF-1 em timócitos DN em comparação à SP CD8; também há expressão aumentada em timócitos DP em relação as populações SP CD8 e células T CD4+ periféricas. (T CD4+ *naïve* e T CD4+ de memória). Na **figura 8**, podemos observar que TCF-4 apresentou valor de expressão relativa de ao menos 14 vezes na timócitos DN e essa diferença é significativa em relação aos timócitos SP CD8. Os linfócitos T CD4+ de memória apresentaram valores de expressão relativa para TCF-4 acima de 6 e esse valor é significativamente maior em relação as células T CD4+ *naïve*.

Os últimos genes investigados foram os genes alvo da via Wnt/ β -catenina, Bcl-_{XL}, ciclina D1 e HIG2. Na **figura 9**, os níveis de mRNA de Bcl-_{XL} são maiores em timócitos DP e esta expressão é significativamente maior em timócitos SP CD8 e linfócitos T CD4+ *naïve*. Em linfócitos T CD4+ de memória, os níveis de mRNA de Bcl-_{XL} são significativamente maiores em relação a população T CD4+ *naïve*. No que diz respeito à ciclina D1, a expressão deste gene em quase todas as amostras analisadas foi menor que, 2 exceto para os linfócitos T CD4+ de memória, conforme **figura 9**. Pode ainda ser notada diferença significativa de expressão deste em células T CD4+ de memória em relação aos timócitos DP e SP CD4. Por fim, verificamos os níveis de mRNA de HIG2 em timócitos e linfócitos T CD4+. Na **figura 9**, podemos ver que quase todas as amostras analisadas apresentaram valores de expressão relativa

RESULTADOS

menores que 2. Mas o gene que codifica para HIG2 está moderadamente expresso em timócitos SP CD4 e esta expressão é significativa em relação às populações de timócitos DN e DP.

Na **figura 10**, podemos observar um *heat map* que resume o perfil de expressão para todos os genes e populações celulares avaliadas neste estudo. Os genes mais expressos estão representados em tons de vermelho e os menos expressos estão representados em tons de verde. Os genes representados na cor preta são aqueles cujo valor de expressão foi próximo ou igual 1, indicando que não houve aumento ou redução da expressão quando comparados aos linfócitos T CD4+ *naïve*. No *heat map*, podemos observar que as populações DN e DP apresentam perfil semelhante de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina, entretanto há diferenças em relação aos genes que codificam para Frizzled 6 e ciclina D1. O perfil de expressão de timócitos SP CD4 é semelhante às células T CD4+ de memória, com exceção dos genes que codificam para LEF-1, ciclina D1 e HIG2.

RESULTADOS

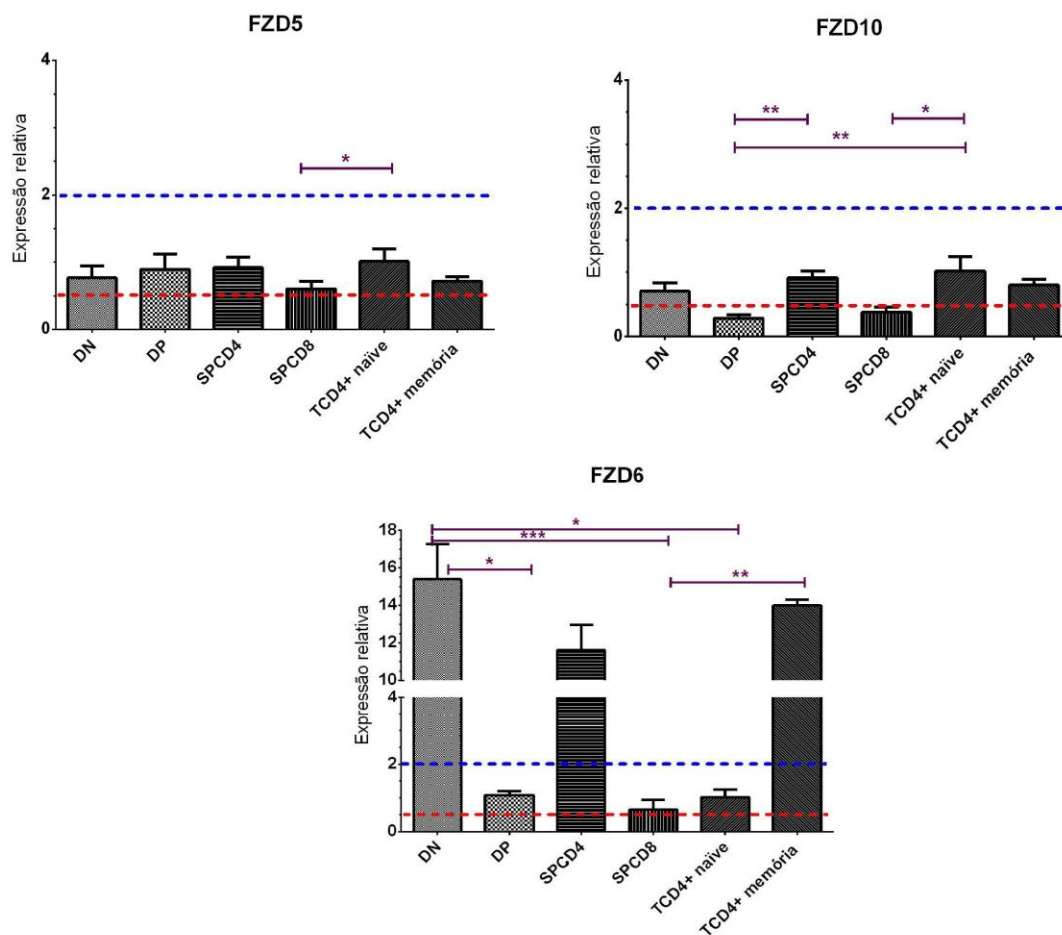


Figura 5. Expressão de Frizzled 5, Frizzled 6 e Frizzled 10 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Os valores de expressão gênica de cada população celular foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (calibrador). Nos grupos, as barras as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$; as linhas pontilhadas em vermelho representam o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 0,5$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo e as diferenças de expressão foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

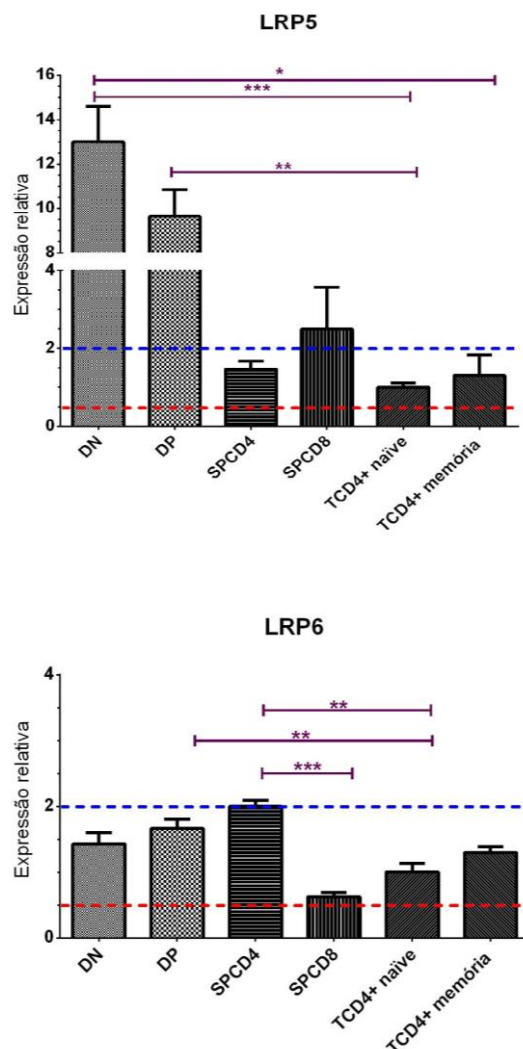


Figura 6. Expressão de LRP5 e LRP6 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Os valores de expressão gênica de cada população celular foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (calibrador). Nos grupos, as barras as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$; as linhas pontilhadas em vermelho representam o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 0,5$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo e as diferenças de expressão foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

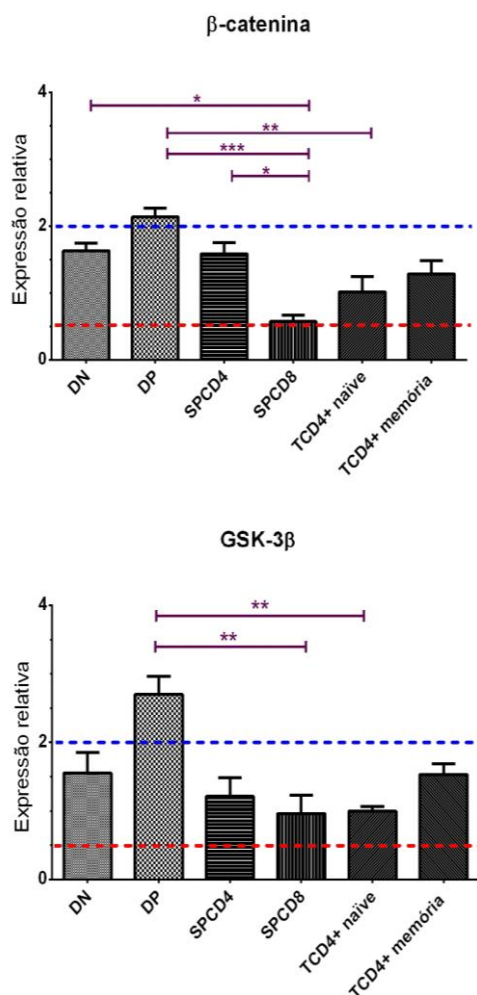


Figura 7. Expressão de β -catenina e GSK- β em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Os valores de expressão gênica de cada população celular foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (calibrador). Nos grupos, as barras as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$; as linhas pontilhadas em vermelho representam o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 0,5$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo e as diferenças de expressão foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

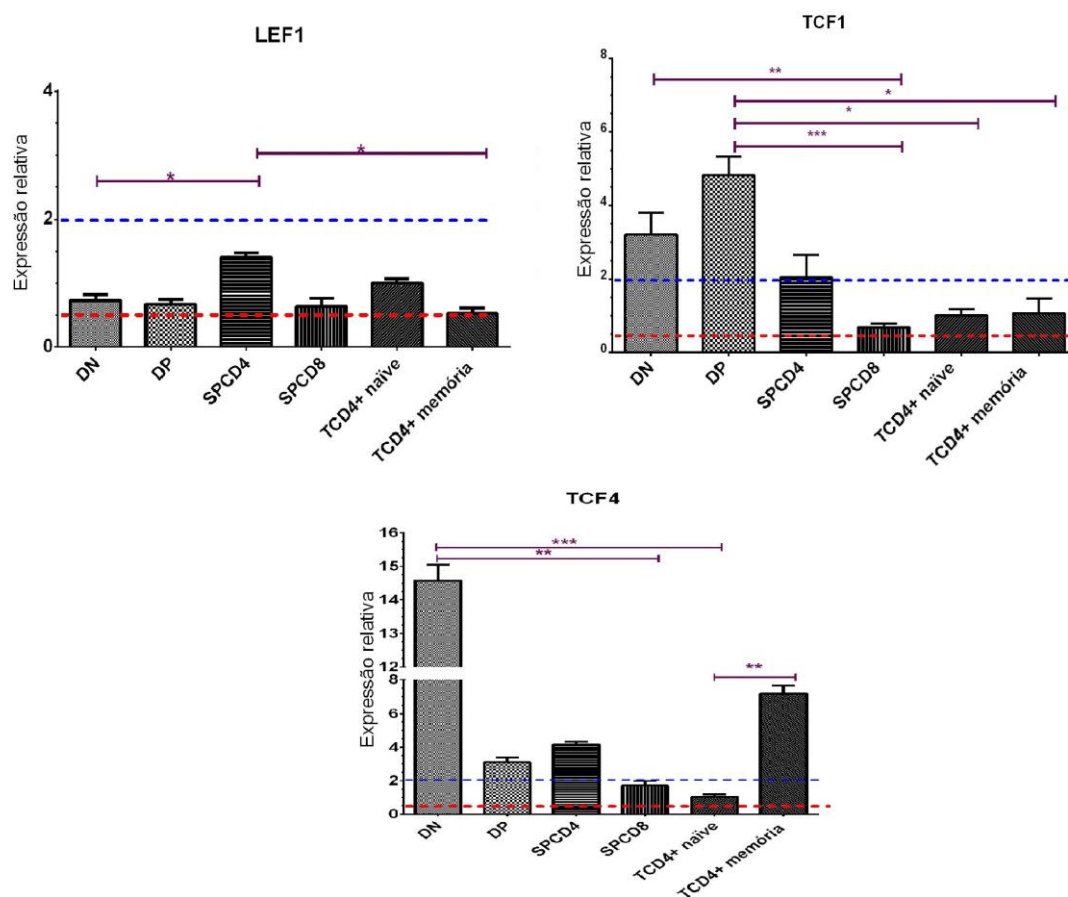


Figura 8. Expressão de LEF-1, TCF-1 e TCF-4 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Os valores de expressão gênica de cada população celular foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (calibrador). Nos grupos, as barras as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$; as linhas pontilhadas em vermelho representam o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 0,5$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo e as diferenças de expressão foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

