

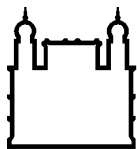
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE *FOXP1* NO EPITÉLIO TÍMICO HUMANO  
DURANTE A SENESCÊNCIA**

MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS

Rio de Janeiro  
Abril de 2015



Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

*MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS*

Regulação epigenética de *FOXN1* no epitélio tímico humano durante a senescência

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

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

RIO DE JANEIRO

Abril de 2015

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

R375 Reis, Maria Danielma dos Santos

Regulação epigenética de FOXN1 no epitélio tímico humano durante a senescência / Maria Danielma dos Santos Reis. – Rio de Janeiro, 2015.

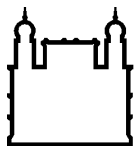
xx, 144 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 99-119

1. FOXN1. 2. Metilação de DNA. 3. Involução tímica. I. Título.

CDD 616.43



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: Maria Danielma dos Santos Reis***

**Regulação epigenética de *FOXN1* no epitélio tímico humano durante a senescência**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilson Savino**

**Aprovada em: 13/04/2015**

#### **EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

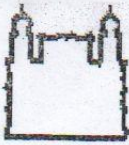
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Bianchi de Frontin Werneck – Membro (UFRJ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valeria de Mello Coelho – Membro (UFRJ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniella Arêas Mendes da Cruz – Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira – Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 13 de abril de 201



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular de **Maria Danielma dos Santos Reis**, sob orientação do Dr. Wilson Savino. Ao décimo terceiro dia do mês de abril de dois mil e quinze, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane/Fiocruz, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Regulação epigenética de FOXN1 no epitélio tímico humano durante a senescência"** no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Imunobiologia de órgãos linfóides. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Milton Ozório Moraes - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Miriam Bianchi de Frontin Werneck - UFRJ/RJ, Dr<sup>a</sup>. Valéria de Mello Coelho - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Daniella Arêas Mendes da Cruz - IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 13 de abril de 2015.

Dr. Milton Ozório Moraes (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Miriam Bianchi de Frontin Werneck (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Valéria de Mello Coelho (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima (Coordenador do Programa):

Dra. Leila de Mendonça Lima  
Coord. do Prog. de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ  
Matrícula Siape nº 1101995-8

*À minha família e ao meu grande companheiro, amigo e amor  
Victor Xavier por suportar mares de distância e pelo apoio  
incondicional a todas as minhas decisões.*

## AGRADECIMENTOS

A toda minha grande família por compartilhar comigo as alegrias, tristezas, angústias, derrotas e vitórias, pelo apoio incondicional, pela amizade, carinho e torcida. Vocês são o suporte e a força que me faz seguir em frente.

Aos meus queridos, inesquecíveis e para sempre amigos: Ana Rúbia, Adélia Carla, Clarissa França, Inaura Patrícia, Maíra Estanislau, Raíssa Cavalcante, Pedro de Moraes, Pollyane Souto, Paula Walleska, Plácido Fabrício, Sandra Hiromi, Victor Xavier, Washington Soares, William Fernandes e Wagner Soriano (*in memoriam*). Mesmo longe vocês continuaram a dar amizade, carinho e atenção.

A minha família “Rio de Janeiro”: Araci Breckenfeld, Mariana Giovenardi, Cintia Palu, Juliana Brasil, Sula Salani e Laís Agra. Pela companhia, pelos desabafos, pela amizade e o carinho que amenizou a saudade da família e amigos que estão longe da cidade maravilhosa.

Aos meus amigos de além-mar com os quais dividi as angústias, alegrias e tristezas de estar em outro país, especialmente, agradeço aos meus colegas de quarto Mónica Mihók e Ugo Araújo. Além disso, agradeço aos amigos intercambistas do programa Ciências sem Fronteiras, que fizeram de Debrecen um pedacinho do Brasil na Hungria.

Ao meu orientador Dr. Wilson Savino pela oportunidade de desenvolver minha tese de doutorado, pelas discussões e orientação para o trabalho e para vida.

A todos que fazem o Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, pelo companheirismo, amizade e carinho. Agradeço em especial a Dr<sup>a</sup> Daiane Cristina, a Dr<sup>a</sup> Luciene Braga, a Dr<sup>a</sup> Daniela Areas, ao Dr. Vinicius Cotta-de-Almeida, ao Dr. Arnon Juberg, a doutoranda Ailin Lepletier, ao doutorando Luiz Ricardo e a técnica Marina Trajano pela colaboração durante os experimentos e na discussão dos resultados.