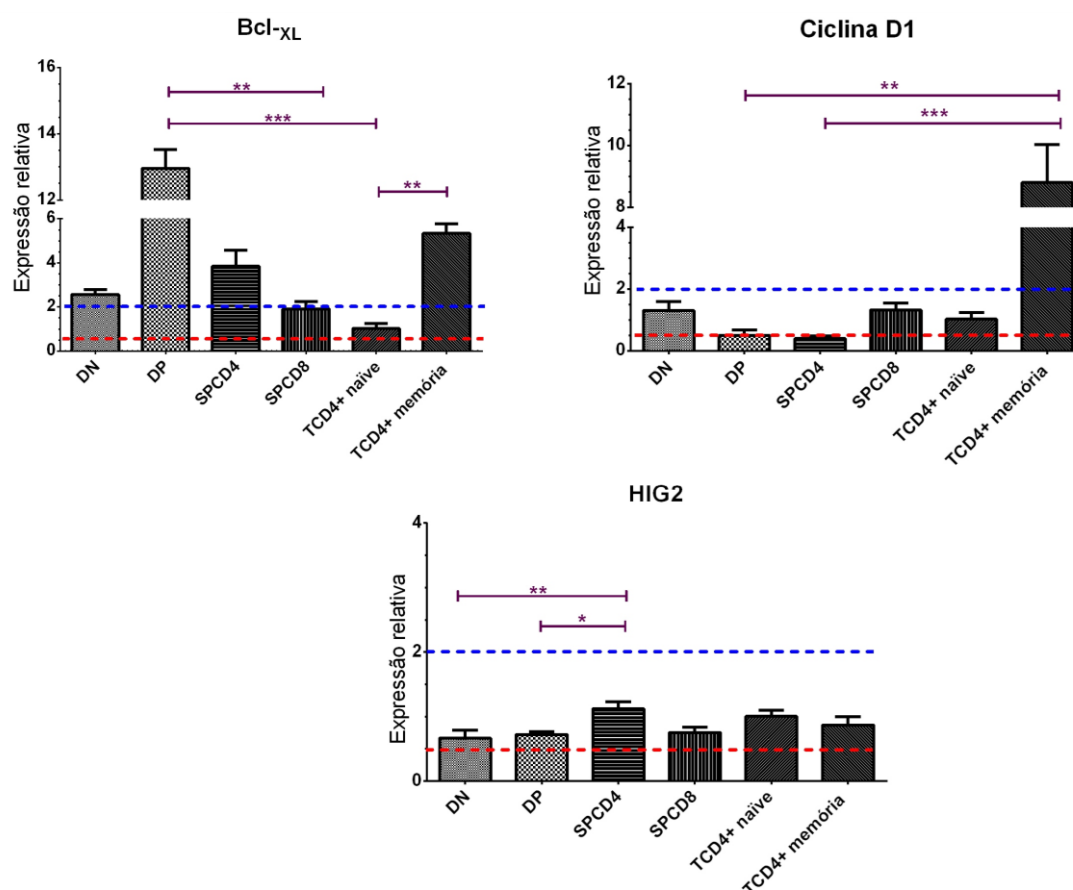


Figura 9. Expressão de Bcl-xL, ciclina D1 e HIG2 em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Os valores de expressão gênica de cada população celular foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (calibrador). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo e as diferenças de expressão foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

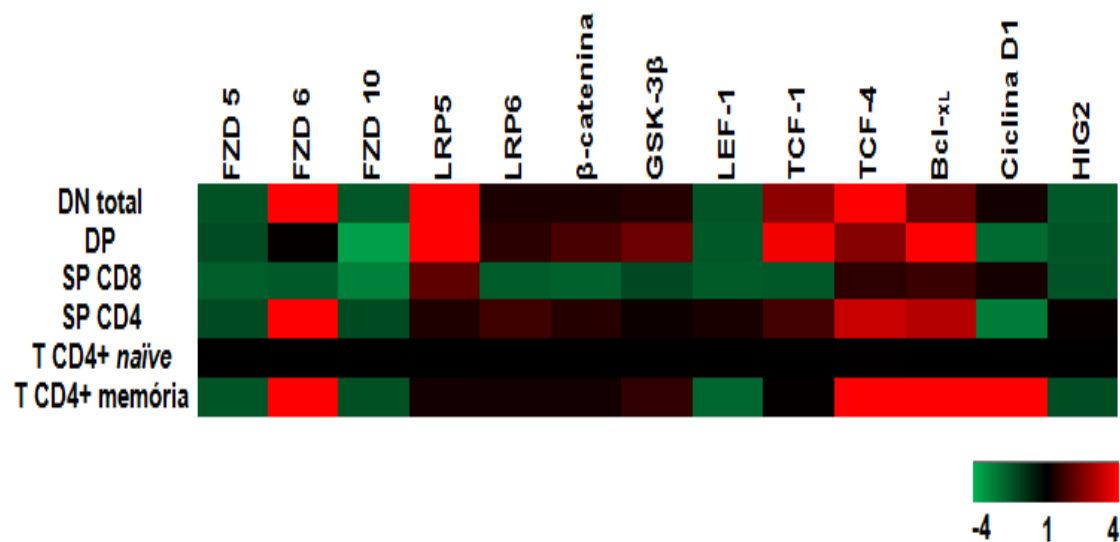


Figura 10. Representação do perfil de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos DN, DP, SP CD4 e SP CD8 e em linfócitos T CD4+ *naïve* e memória de murinos. Todos os genes que pertencem à via Wnt canônica e que analisamos em populações de timócitos e em células T CD4+ *naïve* e memória de murinos neste estudo foram agrupados e a representação da expressão gênica foi dividida em uma escala de -4 até 4. Os genes mais expressos estão representados em tons de vermelho e os menos expressos estão representados em tons de verde. Os genes representados na cor preta são aqueles cujo valor de expressão foi próximo ou igual 1, indicando que não houve aumento ou redução da expressão em comparação com a encontrada em linfócitos T CD4+ *naïve*.

6 DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Observamos que o perfil de expressão de elementos da via Wnt/ β -catenina é característico de cada subtipo celular. Na comparação de expressão gênica entre todos os subtipos celulares, nossos resultados demonstraram que em timócitos DN há aumento de expressão dos genes que codificam para Frizzled 6, LRP5, β -catenina, TCF-1 e TCF-4. Nos timócitos DP há aumento de LRP5, LRP6, β -catenina, GSK-3 β , TCF-1 e Bcl-_{XL}. Em timócitos SP CD4 foi detectada expressão aumentada de genes que codificam para Frizzled 10, LRP6, β -catenina, LEF-1 e HIG2 enquanto que na população de timócitos SP CD8 observamos expressão significativa de nenhum gene incluído neste estudo. As células T CD4+ *naïve* apresentaram expressão diminuída para os vários genes estudados; entretanto há expressão aumentada de Frizzled 5 e Frizzled 10 em relação a algumas populações celulares. Nos linfócitos T CD4+ de memória, detectamos maior expressão de Frizzled 6, TCF-4, Bcl-_{XL} e ciclina D1.

6.1 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos DN

Observamos que em timócitos DN há maior expressão dos genes que codificam para o receptor Frizzled 6, co-receptor LRP5, β -catenina e fatores de transcrição TCF-1 e TCF-4, como demonstram as **figura 5, 6 e 8** respectivamente e também o **anexo M**.

A expressão do receptor Frizzled 6 é maior em timócitos DN quando comparamos com as populações SP CD8 e T CD4+ *naïve*. Este dado obtido por nosso grupo corrobora os achados de Pongracz e colaboradores (Pongracz *et al.*, 2003). Estes autores avaliaram a expressão dos receptores Frizzled em timócitos isolados de camundongos BALB/c por PCR convencional e puderam observar maiores níveis de mRNA de Frizzled 6 em timócitos DN totais de camundongos.

O co-receptor LRP5 apresentou valor de expressão relativa maior que 12 em timócitos DN e há diferença significativa em relação aos linfócitos T CD4+ periféricos (TCD4+ *naïve* e memória). Este dado difere dos achados de Weerkamp e colaboradores (Weerkamp *et al.*, 2006); os autores constataram

DISCUSSÃO

que a expressão de mRNA de LRP5 detectada por RT-PCR convencional foi similar em todas as populações de timócitos de camundongos avaliadas.

Já nossos resultados sobre a expressão do gene *TCF7* que codifica para TCF-1 em timócitos DN, corroboram os achados de outros grupos, que demonstraram que este gene é muito expresso e importante para a sobrevivência de timócitos DN (Weber *et al.*, 2011, Germar *et al.*, 2011). Camundongos geneticamente deficientes para TCF-1 apresentaram uma redução drástica dos subtipos de timócitos DN comprometidos com a linhagem T (Germar *et al.*, 2011).

No que diz respeito ao gene *TCF7L2* que codifica para TCF-4, é possível observar que este fator de transcrição está mais expresso em timócitos DN quando comparamos aos demais membros da família TCF/LEF analisadas por nosso grupo (**anexo M**). Ademais, a expressão de mRNA de TCF-4 em timócitos DN é significativa quando comparamos com as populações SP CD8 e células T CD4+ *naïve*. Este dado é inédito, pois não encontramos estudos que abordem este gene em contextos ou amostras similares, mas acreditamos que este fator de transcrição da via Wnt/ β -catenina esteja envolvido na proliferação e sobrevivência de timócitos DN. Xie e colaboradores (Xie *et al.*, 2012) observaram que a inibição deste fator de transcrição induz a apoptose e inibe a proliferação celular em células SW480 (células de adenocarcinoma colorretal humanas) e HCT116 (células de câncer de cólon humanas). Ademais, muitos estudos apresentaram evidências da participação de fatores de transcrição e da via Wnt canônica na proliferação e sobrevivência de timócitos DN.

Em relação à via Wnt/ β -catenina, bloqueio na ativação desta via por várias metodologias como uso de camundongos geneticamente deficientes para TCF-1 (Schilham *et al.*, 1998), β -catenina (Xu *et al.*, 2003) ou Wnt1 e Wnt4 (Mulroy *et al.*, 2002) demonstraram que a proliferação dos subtipos de timócitos DN (DN2, DN3 e DN4) é altamente comprometida. Entretanto, os mecanismos pelos quais a via Wnt canônica regula a proliferação de timócitos permanecem desconhecidos, devido tanto à complexidade desta via de sinalização quanto ao fato do microambiente do timo não ser totalmente

DISCUSSÃO

compreendido (Ma *et al.*, 2012). Outro estudo de análise de expressão gênica por *microarray* em timócitos DN humanos identificou muitos fatores de transcrição indutores de proliferação, como por exemplo, c-fos e c-jun que são genes alvo da via Wnt (Staal *et al.*, 2004).

6.2 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos DP

Nossos dados demonstram que nos timócitos DP há maior expressão dos genes que codificam para LRP5, LRP6, β -catenina, GSK-3 β , TCF-1 e o fator antiapoptótico Bcl_{-XL}, conforme podemos observar nas **figuras 5-9** respectivamente e também o **anexo M**.

O gene que codifica para o co-receptor LRP5 apresentou valor de expressão relativa acima de 8 e esta expressão é significativamente maior que na população de linfócitos T CD4+ *naïve*; em relação ao LRP6, outro membro da mesma família, não observamos valores de expressão relativa maior ou igual a 2, mas os níveis de mRNA em timócitos DP são significativamente maiores em relação aos linfócitos T CD4+ *naïve*. Nossos dados não corroboram os achados de Weerkamp e colaboradores (Weerkamp *et al.*, 2006) que constataram que a expressão de mRNA de LRP5 e LRP6 foi similar em todas as populações de timócitos. Mas, em relação ao LRP6, nossos dados corroboram os achados Pongracz e colaboradores (Pongracz *et al.*, 2003) que observaram maior expressão de LRP6 em timócitos DP utilizando a técnica de PCR convencional e análise de densitometria de bandas para a quantificação da expressão de genes.

Nossas análises também demonstraram diferença significativa de expressão de mRNA de TCF-1 em timócitos DP quando comparados as populações SP CD8 e T CD4+ periféricas. Há muitos estudos que já indicaram a importância deste gene para a sobrevivência de timócitos DP murinos. Camundongos geneticamente deficientes em TCF-1 apresentaram um número reduzido de células T maduras na periferia e redução de células DP no timo (e um aumento de timócitos no estágio DN4 no timo) sugerindo que TCF-1

DISCUSSÃO

também tenha um papel importante na sobrevivência das células no estágio DP (Verbeek *et al.*, 1995, Schilham *et al.*, 1998)

Dos genes que codificam para outros membros da família TCF/LEF, TCF-4 aparenta estar 6 vezes mais expresso em relação a LEF-1, membro da mesma família de fatores de transcrição (TCF/LEF), conforme **anexo M**. Estudos demonstraram camundongos geneticamente deficientes para LEF-1 não apresentaram defeitos na maturação de timócitos e desenvolvimento de linfócitos T (Okamura *et al.*, 1998) e que camundongos deficientes para este gene apresentam apenas defeitos na proliferação de linfócitos B e estas células se apresentaram muito susceptíveis à apoptose. (Reya *et al.*, 2000)

Na **figura 9**, podemos notar que o gene que codifica para Bcl-_{XL} está mais expresso em timócitos DP em relação às outras populações celulares. Há significância de expressão quando realizamos a comparação de timócitos DP e SP CD8 e também de DP com células T CD4+ *naïve*. A Bcl-_{XL} é uma proteína parte da família Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993) e sua principal função é inibir a apoptose e regular proteínas relacionadas à apoptose, participando assim do sistema regulatório apoptótico (Zhang *et al.*, 2014). Atualmente, sabe-se que este fator antiapoptótico é crucial para sobrevivência dos timócitos DP e que a super-expressão de Bcl-_{XL} pode prolongar a sobrevivência destes timócitos (Strasser *et al.*, 1991, Shortman e Wu, 1996, Sun *et al.*, 2000, Xie *et al.*, 2005). Camundongos geneticamente deficientes para Bcl-_{XL} apresentaram apoptose maciça de células DP e conseqüentemente uma redução de células SP CD4 e SP CD8 no timo (Motoyama *et al.*, 1995).

O gene que codifica para β -catenina também apresentou expressão significativa em timócitos DP quando comparado as populações SP CD8 e T CD4+ *naïve*, apesar de termos observado níveis moderados de mRNA (expressão relativa próximo de 2) em timócitos DP. De acordo com Ioannidis e colaboradores (Ioannidis *et al.*, 2001), a atividade transcripcional de β -catenina também é importante para a sobrevivência dos timócitos DP, pois se sabe que a ativação da via Wnt canônica induz a expressão de Bcl-_{XL}, assim como a

DISCUSSÃO

deleção de TCF-1 também prejudicaria a ativação da via Wnt (ligação da β -catenina) e genes expressos após a ativação da mesma.

Pongracz e colaboradores (Pongracz *et al.*, 2006), reportaram que a interrupção da interação entre a β -catenina e TCF levou a um bloqueio da transição de timócitos DN para o estágio DP em FTOCs; já Hossain e colaboradores (Hossain *et al.*, 2008) relataram que camundongos transgênicos que expressam a proteína ICAT (que inibe a interação entre a β -catenina e TCF-1) em timócitos e linfócitos T, apresentaram aumento de células DN e diminuição de timócitos DP no timo. Também observamos expressão significativamente muito maior de GSK-3 β em timócitos DP quando comparamos com as populações SP CD8 e T CD4+ *naïve*, o que pode sugerir maior atividade transcripcional da via Wnt canônica nesta população celular.

6.3 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos SP CD4 e SP CD8

Em timócitos SP CD4 foi detectada expressão aumentada de genes que codificam para Frizzled 10, LRP6, β -catenina, LEF-1 e HIG2, como demonstram as **figuras 5-9** e **anexo M**.

Os níveis de mRNA de Frizzled 10 são moderados na população celular SP CD4, mas há diferença significativa em relação aos timócitos DP. Também detectamos expressão moderada de LRP6 em timócitos SP CD4, há significância quando comparamos a expressão deste mesmo gene em timócitos SP CD8. Outro gene que apresentou expressão moderada em timócitos SP CD4, mas com significância em relação à população DN foi LEF-1, membro da família de fatores de transcrição TCF/LEF. Estes dados obtidos por nosso grupo são inéditos.

O gene que codifica para β -catenina apresentou expressão moderada em timócitos SP CD4, porém significativamente maior que timócitos SP CD8. Mulroy e colaboradores (Mulroy *et al.*, 2003) reportaram que camundongos geneticamente modificados para expressão de β -catenina estabilizada

DISCUSSÃO

apresentaram aumento do número de timócitos SP CD4 e principalmente de SP CD8; nestes animais, a proteína β -catenina não apresentava sítios de fosforilação para GSK-3 β e portanto a capacidade da β -catenina de mediar a transcrição não era regulada pela GSK-3 β .

Entretanto, esta observação feita pelos autores não corrobora os achados do nosso grupo, pois apesar de termos observado expressão diferencial de genes que codificam para elementos da via Wnt/ β -catenina em timócitos SP CD4, somente foi possível observar que os genes que codificam para LRP5 e TCF-4 apresentaram valores de expressão relativa superiores a 2 e estas expressões não são significativamente diferentes em relação as demais populações celulares (**figuras 6 e 8**).

6.4 Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em linfócitos T CD4+ periféricos

Nas células T CD4+ *naïve* há expressão moderada de todos os genes da via Wnt canônica, entretanto é possível observarmos que há expressão aumentada dos receptores Frizzled 5 e 10 (**figura 5**). A expressão de Frizzled 5 em células T CD4+ *naïve* é maior em relação a população SP CD8. Frizzled 10, que pode atuar como ligante da proteína HIG2 em células T CD4+ humanas (Santos *et al.*, em preparação) ativando a via Wnt/ β -catenina, apresentou expressão significativamente maior em linfócitos T CD4+ *naïve* quando comparados aos timócitos DP e SP CD8.

Nas **figuras 5, 8 e 9**, nos linfócitos T CD4+ de memória, detectamos maior expressão de Frizzled 6, TCF-4, Bcl-X_L e ciclina D1 em relação aos demais elementos da via Wnt/ β -catenina. O valor de expressão relativa para Frizzled 6 é significativamente maior em linfócitos T CD4+ de memória relação à população SP CD8. Em relação ao gene que codifica para TCF-4, sua expressão é maior em linfócitos T CD4+ de memória em relação à população T CD4+ *naïve*. A expressão de Frizzled 6 e TCF-4 em linfócitos T CD4+ de memória não foi reportada por nenhum grupo até o momento, portanto estes dados são inéditos.

DISCUSSÃO

No que diz respeito à Bcl-_{XL}, a expressão deste gene é maior que a observada em células T CD4+ *naïve* (**figura 9**). Além da sua importância para a sobrevivência dos timócitos DP, este fator antiapoptótico também aumentaria a sobrevivência de células T ativadas (Boise *et al.*, 1995 e Weiss e Littman, 1994). Sabe-se que a estimulação do TCR leva à ativação das células T, resultando em proliferação e produção de IL-2, entretanto, as células T em proliferação, especialmente durante a fase S do ciclo celular são altamente susceptíveis a apoptose (Radvanyi *et al.*, 1996 e Boehme e Lenardo, 1993). Assim, o TCR emite sinais para aumentar a sobrevivência dos linfócitos T durante a ativação (Boise *et al.*, 1995, Weiss e Littman, 1994) e tais sinais seriam a produção de IL-2 (fator de sobrevivência extrínseco) e Bcl-_{XL} (fator de sobrevivência intrínseco) (Van Parijs *et al.*, 1996, Radvanyi *et al.*, 1996, Noel *et al.*, 1996). Porém, os sinais que regulam a expressão de Bcl-_{XL} no timo e na periferia seriam distintos (Wang *et al.*, 2012).

Na **figura 9**, vemos que o gene que codifica para ciclina D1 possui expressão aumentada em células T CD4+ de memória quando comparada aos timócitos SP CD4. As ciclinas são subunidades reguladoras das quinases dependentes de ciclina (CDKs) que exercem papel fundamental na coordenação do ciclo celular. A progressão das células mamíferas pela fase G1 do ciclo celular é governada por duas classes de ciclinas, as ciclinas D e E (Geng *et al.*, 2001). Atualmente, são conhecidas três tipos de ciclinas D: ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3. Estas três proteínas são codificadas por genes distintos (Inaba *et al.*, 1992 e Xiong *et al.*, 1992).

Sicinska e colaboradores (Sicinska *et al.*, 2003) relataram que camundongos geneticamente deficientes para ciclina D3 apresentaram redução do tamanho do timo, quantidade de timócitos DP, SP CD4 e SP CD8 reduzidos (mas não de células DN). Entretanto, camundongos transgênicos que super-expressavam o gene *CCND1* em tecidos epiteliais vieram a óbito em 4 meses em decorrência do aumento no peso do timo em até 40 vezes (10% do peso corporal total) quando comparados ao grupo controle, mas alterações em relação ao desenvolvimento de timócitos e linfócitos T não foram detectadas (Robles *et al.*, 1996 e Klug *et al.*, 2000).

DISCUSSÃO

6.5 Considerações finais

Podemos observar que cada população apresenta um perfil distinto de expressão gênica. As maiores semelhanças ocorrem entre os timócitos DN e DP onde as principais diferenças são a expressão de Frizzled 6 e ciclina D1, conforme podemos observar na **figura 10** que mostra um *heat map* da expressão dos elementos da via Wnt canônica em todas as populações analisadas.

Os timócitos SP CD4 e as células T CD4+ de memória apresentaram níveis semelhantes de expressão de genes que codificam para LEF-1, ciclina D1 e HIG2, o que não corrobora com a hipótese de que o perfil transcricional de timócitos SP CD4 e linfócitos T CD4+ *naïve* é semelhante. Ademais, não observamos expressão aumentada de HIG2 em linfócitos T CD4+ *naïve* comparados aos de memória, o que contrasta com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo no estudo de amostras humanas (Santos *et al.*, em preparação), sugerindo que camundongos não regulam a expressão de HIG2 como os seres humanos em linfócitos T CD4+.

Um das limitações deste trabalho foi a falta de análise das subpopulações de timócitos DN, i.e. DN1-DN4 e também o fato de termos analisado somente a expressão de mRNA nas amostras. Como o RNA é finalmente traduzido em proteína, pode-se supor – mas não garantir – que deve haver uma correlação entre o nível de mRNA e proteína (Greenbaum *et al.*, 2003). É provável que uma avaliação da expressão proteica, assim como o estado de fosforilação das proteínas (i.e. modificações pós-traducionais, observadas para as proteínas GSK-3 β e β -catenina) codificadas pelos genes abordados neste trabalho, possa fornecer resultados mais definitivos.