A todos os funcionários do laboratório de proteômica de anticorpos da Universidade de Debrecen por me receber de braços abertos em seu laboratório, pela amizade, apoio e colaboração na execução do projeto. Agradeço especialmente ao Professor Dr. László Takacs pela importante participação como supervisor do

projeto, na elaboração dos experimentos e discussão de resultados, além do apoio e amizade durante o tempo em que estive em seu laboratório.

Aos médicos cirurgiões cardíacos Dr. Zsolt Prodán (Instituto Nacional de Cardiologia Gottsegen Gyorgy, Budapeste, Hungria) e Dr. Tamas Szerafin (Departamento de Cirurgia Cardíaca, Universidade de Debrecen, Debrecen, Hungria) e suas respectivas equipes de trabalho, por fornecer gentilmente as amostras utilizadas neste estudo. Agradeço também aos professores doutores Miklos Molnar e Laszlo Rosivall (Universidade Semmelweis, Budapeste, Hungria) por ceder espaço no laboratório para o processamento das amostras e ao Dr. Istvan Andó (Centro de Pesquisa Biológica, Academia Húngara de Ciências, Szeged, Hungria) pelo acolhimento em seu laboratório e pelo auxílio nos experimentos de imunofluorescência. Agradeço, de forma especial, ao Dr. Krisztian Csomos, do departamento de Bioquímica e Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Debrecen, pelo auxílio durante os experimentos de PCR.

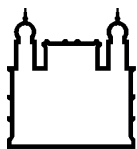
Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz por ter proporcionado a realização desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no âmbito do programa Ciências sem Fronteiras, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.



*“There will always be those  
who say you are too young and delicate  
to make anything happen for yourself.  
They don’t see the part of you that smolders.  
Don’t let their doubting drown out the sound of your own heartbeat.  
You are the first drop of a hurricane.  
Your bravery builds beyond you  
. You are needed by all the little girls still living in secret,  
writing oceans made of monsters and throwing like lightning.  
You don’t need to grow up to find greatness.  
You are stronger than the world has ever believed you to be.  
The world laid out before you to set on fire.  
All you have to do  
is burn.”*

Clementine von Radics



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE *FOXN1* NO EPITÉLIO TÍMICO HUMANO DURANTE A SENESCÊNCIA

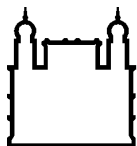
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Maria Danielma dos Santos Reis**

A involução do timo ao longo do envelhecimento se caracteriza por alterações nas células que compõem o seu microambiente, contudo as suas causas ainda não estão completamente esclarecidas. No intuito de contribuir para conhecimento a cerca desse fenômeno, esta tese teve por objetivos avaliar a expressão de genes importantes para o desenvolvimento e função linfopoiética do timo como também investigar o mecanismo de regulação da expressão gênica de *FOXN1* através de metilação de DNA. Para isso, foram utilizadas amostras de timo humano de diferentes idades provenientes de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Quanto aos aspectos morfológicos, os timos de doadores entre cinco dias e um ano de idade (grupo pós-natal) apresentaram uma arquitetura microscópica característica do órgão, sem sinais de involução. Nessas amostras, também foi verificada uma deposição normal de citoqueratina, distribuída pelo órgão como uma fina rede de filamentos intracelulares. Já nos timos de doadores acima de 49 anos (grupo adulto-idoso), observou-se a perda da arquitetura tímica, presença de uma grande quantidade de tecido adiposo e uma deposição de citoqueratina irregular, quando presente, com regiões semelhantes a áreas livres de células epiteliais tímicas (TEC). Nos ensaios de PCRq, foi verificado um aumento na expressão dos genes *DLL1* e *DLL4*, e uma diminuição na expressão de *FOXN1* em amostras de timo adulto-idoso em comparação com amostras de timo pós-natal. Além disso, não foi possível detectar a presença da proteína FOXN1 em cortes congelados de timo adulto-idoso em relação às amostras de timo pós-natal. Na linhagem de TEC humana pós-natal, foi verificada a ausência de FOXN1 sob condições de estímulo da via clássica de sinalização de WNT bem como através de cultivo em arcabouços tridimensionais. A análise do padrão de metilação de DNA no gene *FOXN1*, realizada através de sequenciamento de DNA convertido com bissufito de sódio derivado de amostras de timo humano e da linhagem de TEC humana pós-natal, demonstrou alterações na metilação do DNA em regiões do íntron 1 e do éxon 2 do gene. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que existe um mecanismo de regulação epigenética em *FOXN1* durante o envelhecimento no timo.