7 CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Nas análises de genes da via Wnt/ β -catenina em populações celulares isoladas de timo e baço de camundongos BALB/c, nosso grupo observou que o perfil de expressão de elementos da via Wnt/ β -catenina é característico de cada subtipo celular e que alguns genes são mais expressos quando comparados a outras populações:

-Em timócitos DN há aumento de expressão dos genes que codificam para Frizzled 6, LRP5, β -catenina,TCF-1 e TCF-4;

-Nos timócitos DP há aumento de LRP5, LRP6, β -catenina, GSK-3 β , TCF-1 e Bcl-XL;

-Em timócitos SP CD4 foi detectada expressão significativa de genes que codificam para Frizzled 10, LRP6, β -catenina, LEF-1 e HIG2 enquanto que na população de timócitos SP CD8 apresentaram expressão reduzida de muitos genes da via Wnt/ β -catenina;

- Nas células T CD4+ *naïve* há expressão aumentada de Frizzled 5 e Frizzled 10 e nos linfócitos T CD4+ de memória, detectamos maior expressão de Frizzled 6, TCF-4, Bcl-XL e ciclina D1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amit S. *et al.* Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*, 16:1066–1076, 2002 ;
- Anderson G. *et al.* Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunology*. 14:73–99, 1996;
- Anderson M.S. *et al.* Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 298:1395–1401, 2002;
- Andrade C.F. *et al.* Thymic alterations in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Cell Immunol*. May-Jun; 253(1-2):1-4, 2008;
- Ashkar S. *et al.* Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, vol. 287, no. 5454, p. 860–864, 2000;
- Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. Mar 19; 392(6673):245-252, 1998;
- Balciunaite G. *et al.* Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunology*. Nov; 3(11):1102-8, 2002;
- Behrens J. *et al.* Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. Aug 15; 382(6592):638-642, 1996;
- Boehme S.A., Lenardo M.J. Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. *Eur J Immunol*. Jul; 23(7):1552-1560, 1993;
- Boise L.H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. Jul; 3(1):87-98, 1995;
- Brito V.N. *et al.* Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. *Med Mycol.*, 41, p.83–87, 2003;
- Brockner T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 186, p.1223–1232, 1997;
- Broere F. *et al.* T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*, pp 15-27, 2011;
- Brunner E. *et al.* Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 385: 829–833, 1997;
- Cavallo R.A. *et al.* *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*; 395: p.604–608, 1998;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chatterjee I. *et al.* Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via β -catenin and CYCLIN-D1 signaling. *Mol Cancer*. May 11; 10:51, 2011;
- Chien A. J. *et al.* A Wnt Survival Guide: From Flies to Human Disease *J Invest Dermatology*. *J Invest Dermatology*. July; 129(7): 1614–1627, 2009;
- Ciofani M., Zúñiga-Pflücker J.C. A survival guide to early T cell development. *Immunology Res*. 34(2):117-132,2006;
- Ciofani M., Zúniga-Pflucker J.C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 23, p. 463–493, 2007;
- Cruciat C.M., Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Mar 1;5(3):a015081, 2013;
- De Boer *et al.* Quantifying T Lymphocyte Turnover. *Journal of theoretical biology* 327 (2013): 45–87;
- Den Braber I. *et al.* Maintenance of peripheral *naïve* T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*. Feb 24; 36(2):288-97, 2012;
- Denko N. *et al.* Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res*. 6: 480–487, 2000;
- Derbinski J. *et al.* Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunology*. Nov; 2(11):1032-1039,2001;
- Derbinski J. *et al.* Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med*. 202:33–45, 2005;
- De Rosa S.C. *et al.* 11-Color, 13-parameter flow cytometry: identification of human *naïve* T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med*. 7, 245–248, 2001;
- Eisenmann D.M. Wnt signaling (June 25, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*;
- Eldar-Finkelman H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med*. Mar; 8(3):126-132, 2002;
- Force T., Woodgett J.R. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem*. Apr 10; 284(15):9643-9647, 2009;
- Francis I.R *et al.* The thymus: reexamination of age-related changes in size and shape. *Am J Roentgenol*. 145:249–254, 1985;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fredriksson R. *et al.* The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63:1256–1272,2003;

Galceran J. *et al.* Wnt3a-/-like phenotype and limb deficiency in Lef1 (-/-) Tcf1 (-/-) mice. *Genes Dev.*13:709–717, 1999;

Gameiro J., Nagib P., Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation *Cell Adh Migr.* Jul-Sep; 4(3): 382–390, 2010;

Geng, Y. *et al.* Deletion of the p27Kip1 Gene Restores Normal Development in Cyclin D1-Deficient Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.1: 194–199, 2001;

Germar, K. *et al.* T-Cell Factor 1 Is a Gatekeeper for T-Cell Specification in Response to Notch Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.50: 20060–20065,2011;

Goldrath A.W., Bevan M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* Nov 18; 402(6759):255-262, 1999;

Gordon J., Manley N. R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis *Development.*September 15; 138(18): 3865–3878,2011;

Gowans J.L. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 146: 54–69, 1959;

Greenbaum D. *et al.* Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.*; 4(9):117, 2003;

Hadrup S., Donia M., Straten P.T. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* ;6:123–133, 2013;

He X. *et al.* LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England).*4; 131:1663–1677, 2004;

Henderson B.R., Fagotto F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO reports.* 3:834–839, 2002;

Hossain M.Z. *et al.* ICAT expression disrupts beta-catenin-TCF interactions and impairs survival of thymocytes and activated mature T cells. *Int Immunology:* 20:925–935, 2008;

Huang H.C, He X. Wnt/beta catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* Apr; 20(2):119-25, 2008;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Huang H.C., Klein P.S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 5(7):234, 2004;
- Huber O. *et al.* Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59: 3–10, 1996;
- Huh Sung-Ho, Ornitz D. M. β -catenin deficiency causes DiGeorge syndrome-like phenotypes through regulation of Tbx1. *Development*. April 1; 137(7): 1137–1147, 2010;
- Iezzi G., Scheidegger D., Lanzavecchia A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 193:987–993, 2001;
- Inaba T. *et al.* Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*. Jul; 13(3):565–754, 1992;
- Ikawa T. *et al.* An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science (New York, N.Y.)* 329:93–96, 2010;
- Ikeda S. *et al.* Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* Mar 2; 17(5):1371–1384, 1998;
- Ioannidis V. *et al.* The beta-catenin-TCF-1 pathway ensures CD4 (+) CD8 (+) thymocyte survival. *Nature Immunology*. 2(8):691–697, 2001;
- Joep R., Johnson G. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004 Feb; 29(2):95–102;
- Joep R. *et al.* Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochemical Research* 32: 577–595, 2007;
- Kalia V., Sarkar S., Ahmed R. CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections. In: Zanetti M, Schoenberger SP, (eds). *Advances in Experimental Biology Landes Bioscience: Texas, USA*; p79–95, 2010;
- Kenny P.A., Enver T., Ashworth A. Receptor and secreted targets of Wnt-1/ β -catenin signalling in mouse mammary epithelial cells. *BMC Cancer*. 5:3, 2005;
- Kishida M. *et al.* A Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase I ϵ . *J Biol Chem*. Aug 31; 276(35):33147–55, 2001;
- Klebanoff C.A., Gattinoni L., Restifo N.P. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev.* ; 211:214–224, 2006;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci* 93: 8455–8459, 1996;
- Klug D.B. *et al.* Transgenic expression of cyclin D1 in thymic epithelial precursors promotes epithelial and T cell development. *J Immunology*. Feb 15; 164(4):1881-8, 2000;
- Korinek V. *et al.* Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* 18:1248–1256, 1998;
- Krogsgaard M., *et al.* A role for “self” in T-cell activation. *Semin. Immunol.* 19: 236–244, 2007;
- Kurebayashi S. *et al.* Retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10132-10137, 2000;
- Lee J.S., Ishimoto A., Yanagawa S. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem.* Jul 23; 274(30):21464-70, 1999;
- Li L., Leid M., Rothenberg E.V. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science (New York, N.Y.)* 2010;329:89–93;
- Liston A. *et al.* Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunology*. 4:350–354, 2003;
- Liu C. *et al.* Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 108:837–847, 2002;
- Livák F. *et al.* Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol.* Mar 1; 162(5):2575-80, 1999;
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 25 (4):402-8, 2001;
- Luis T.C. *et al.* Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* ; 113:546–54, 2009;
- Ma J. *et al.* β -catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* December; 7(4): 750–762, 2012;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MacDonald B.T., Tamai K., He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. Jul; 17(1):9-26. 2009;
- Mao J. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*. Apr; 7(4):801-809,2001;
- Marieb E. N., Hoehn, K. *Anatomia e Fisiologia(**)*, 3ª ed., Ed. Artmed, RS,2009;
- Masopust D. *et al.* Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* 23.March: 291 (5512), 2413-2417,2001;
- Matsui N. *et al.* Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia. *J Neuroimmunol*. Apr 15;269(1-2):56-61,2014;
- Molenaar M. *et al.* XTCF-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86: 391–399, 1996;
- Moon R.T. *et al.* WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5: 691–701, 2005;
- Motoyama N. *et al.* Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267:1506-1510, 1995;
- Mulroy T. *et al.* Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunology*. 32:967–71, 2002;
- Mulroy T. *et al.* β -Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol.*15 (12): 1485-1494,2003;
- Nagib P.R. *et al.*Thymic microenvironment alterations in experimentally induced diabetes. *Immunobiology*. 2010;
- Napolitano L.A. *et al.* AIDS: Increased thymic mass and circulating *naïve* CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. ; 16:1103–1111,2002;
- Nitta T. *et al.* Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Advances in Immunology*. 99:59–94, 2008;
- Noel P.J. *et al.* CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation.*J Immunol*. Jul 15; 157(2):636-642, 1996;
- Nunes-Alves C. *et al.* Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunology*. 2013 Oct;34(10):502-10;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Okamura R.M. *et al.* Redundant regulation of T cell differentiation and TCR α gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF. *Immunity*. 1998; 8:11;
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27; 74(4):609-19;
- Oosterwegel M. *et al.* Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development*. 118: 439–44, 1993;
- Papkoff J., Aikawa M. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 29; 247(3):851-858, 1998;
- Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. ; 34(5):504-14, 2006;
- Petrie H.T., Zúñiga-Pflücker J.C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunology*. 25:649–67, 2007;
- Pongracz J.E. *et al.* Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur J Immunol.*; 36: 2376–83, 2006;
- Pongracz J.E. *et al.* Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes. *Eur J Immunology*. 33:1949-1956, 2003;
- Powell S.M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359:235 237, 1992;
- Pu P. *et al.* Downregulation of Wnt2 and beta-catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Ther.*, 16:351-361, 2009;
- Radvanyi L.G. *et al.* CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunology*. Mar 1; 156(5):1788-1798, 1996;
- Rayasam, G. V. *et al.* Glycogen Synthase Kinase 3: More than a Namesake. *British Journal of Pharmacology* 156.6: 885–898, 2009;
- Reinhardt R.L. *et al.* Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 410:101–105, 2001;
- Reya T. *et al.* Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13: 15–24, 2000;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Robles A.I. *et al.* Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7634, 1996;
- Roose J. *et al.* The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, 395, 608–612, 1998;
- Rothenberg E.V., Moore J.E., Yui M.A. Launching the T-cell lineage developmental programme. *Nature reviews*. 8:9–21,2008;
- Sallusto F. *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401:708–712, 1999;
- Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 22:745–763, 2004;
- Santos *et al.*, manuscrito em preparação;
- Sareddy G.R. *et al.* Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. *Neurochem Int* , 55:307-317, 2009;
- Savino W. *et al.* Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*. Sep; 19(9):1727-33, 1989;
- Savino W. *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr*98:11–16, 2007;
- Sawicka M. *et al.* From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection. *Front Immunol.*; 5: 19,2014;
- Swain S.L. *et al.* Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors *Science*, 286, pp. 1381–1383, 1999;
- Sprent J. Immunological memory. *Curr Opin Immunol*, 9, pp. 371–379,1997;
- Schilham M.W. *et al.* Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunology*.161(8):3984–3991,1998;
- Shortman K., Wu L. Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev. Immunology.*, 14 , pp. 29–47,1996;
- Sicinska E. *et al.* Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell*.Dec; 4(6):451-461, 2003;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Smith S.H. *et al.* Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology*. May; 58(1):63-70, 1986;
- Staal F.J. *et al.* Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol* 172:1099–1108, 2004;
- Staal F.J., Clevers H.C. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunology*. Jan; 5(1):21-30, 2005;
- Stadeli R., Hoffmans R., Basler K.. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol.*; 16:R378–385, 2006;
- Stanley S.K. *et al.* Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Exp Med*. 1993;178(4):1151–1163;
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 9:271-296, 1991;
- Strasser A. *et al.* bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*. Nov 29; 67(5):889-899, 1991;
- Sun L. *et al.* Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein & Cell* May 2013, Volume 4, Issue 5, pp 342-355;
- Sun Z. *et al.* Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288: 2369-2373, 2000;
- Swainson L. *et al.* IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes *J Immunology*. Jun 1; 176(11):6702-8, 2006;
- Tan J.T. *et al.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of *naïve* T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8732–8737, 2001;
- Tao X. *et al.* Strength of TCR Signal Determines the Costimulatory Requirements for Th1 and Th2 CD4+ T Cell Differentiation. *Journal of Immunology*, vol. 159, no. 12, pp. 5956–5963, 1997;
- Togashi A. *et al.* Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res*. 65(11):4817-4826, 2005;
- Travis A. *et al.* LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function *Genes Dev.*, 5, pp. 880–894, 1991;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Valenta T. *et al.* The Many Faces and Functions of B-Catenin. *The EMBO Journal* 31.12: 2714–2736, 2012;
- Van de Wetering M. *et al.* Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box *EMBO J.*, 10, pp. 123–132, 1991;
- Van de Wetering M. *et al.* Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88: 789–799, 1997;
- Van Parijs L. *et al.* The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*. Mar; 4(3):321-8, 1996;
- Verbeek S. *et al.* An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature*. 374:70, 1995;
- Wack A. *et al.* Early onset of CD8 transgene expression inhibits the transition from DN3 to DP thymocytes. *J. Immunol.* 165:1236–124, 2000;
- Wada A. GSK-3 inhibitors and insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. *Front Biosci (Landmark Ed)*. Jan 1; 14():1558-70, 2009;
- Wang R. *et al.* Transcription factor network regulating CD4+CD8+ thymocyte survival *Crit Rev Immunology*. 31(6): 447–458, 2011;
- Wang, R. *et al.* Developing and Activated T Cell Survival Depends on Differential Signaling Pathways to Regulate Anti-Apoptotic Bcl-xL. *Clinical and Developmental Immunology*: 632837, 2012;
- Waterman M.L. *et al.* A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor α enhancer *Genes Dev.*, 5, pp. 656–669, 1991;
- Weerkamp F. *et al.* Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 28; 103(9):3322-6, 2006;
- Weiss A., Littman D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. Jan 28; 76(2):263-74, 1994;
- Weber, B.N. *et al.* A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* 476: 63-68, 2011;
- Werlen G. *et al.* Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science*. 2003 Mar 21; 299(5614):1859-1863;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wodaz A., Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 59–88, 1998;
- Xie H. *et al.* Stabilized beta-catenin extends thymocyte survival by up-regulating Bcl-xL. *J Immunology.* 2005 Dec 15;175(12):7981-8;
- Xie, J. *et al.* Inhibition of Tcf-4 Induces Apoptosis and Enhances Chemosensitivity of Colon Cancer Cells. Ed. Wael El-Rifai. *PLoS ONE* 7.9 (2012): e45617;
- Xiong Y. *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics.* Jul; 13(3):575-584,1992;
- Xu, Y. *et al.* Deletion of β -catenin impairs T cell development. *Nat. Immunology.* 4: 1177-1182, 2003;
- Xu, X. *et al.* Maturation and Emigration of Single-Positive Thymocytes. *Clinical and Developmental Immunology.* 282870, 2013;
- Yanagawa S. *et al.* Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J.* 2002; 21:1733–1742;
- Yang L. H. *et al.* Axin downregulates TCF-4 transcription via beta-catenin, but not p53, and inhibits the proliferation and invasion of lung cancer cells. *Mol Cancer.* 9:25,2010;
- Ying Y., Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics.*4:307-312,2009;
- Yost C. *et al.* The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996; 10:1443–
- Young W. Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplant.* 18(9):951-975, 2009;
- Youngblood B. *et al.* T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology.* 139:277–284, 2013;
- Yu Q., Sharma A., Sen J.M. TCF1 and beta-catenin regulate T cell development and function. *Immunology Res.* Jul; 47(1-3):45-55, 2010;
- Zhang, K. *et al.* Bcl-xL Overexpression and Its Association with the Progress of Tongue Carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7.11: 7360–7377, 2014.

9.1 Anexo A

3883/13/008

**APROVAÇÃO**


O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **08/05/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **174/13** intitulado: **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIG2 E ELEMENTOS RELACIONADOS À VIA WNT/ β -CATENINA EM CÉLULAS PRECURSORAS DE LINFÓCITOS T”** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Edecio Cunha Neto

Pesquisador (a) Executante: Taccyanna Mikulski Ali

CEP-FMUSP, 13 de Maio de 2013.


Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fm@usp.br


COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
13/06/13
Edecio

ANEXOS

9.2 Anexo B



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11)3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br




São Paulo, 01 de agosto de 2013.

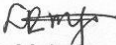
Ilmo. (a)
Dr. Edecio Cunha Neto
(aos cuidados de Taccyanna Mikulsi Ali)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/188** "Análise da expressão de HIG2 e elementos relacionados à via Wnt/beta-catenina em células precursoras de linfócitos T", sob a sua responsabilidade.

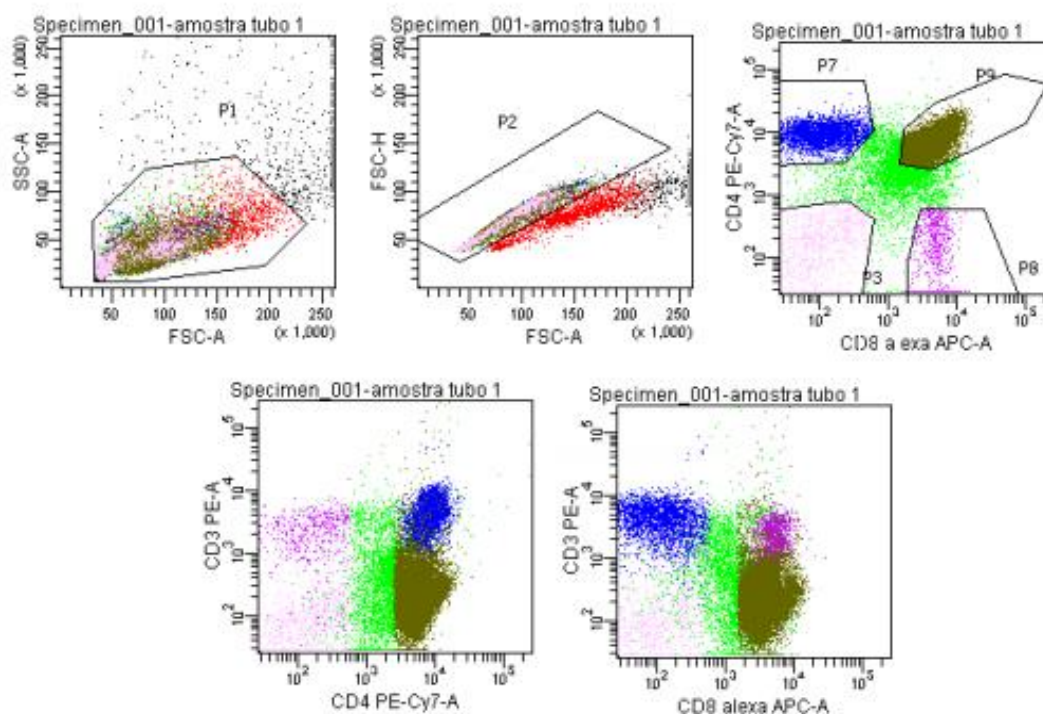
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente
Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

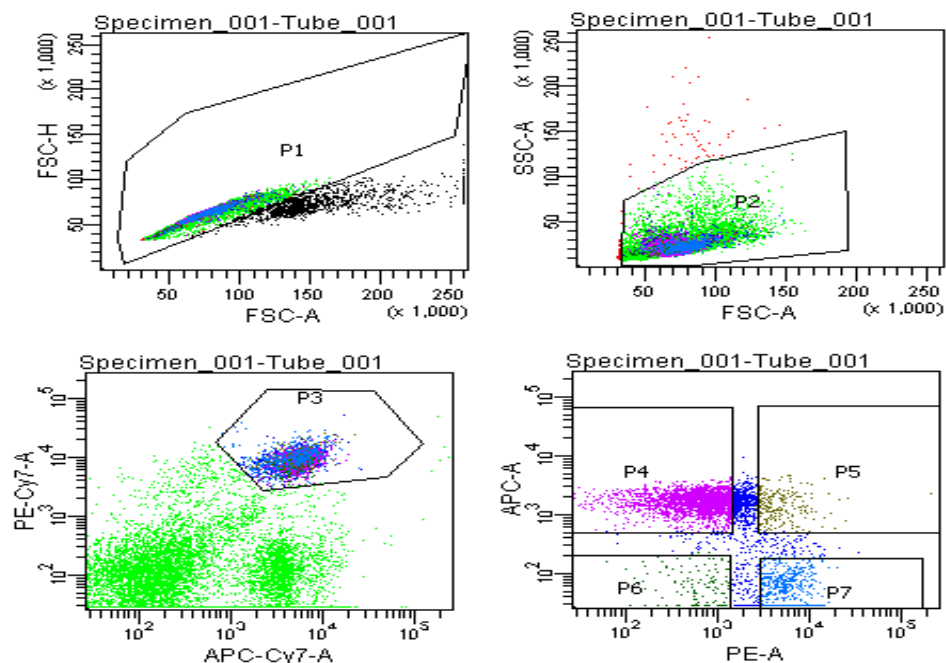

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

9.3 Anexo C



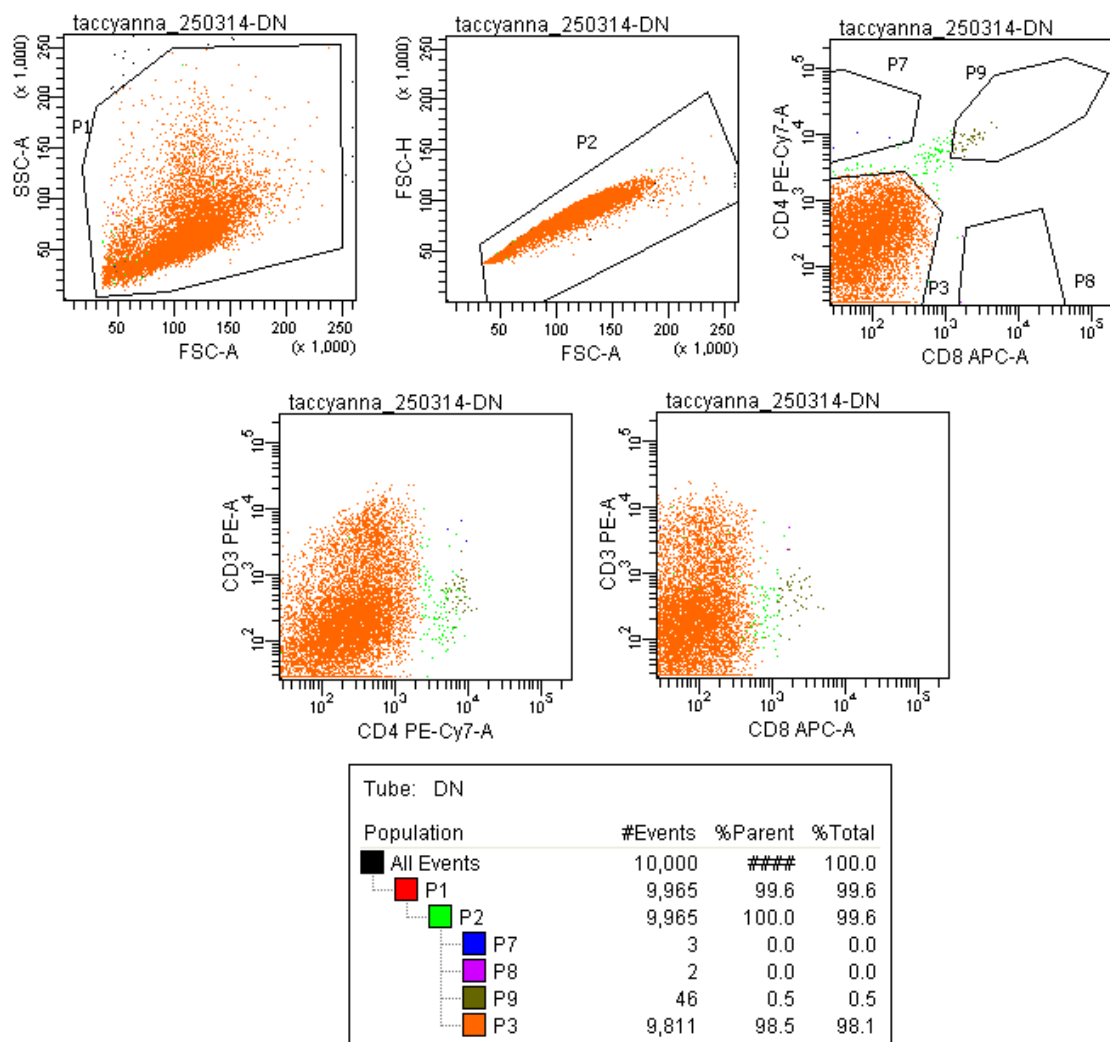
Estratégia adotada por nosso grupo para a determinação e isolamento das populações DN, DP, SP CD4 e SP CD8 de camundongos. Durante a aquisição das células, foi desenhado um *gate* na população de progenitores linfocitários, estabelecido com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). O *gate* P1 se refere à população de linfócitos e monócitos na amostra e P2 à população *singlets* na amostra. O *gate* P3 se refere à população DN; P9 aos timócitos DP; o *gate* P7 ao timócitos SP CD4; e P8 à população SP CD8.