**Palavras-chave:** FOXN1, Metilação de DNA, Involução tímica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EPIGENETIC REGULATION OF *FOXN1* IN HUMAN THYMIC EPITHELIUM DURING SENESCENCE

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

**Maria Danielma dos Santos Reis**

Thymic involution during aging is accompanied by alterations on its microenvironment, however little is known about the mechanisms responsible for these modifications. In this study we aimed to evaluate the expression of genes critical for thymopoiesis and the *FOXN1* gene epigenetic regulation by DNA methylation. We obtained human thymic samples from patients ongoing cardiac surgery with different ages. In the morphological evaluation, thymus from donors with five days-old to one year-old (postnatal group) showed a typical thymic architecture, without involution signs, and a normal cytokeratin labelling pattern distributed as a thin filament network on the organ. When thymuses from adult-old donors (49 to 78 years-old) were analyzed, it was seen a disruption on thymus microenvironment, with large adipose tissue infiltration and an irregular cytokeratin pattern revealing some epithelial-free areas. The qPCR assays showed that *DLL1*, *DLL4*, *FOXN1* e *WNT4* genes were expressed during aging on thymus, but *DLL1* and *DLL4* presented high expression in thymuses from adult-old samples regarding the postnatal group, while the *FOXN1* expression was lower in adult-old group. By immunofluorescence, we were not able to detect *FOXN1* staining in thymus sections from adult-old samples when compared with samples from postnatal thymus. In human thymic epithelial cell line (THPN), we show that *FOXN1* expression is refractory to signals that induce *FOXN1* transcription in primary 3D culture conditions and by stimulation of the canonical WNT signaling pathway. Next, we analyzed the DNA methylation pattern on *FOXN1* gene by bisulfite sequencing using converted DNA from human thymus and THPN cell line. It was observed differential methylation on intron 1 and exon 2 selected regions on the gene sequence. These results demonstrate for the first time that *FOXN1* gene expression in thymus may be regulated through an epigenetic mechanism during aging.

**Key words:** *FOXN1*, DNA methylation, thymic involution

# ÍNDICE

RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XI
1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Timo .....	21
1.1.1 Organogênese e morfologia.....	21
1.1.2 Diferenciação intratímica de linfócitos T .....	24
1.1.3 Células epiteliais tímicas.....	28
1.1.4 Fator de transcrição Forkhead box N1 (FOXN1).....	34
1.2 Involução tímica associada à imunosenescência .....	37
1.2.1 Regeneração terapêutica do timo .....	40
1.3 Metilação de DNA .....	42
1.3.1 Metilação de DNA na imunosenescência .....	46
2 OBJETIVOS .....	48
2.1 Objetivo geral: .....	48
2.2 Objetivos específicos: .....	48
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	49
3.1 Anticorpos .....	49
3.2 Cultivo celular.....	49
3.3 Amostras de timo humano.....	50
3.4 Indução da via de sinalização de WNT pelo tratamento com cloreto de lítio... 51	
3.5 Imunofluorescência .....	52
3.6 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA) .....	53
3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	54
3.8 Extração de DNA genômico das amostras de timo humano.....	56
3.9 Tratamento com bissulfito de sódio .....	57
3.10 Análise de metilação do DNA .....	56
3.10.1 Seleção das regiões e desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para DNA convertido com bissulfito de sódio .....	59
3.10.2 Sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio.....	60
3.10.3 Análise do sequenciamento .....	64
3.11 Análise estatística .....	64
4 RESULTADOS .....	65

4.1	Arquitetura tecidual e distribuição de células epiteliais no timo humano em diferentes idades.....	65
4.2	Expressão de <i>FOXN1</i> , <i>DLL1</i> , <i>DLL4</i> e <i>WNT-4</i> em amostras de timo humano .	66
4.3	Expressão proteica de <i>FOXN1</i> em amostras de timo humano .....	68
4.4	Expressão gênica de <i>FOXN1</i> , <i>DLL1</i> e <i>DLL4</i> em células da linhagem de TEC humana THPN .....	68
4.5	Indução da via de sinalização de WNT em linhagem de TEC humana .....	72
4.6	Análise de metilação de DNA no gene <i>FOXN1</i> .....	76
5	DISCUSSÃO .....	89
6	CONCLUSÃO .....	97
7	PERSPECTIVAS .....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
	ANEXOS .....	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Desenvolvimento embrionário do timo. ....	22
Figura 1.2: Arquitetura microscópica e microambiente tímico.. ....	24
Figura 1.3: Diferenciação intratímica de linfócitos T. ....	25
Figura 1.4: Interações celulares no timo.....	30
Figura 1.5: Interações neuroimunoendócrinas no timo. ....	33
Figura 1.6: Desenho esquemático do gene <i>FOXN1</i> , seu transcrito e proteína. ....	35
Figura 1.7: Processo enzimático de metilação de citosinas no DNA. ....	43
Figura 3.1: Localização genômica das regiões selecionadas para análise de metilação de resíduos CpG no gene <i>FOXN1</i> . ....	59
Figura 3.2: Representação esquemática das etapas experimentais utilizadas para o sequenciamento de DNA convertido com bissulfato de sódio. ....	60
Figura 4.1: Aspectos morfológicos de amostras de timo humano em diferentes idades. ....	66
Figura 4.2: Deposição de citoqueratina total em amostras de timo humano em diferentes idades.....	66
Figura 4.3: Expressão dos genes <i>FOXN1</i> , <i>DLL1</i> , <i>DLL4</i> e <i>WNT-4</i> em amostras de timo humano através de PCR quantitativo em tempo real.....	67
Figura 4.4: Expressão proteica de <i>FOXN1</i> em amostras de timo humano. ....	68
Figura 4.5: Expressão de <i>FOXN1</i> , <i>DLL1</i> e <i>DLL4</i> em TEC cultivadas em monocamadas convencionais (2D) e em sistema de cultivo 3D.....	70
Figura 4.6: Curva de dissociação do produto de amplificação do gene <i>FOXN1</i> em células epiteliais tímicas e amostra de estroma tímico humano. ....	71
Figura 4.7: Curva de dissociação do produto de amplificação do gene <i>FOXN1</i> em células epiteliais tímicas e em amostra de estroma tímico humano. ....	71
Figura 4.8: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão de $\beta$ -catenina em linhagem de TEC humana. ....	73
4.9: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão de $\beta$ -catenina em linhagem de TEC humana. ....	74
Figura 4.10: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão gênica de <i>FOXN1</i> em linhagem de TEC humana.....	75
4.11: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão protéica de <i>FOXN1</i> em linhagem de TEC humana. ....	76

Figura 4.12: Sequência do gene <i>FOXN1</i> na região C20..	79
Figura 4.13: Sequência do gene <i>FOXN1</i> na região DB2..	81
Figura 4.14: Percentual de metilação em amostras de pele e leucócitos humanos..	82
Figura 4.15: Alinhamento das sequências obtidas após sequenciamento de regiões do gene <i>FOXN1</i> ..	83
Figura 4.16: Quantificação dos resíduos de CpG metilados na região C20 do gene <i>FOXN1</i> ..	85
Figura 4.17: Quantificação dos resíduos de CpG metilados na região DB2 do gene <i>FOXN1</i> ..	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Características das amostras de timo humano. ....	51
Tabela 3.2: Sequências senso e reverso dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e de PCR quantitativo.....	56
Tabela 3.3: Condições da reação de conversão de DNA com bissulfito de sódio ....	58
Tabela 3.4: Sequências senso e reverso dos iniciadores específicos para regiões do gene <i>FOXN1</i> após conversão com bissulfito de sódio .....	60
Tabela 4.1: Quantificação de resíduos CpG na sequência do gene <i>FOXN1</i> . ....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-mC:** 5-metilcitosina

**Adrp:** *adipose differentiation related protein* (gene murino)

**AIRE:** *Autoimmune regulator* (Regulador autoimune)

**APC:** *Adenomatous polyposis coli*

**ATF:** *activating transcription factor* (Fator ativador de transcrição)

**BM:** *Bone marrow* (Medula óssea)

**BSA:** *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

**CCL:** Quimiocina tipo C-C

**CCR:** Receptor de quimiocina tipo C-C

**CD:** *Cluster of differentiation* (Grupo de diferenciação)

**cDNA:** Ácido desoxirribonucléico complementar

**CEBPA:** *CCAAT-enhancer-binding protein alfa* (gene humano)

**CGI:** Ilha CpG

**CH<sub>3</sub>:** Grupo metil

**CpA:** Citosina localizada na direção 5' a uma adenina

**CpC:** Citosina localizada na direção 5' a uma citosina

**CpT:** Citosina localizada na direção 5' a uma timina

**CREB1:** *cAMP response element-binding protein 1*,

**CREBP1:** *cAMP responsive element-binding protein 2*

**Ct:** *cycle threshold*

**CTCF:** *CCCTC-binding factor* (Fator ligante de CCCTC)

**cTEC:** Célula epitelial cortical

**CTH:** Célula-tronco hematopoiética

**CXCL:** Quimiocina tipo C-X-C

**CXCR:** Receptor de quimiocina tipo C-X-C

**DAG-546:** *Donkey anti-goat Ig Alexa 546-conjugated* (anti-Ig de cabra produzido em burro conjugado ao fluorocromo Alexa 546)

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DLL1:** Delta-like ligante 1

**DLL4:** Delta-like ligante 4

**DN:** Timócito duplo-negativo

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**DNMT:** *DNA methyltransferase* (metiltransferase de DNA)