9.4 Anexo D



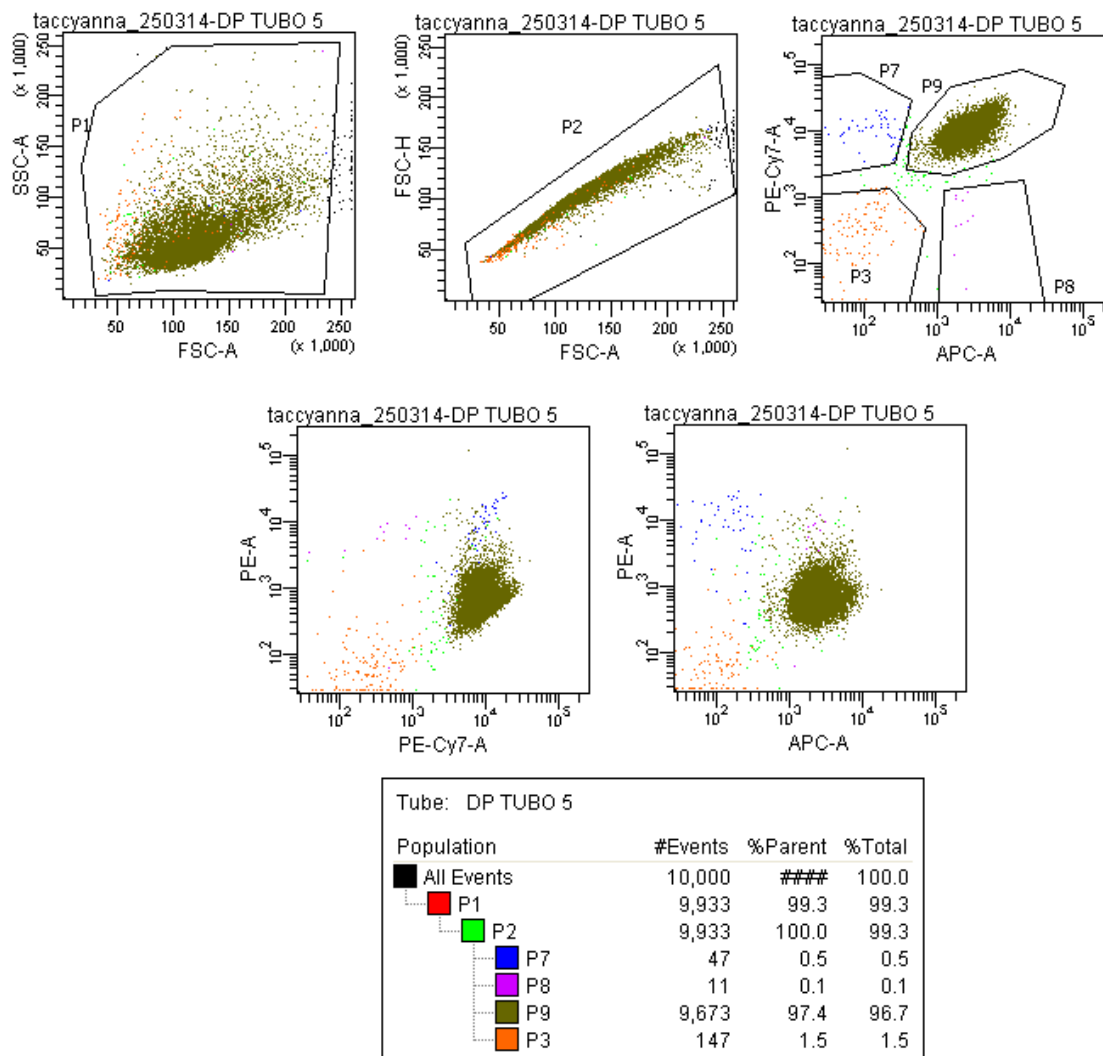
Estratégia de *gate* para isolamento de células T CD4+ *naïve* e TCD4 + de memória de camundongos. Durante a aquisição das células, foi desenhado um *gate* na população de progenitores linfocitários, estabelecido com base nos parâmetros de tamanho (FSC) por granularidade (SSC). O *gate* P1 se refere à população de linfócitos e monócitos na amostra e P2 à população *singlets*. O *gate* P3 engloba as células que expressam os marcadores CD3 e CD4. O *gate* P4 se refere à população de células T CD4+ *naïve* e P5-P7 engloba os linfócitos T CD4+ de memória.

9.5 Anexo E



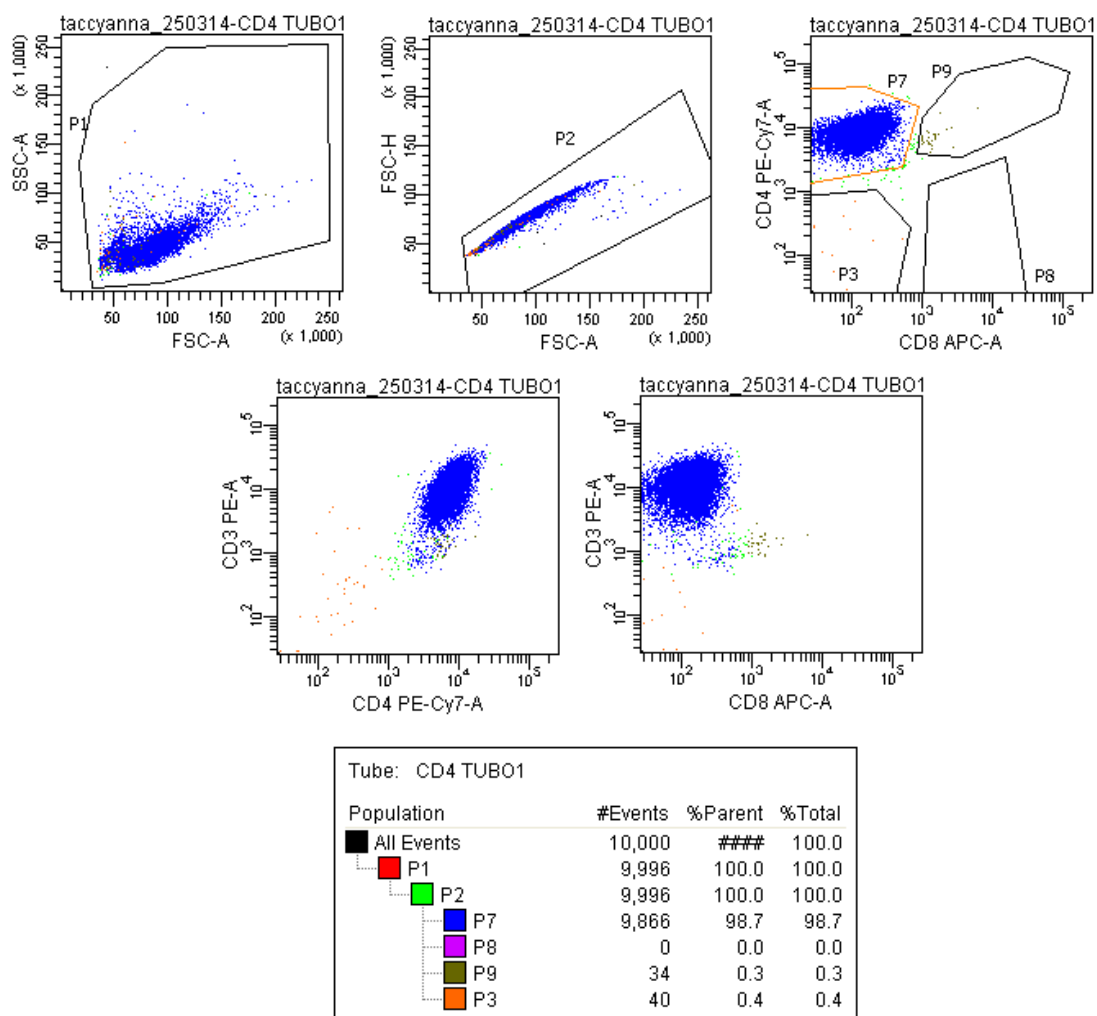
Análise da pureza da população dupla negativa (DN) isolada a partir de timócitos murinos – pool 2. O gate P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população dupla negativa (DN) está representada no gate nomeado como P3. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a 98,5% na amostra.

9.6 Anexo F



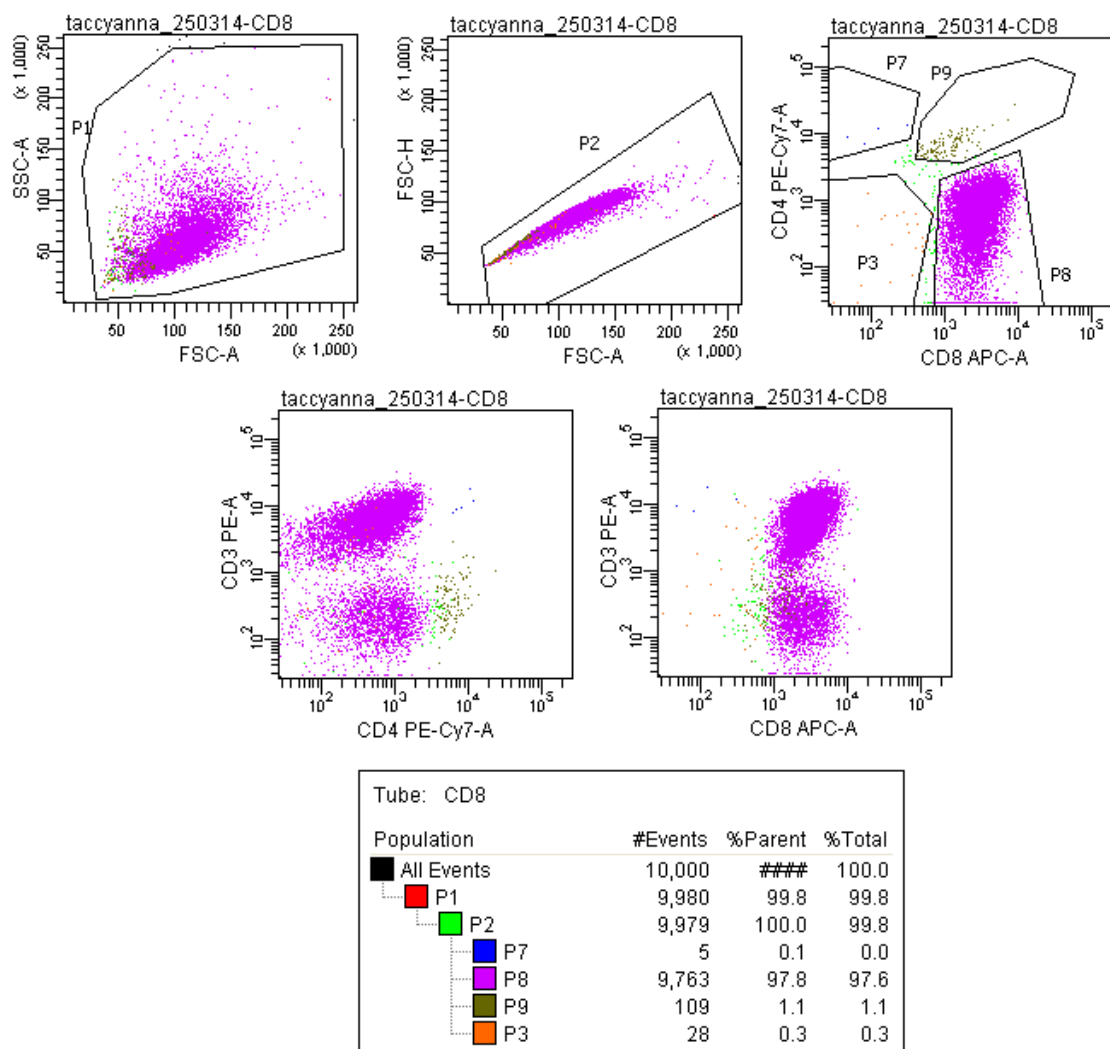
Análise da pureza da população dupla positiva (DP) isolada a partir de tímócitos murinos – pool 2. O gate P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população dupla positiva (DP) está representada no gate nomeado como P9. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a 97,4% na amostra.