**dNTPs:** desoxiribonucleotídeos trifosfatados

**DP:** Timócito duplo-positivo

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ENCODE:** *Encyclopedia of DNA Elements* (Consórcio Enciclopédia de Elementos de DNA)

**EpCAM:** *Epithelial cell adhesion molecule* (Molécula de adesão de célula epitelial)

**ETP:** *Early thymic progenitor* (Precursor inicial tímico)

**EYA1:** eyes absent 1 homolog (Drosophila)

**FGF8:** *Fibroblast growth factor* (Fator 8 de crescimento de fibroblastos)

**FIOCRUZ:** Fundação Oswaldo Cruz

**FOXN1:** forkhead box N1

**Foxn4:** forkhead box N4 (gene murino)

**FOXP3:** Forkhead box P3

**GAM-488:** *Goat anti-mouse Ig Alexa 488-conjugated* (anti-Ig de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 produzido em cabra)

**GAR-488:** *Goat anti-rabbit Ig Alexa 488-conjugated* (anti-Ig de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 produzido em cabra)

**GCM2:** glial cells missing homolog 2 (Drosophila)

**GH:** *Growth hormone* (Hormônio do crescimento)

**GSK-3 $\beta$ :** *Glycogen synthase kinase 3 beta* (Glicogênio sintetase quinase 3 beta)

**HAART:** *Highly active antiretroviral therapy* (Terapia anti-retroviral altamente ativa)

**CpG:** Citosina localizada na direção 5' a uma guanina

**HCl:** Ácido clorídrico

**HIV:** *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

**HLA:** *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitário humano)

**HOXA3:** Homeobox A3

**HPRT-1:** Hipoxantina fosforribosiltransferase 1

**ICAM-1:** *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de adesão intercelular 1)

**IGF-1:** *Insulin-like growth factor 1* (Fator 1 de crescimento semelhante a insulina)

**IL:** Interleucina

**IPTG:** isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo

**IRES:** *Internal ribosomal entry site* (sítio interno de entrada ribossomal)

**ITGAL:** Integrina alfa L

**JAG:** *Jagged*

**JCM:** Junção córtico-medular

**kDa:** kilodalton

**LEF:** *Lymphoid enhancing factor* (fator estimulador linfóide)

**LFA-1:** *Lymphocyte function-associated antigen 1* (Antígeno linfocitário associado a função 1; integrina  $\alpha_L\beta_2$ )

**LiCl:** Cloreto de lítio

**LINE-1:** *Long interspersed nuclear element-1* (Elemento nuclear intercalado longo)

**MEC:** Matriz extracelular

**MHC:** *Major histocompatibility complex* (Complexo de histocompatibilidade)

**mTEC:** Célula epitelial medular

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**NCC:** Neural crest cells (Células da crista neural)

**NIH:** *National Institute of Health*

**PAX:** Paired box

**PAX3:** *paired box gene 3*

**PAX5:** *paired box gene 5*

**pb:** pares de base

**PBS:** Salina fosfatada tamponada

**PCRq:** PCR quantitativo em tempo real

**PDTIS:** Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

**Plin2:** *perilipin 2* (gene murino)

**PPARG:** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**RNA:** Ácido ribonucléico

**RPL13A:** Proteína ribossomal L13A (gene humano)

**RRBS:** *Reduced representation bisulfite sequencing* (Representação reduzida do sequenciamento após tratamento com bisulfito)

**RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase após reação com transcriptase reversa

**SAM:** S-adenosil-L-metionina

**SFRP1:** *secreted frizzled-related protein 1* (gene humano)

**SIX1:** sine oculis-related homeobox 1

**SP:** Timócito simples-positivo

**TCF:** *T cell factor* (fator de linfócitos T)

**TCR:** *T cell receptor* (Receptor de célula T)

**TEC:** *Thymic epithelial cell* (Célula epitelial tímica)  
**TEP:** *Thymic epithelial precursor* (Célula precursora epitelial tímica)  
**TFRC:** Receptor de transferrina  
**Th<sub>2</sub>:** fenótipo de linfócito T auxiliar do tipo 2  
**THPN:** *Thymic human postnatal* (Linhagem de TEC humana pós-natal)  
**TIMP1:** *TIMP metallopeptidase inhibitor 1* (gene humano)  
**TNC:** *Thymic nurse complex* (Complexo *nurse* tímico)  
**TRA:** *Tissue-restricted antigen* (Antígeno restrito ao tecido)  
**Treg:** linfócito T regulador  
**TSDR:** *Treg-specific demethylation region* (Região demetilada específica de Treg)  
**TSS:** *Transcription start site* (sítio de início da transcrição)  
**UCSC:** Universidade da Califórnia-Santa Cruz  
**UTR:** *Untranslated region* (Região não-traduzida)  
**VLA:** *Very late antigen* (Antígeno de aparecimento tardio)  
**WNT:** *Wingless-type MMTV integration site family*  
**WNT-4:** *wingless-type MMTV integration site family, member 4.*  
**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Timo