9.7 Anexo G



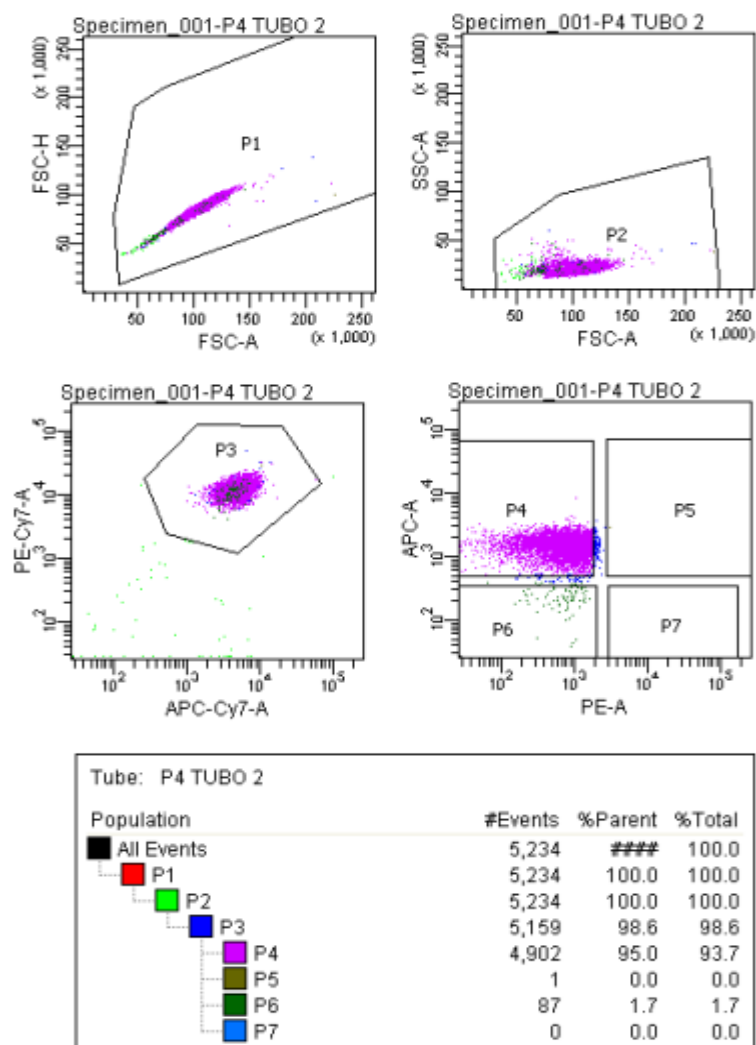
Análise da pureza da população simples positiva para CD4 (SP CD4) isolada a partir de timócitos murinos – *pool 2*. O *gate* P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população simples positiva para CD4 (CD4) está representada no *gate* nomeado como P7. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a 98,7% na amostra.

9.8 Anexo H



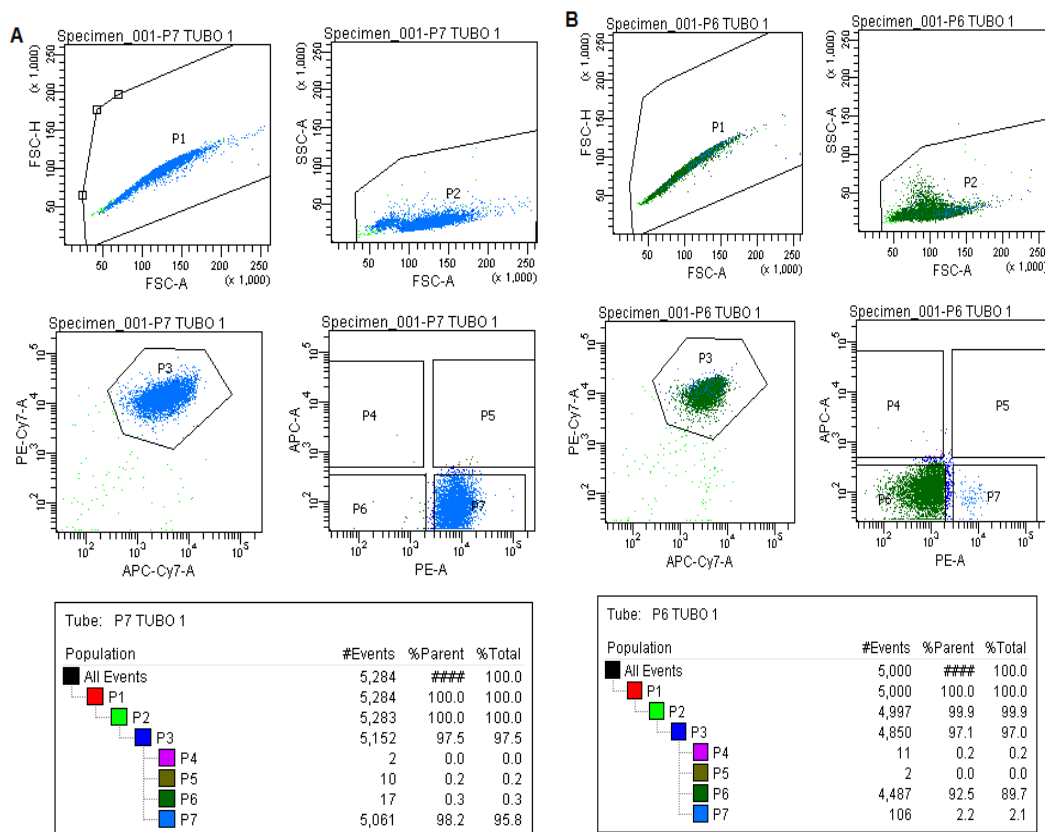
Análise da pureza da população simples positiva para CD8 (SP CD8) isolada a partir de timócitos murinos – pool 2. O *gate* P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população simples positiva para CD8 (CD8) está representada no *gate* nomeado como P8. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a 97,8% na amostra.

9.9 Anexo I



Análise da pureza da população T CD4+ naïve isolada a partir de esplenócitos murinos – pool 2. O *gate* P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população T CD4+ naïve está representada no *gate* nomeado como P4. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a 95% na amostra.

9.10 Anexo J



Análise da pureza das populações T CD4+ de memória isolada a partir de esplenócitos murinos – pool 2. O gate P2 se refere à população de linfócitos totais da amostra. A população T CD4+ de memória estão representadas nos gates P7 e P6. A pureza é o valor representado em %Parent e equivale a >90% na amostra.

ANEXOS

9.11 Anexo K

Valores de massa final (μg) e razão 260nm/280nm do RNA total extraído das populações tímicas e linfócitos T CD4+ *naïve* e memória murinas

Amostras – pool 1	Massa (μg)	Razão 260nm/280nm
DN	1,8	1,97
DP	1,5	1,89
SP CD4	1,8	1,88
SP CD8	1,1	1,91
T CD4+ <i>naïve</i>	2	1,87
T CD4+ memória	1,5	1,9
Amostras – pool 2	Massa (μg)	Razão 260nm/280nm
DN	1,9	1,87
DP	2,7	1,87
SP CD4	3,2	1,91
SP CD8	1,5	1,8
T CD4+ <i>naïve</i>	2,3	1,9
T CD4+ memória	2	1,85
Amostras – pool 3	Massa (μg)	Razão 260nm/280nm
DN	1,5	1,88
DP	3,7	1,85
SP CD4	1,7	1,86
SP CD8	2,3	1,91
T CD4+ <i>naïve</i>	2,1	1,9
T CD4+ memória	1,8	1,85
Amostras – pool 4	Massa (μg)	Razão 260nm/280nm
DN	1,5	1,85
DP	4	1,88
SP CD4	1,5	1,83
SP CD8	2	1,8
T CD4+ <i>naïve</i>	2,3	1,86
T CD4+ memória	1,5	1,87
Amostras – pool 5	Massa (μg)	Razão 260nm/280nm
DN	1,5	1,86
DP	2,6	1,89
SP CD4	1,8	1,84
SP CD8	2,1	1,82
T CD4+ <i>naïve</i>	1,8	1,86
T CD4+ memória	1,9	1,86

ANEXOS

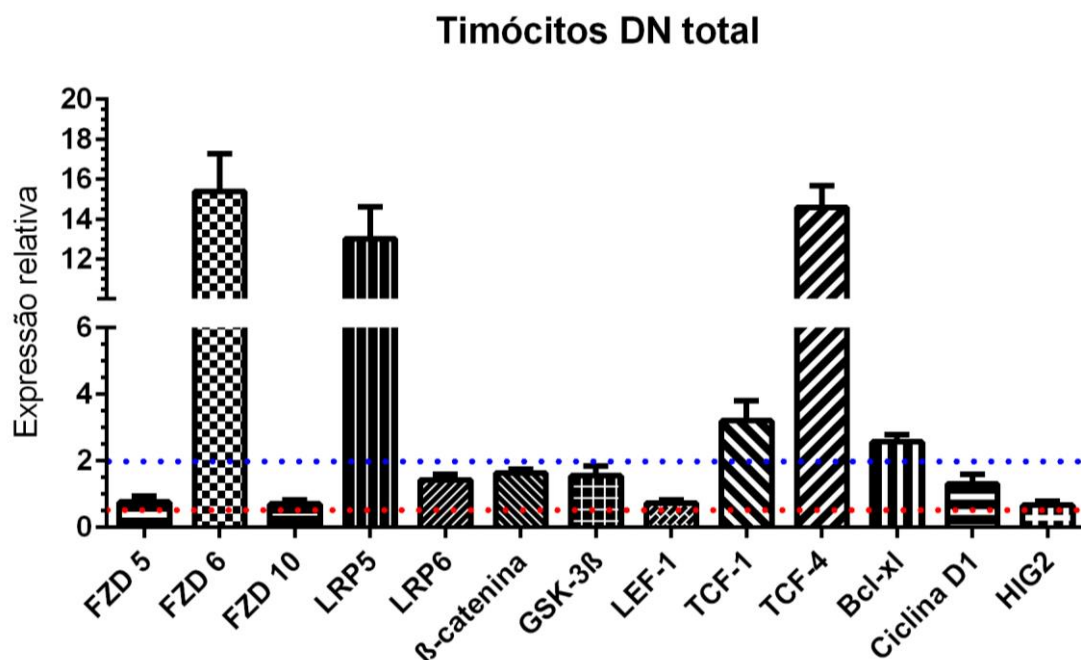
9.12 Anexo L

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	BCL2L1	18S	BCL2L1	18S	BCL2L1	18S	BCL2L1	18S	BCL2L1	18S	BCL2L1
B	CTNNB1	CCND1	CTNNB1	CCND1	CTNNB1	CCND1	CTNNB1	CCND1	CTNNB1	CCND1	CTNNB1	CCND1
C	FZD5	FZD6	FZD5	FZD6	FZD5	FZD6	FZD5	FZD6	FZD5	FZD6	FZD5	FZD6
D	FZD10	GAPDH	FZD10	GAPDH	FZD10	GAPDH	FZD10	GAPDH	FZD10	GAPDH	FZD10	GAPDH
E	GSK3B	HIG2	GSK3B	HIG2	GSK3B	HIG2	GSK3B	HIG2	GSK3B	HIG2	GSK3B	HILPDA
F	LEF1	LRP5L	LEF1	LRP5L	LEF1	LRP5L	LEF1	LRP5L	LEF1	LRP5L	LEF1	LRP5L
G	LRP6	TCF7	LRP6	TCF7	LRP6	TCF7	LRP6	TCF7	LRP6	TCF7	LRP6	TCF7
H	TCF4	HPRT1	TCF4	HPRT1	TCF4	HPRT1	TCF4	HPRT1	TCF4	HPRT1	TCF4	HPRT1

Esquema das placas de PCR em tempo real utilizadas para a análise de genes da via Wnt canônica a partir de amostras murinas. Para as análises da expressão de genes da via Wnt canônica, nosso grupo utilizou seis placas para investigar expressão em amostras murinas. Em cada placa, corremos uma única população, ou seja, na primeira reação, utilizamos todos os timócitos DN, na segunda placa foram analisados os timócitos DP e assim por diante. Em todas as reações utilizamos um controle negativo com a finalidade de garantirmos que os experimentos não estariam contaminados.