### 1.1.1 Organogênese e morfologia

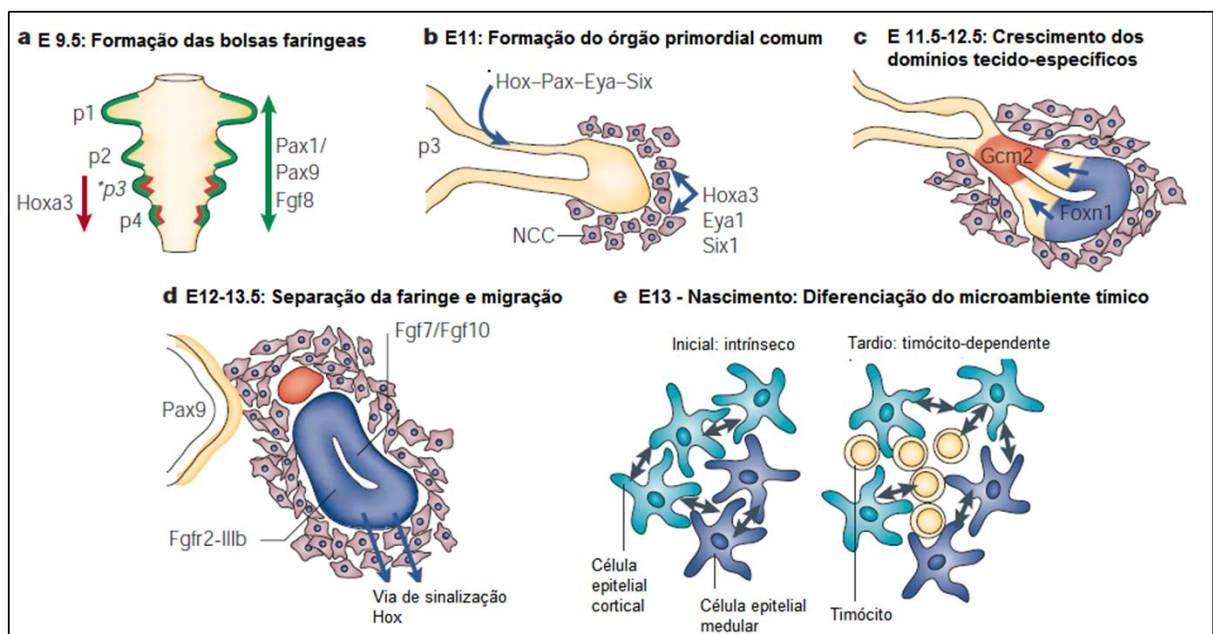
O timo é um órgão linfóide primário responsável pelo desenvolvimento dos linfócitos T. Está localizado no mediastino, sobre o coração, anterior aos grandes vasos que irrigam o coração. O seu desenvolvimento inicia-se nos primeiros estágios do período embrionário, a partir de um órgão primordial em comum com a paratireoide derivado do endoderma da terceira bolsa faríngea, cercado por células da crista neural (Gordon *et al.*, 2004). A formação do órgão primordial comum é mediada pela ação do fator de transcrição HOXA3 (abreviatura do Inglês *homeobox A3*) e sua via de sinalização subsequente que envolve os fatores PAX1 (abreviatura do Inglês *paired box gene 1*), PAX9, EYA1 [abreviatura do Inglês *eyes absent 1 homolog (Drosophila)*], SIX1 (abreviatura do Inglês *sine oculis-related homeobox 1*) e SIX4 expressos no endoderma das bolsas faríngeas (Revisado em Manley e Condie, 2010). Animais deficientes para o gene *Hoxa3*<sup>1</sup> não desenvolvem timo nem paratireoide como também não expressam os fatores PAX1 e PAX9 (Su *et al.*, 2001). Por sua vez, animais deficientes para os genes *Pax1* e *Pax9* têm prejuízo no desenvolvimento do primórdio timo/paratireoide e na localização final do timo (Su *et al.*, 2001; Hetzer-Egger *et al.*, 2002). Esses fatores continuam a ser expressos no timo após o nascimento, sendo importantes para manutenção e função do órgão (Su *et al.*, 2001; Hetzer-Egger *et al.*, 2002). Os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do timo estão ilustrados na Figura 1.1.

Em camundongos, o órgão primordial comum se forma a partir do 11<sup>o</sup> dia de desenvolvimento embrionário (determinado pela sigla E11), sendo composto por células endodérmicas precursoras arranjadas em domínios caracterizados pela expressão dos fatores de transcrição FOXN1 (abreviatura do Inglês *forkhead box N1*) e GCM2 [abreviatura do Inglês *glial cells missing homolog 2 (Drosophila)*], que irão originar o timo e a paratireoide, respectivamente (Revisado em Blackburn e

---

<sup>1</sup> Nomenclatura do genoma murino obtida do banco de dados do genoma murino MGD (*Mouse Genome Database*) (Blake *et al.*, 2014).

Manley, 2004) (Figura 1.1). O desenvolvimento do órgão primordial é um evento evolutivo conservado em humanos e pode ser observado a partir da sexta semana de gestação em conjunto com o início da expressão de FOXN1 (Farley *et al.*, 2013). A partir do estágio E13.5, em camundongos e da oitava semana de gestação em humanos, o domínio celular timo-específico migra para região caudal, em direção ao coração, e se aloca sobre os grandes vasos, constituindo o timo torácico, enquanto que o domínio com as células GCM2 positivas migra para região dorsal, junto a tireoide em desenvolvimento (Gordon *et al.*, 2001; Farley *et al.*, 2013; revisado em Ma *et al.*, 2013). Casos de timos ectópicos presentes na região cervical já foram registrados em camundongos e em humanos (Corbeaux *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Em camundongos, esses órgãos se desenvolvem tardiamente, a partir de células presentes no órgão primordial comum, como também de células da paratireóide em desenvolvimento, além de conter células epiteliais positivas para FOXN1 (Corbeaux *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013).

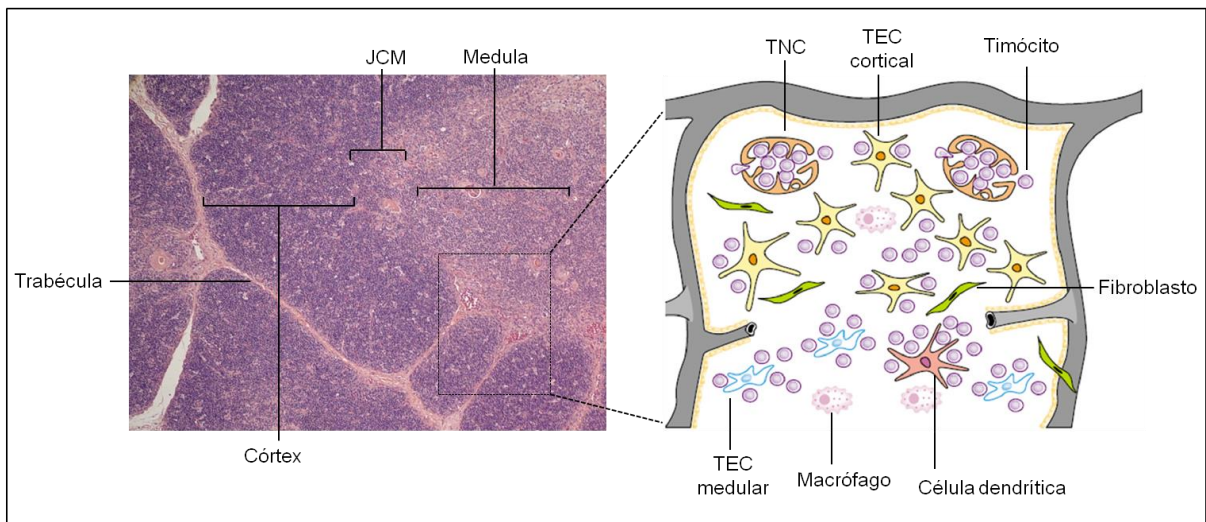


**Figura 1.1: Desenvolvimento embrionário do timo.** A ilustração descreve os eventos (a, b, c, d, e) e os fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento embrionário do timo em camundongos. A formação das bolsas faríngeas é iniciada em E9, sendo coordenada pelos fatores PAX1, FGF8 (abreviatura do Inglês *Fibroblast growth factor 8*) e HOXA3; em E11 surge o órgão primordial comum e tem início a proliferação das células da crista neural (NCC; abreviatura do Inglês *Neural crest cells*), processos mediados pela via de sinalização HOX-PAX-EYA-SIX; Entre E11.5 e E12.5 inicia a expressão de FOXN1 nas células do domínio celular timo-específico, acompanhada da expressão de GCM2 nas células da

região paratireoide-específica; A partir de E12.5 os domínios começam a separar da faringe e migram para sua localização final aliado ao início da diferenciação das células do microambiente tímico. Adaptação de Blackburn e Manley (2004).