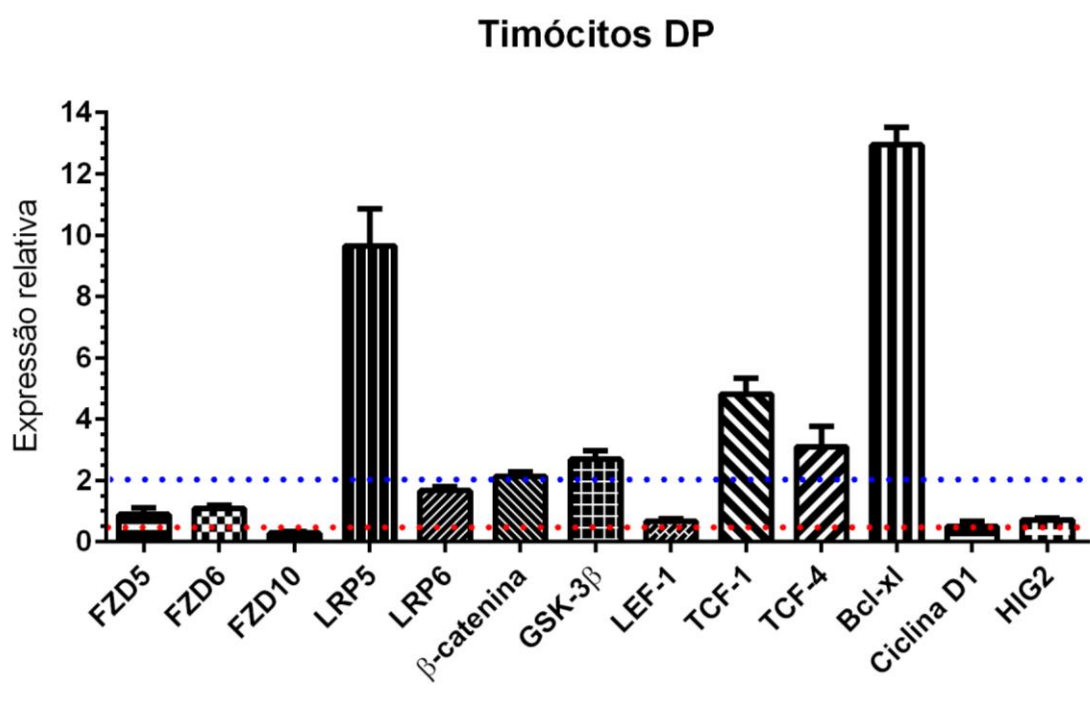
ANEXOS

9.13 Anexo M



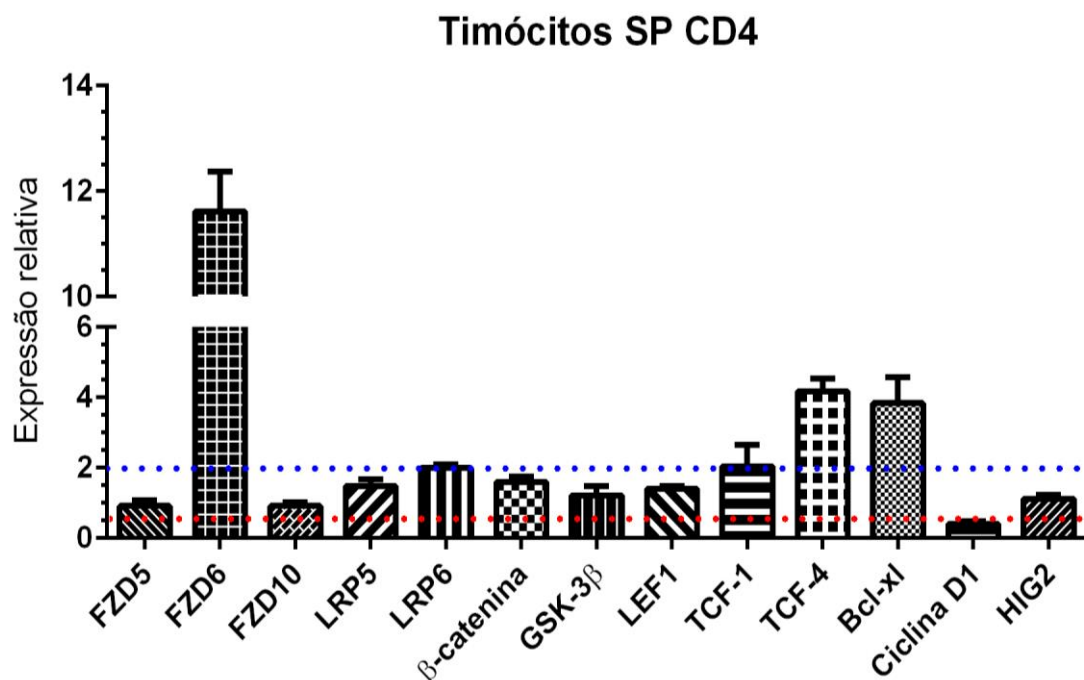
Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos DN total murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β -catenina, GSK-3 β , família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl-xL, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.

ANEXOS



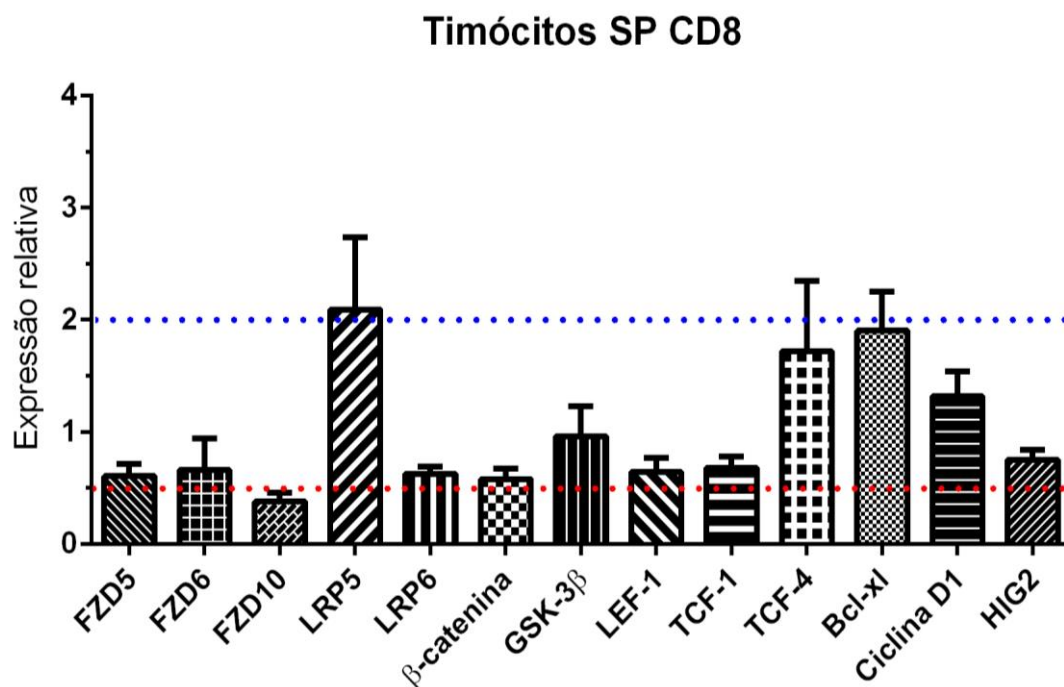
Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos DP murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β -catenina, GSK-3 β , família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl-x_L, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.

ANEXOS



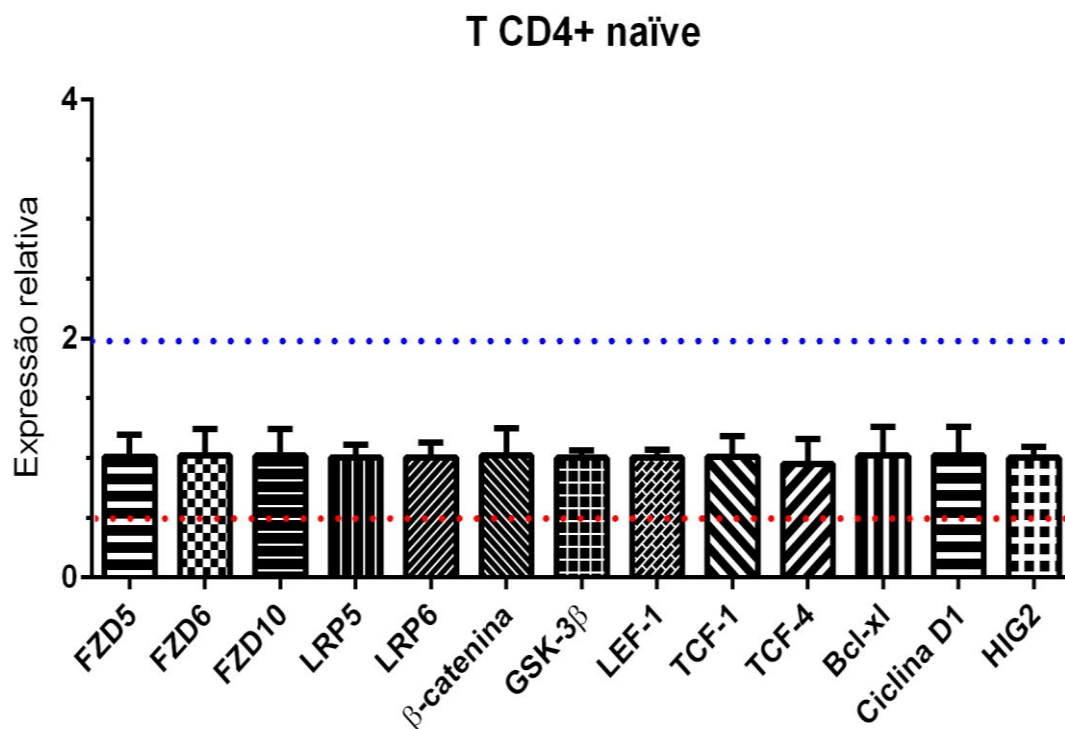
Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos SP CD4 murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β -catenina, GSK-3 β , família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl-x_L, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.

ANEXOS



Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de timócitos SP CD8 murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β -catenina, GSK-3 β , família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl-xL, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.

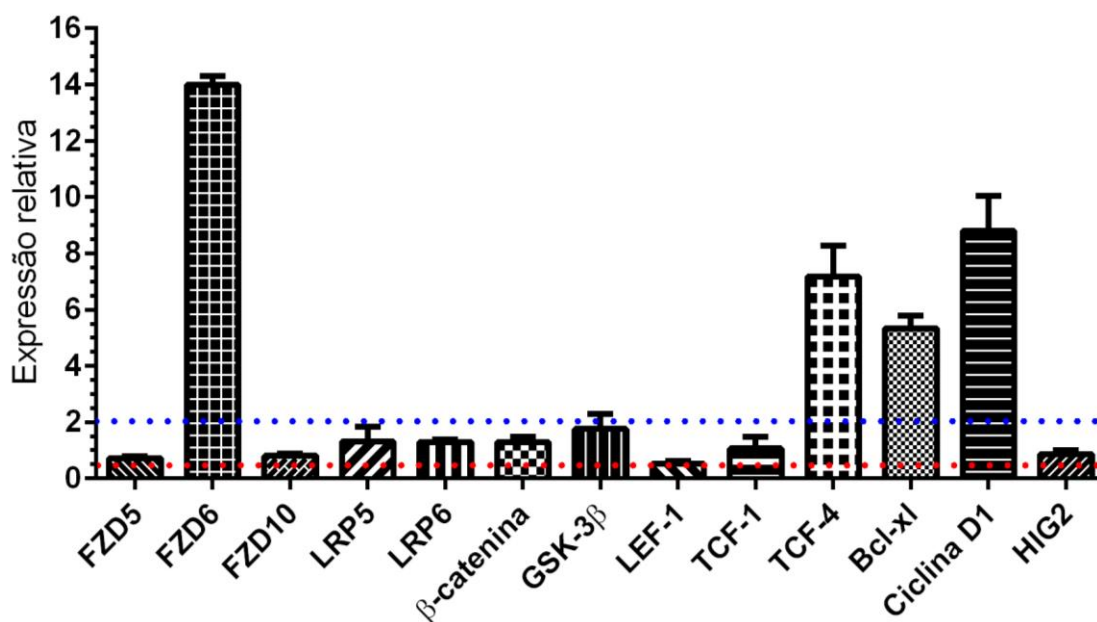
ANEXOS



Expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em populações de linfócitos T CD4+ *naíve* murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β -catenina, GSK-3 β , família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl- χ L, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/ β -catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naíve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.

ANEXOS

T CD4+ memória



Expressão de genes da via Wnt/β-catenina em populações de linfócitos T CD4+ de memória murinos. Valores de expressão dos genes que codificam para os receptores da família Frizzled (FZD5, FZD6 e FZD10), co-receptores LRP (LRP5 e LRP6), β-catenina, GSK-3β, família TCF/LEF (LEF-1, TCF-1 e TCF-4), Bcl-_{XL}, ciclina D1 e HIG2. Os valores de expressão de genes da via Wnt/β-catenina em timócitos duplo negativos (DN total) foram obtidos pelo cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizados pelo gene de referência 18S e todas as amostras de populações celulares foram comparadas em relação à média das amostras de T CD4+ *naïve* (controle). Nos grupos, as barras horizontais representam as medianas e as verticais o desvio-padrão entre as amostras; as linhas pontilhadas em azul significam representam um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$. Foram utilizadas 5 amostras por grupo.