O início da diferenciação das células que compõem o microambiente tímico ocorre ainda no órgão primordial. A partir da sétima semana de gestação em humanos e do estágio E12.5 em camundongos, as células mesenquimais derivadas da crista neural começam a entrar no órgão, acompanhadas pela migração de células precursoras endoteliais (Mori *et al.*, 2010; Farley *et al.*, 2013). Já as células epiteliais tímicas (TEC – abreviatura do Inglês *thymic epithelial cell*) iniciam sua diferenciação a partir células epiteliais precursoras (TEP – abreviatura do Inglês *thymic epithelial precursor*) FOXN1 positivas contidas no domínio celular timo-específico (Farley *et al.*, 2013). Ainda nesse período observa-se a migração de células precursoras hematopoiéticas CD45 (cluster de diferenciação 45) positivas para o timo em desenvolvimento, provavelmente pela influência das citocinas produzidas pelas TEC, com o aparecimento de linfócitos maduros em torno da 15ª semana de gestação em humanos (Bleul e Boehm, 2000; Farley *et al.*, 2013). Em camundongos, a entrada de células precursoras comprometidas com a diferenciação de linfócitos T no timo primordial ocorre em dois momentos durante o desenvolvimento, sendo o primeiro entre os estágios E12 e E15 e o segundo a partir do E16 (Itoi *et al.*, 2001; Ramond *et al.*, 2014).

Ao final do desenvolvimento, o timo apresenta-se como dois lobos constituídos de uma fina cápsula fibrosa de tecido conjuntivo a qual emite trabéculas para dentro do órgão, dividindo-o em lóbulos. Cada lóbulo possui duas regiões estruturais histologicamente definidas, uma região externa cortical (córtex), mais escura, que abriga um grande número de linfócitos imaturos, TEC e macrófagos; e a uma região interna medular (medula), mais clara, devido ao menor número de linfócitos, que contém linfócitos maduros ou em estágios finais de diferenciação, TEC, células dendríticas e linfócitos B (Pearse, 2006) (Figura 1.2). Entre o córtex e a medula observa-se uma região pouco definida, repleta de vasos sanguíneos, chamada de junção córtico-medular, local de entrada dos precursores de linfócitos T e de saída das células maduras (Pearse, 2006) (Figura 1.2).

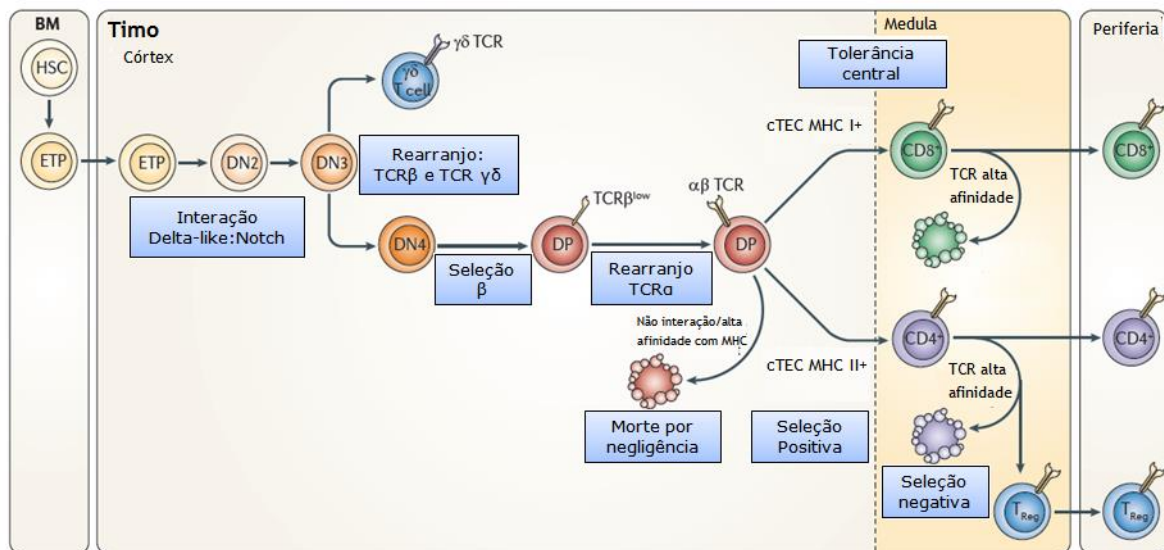


**Figura 1.2: Arquitetura microscópica e microambiente tímico.** A fotomicrografia mostra a arquitetura microscópica do timo humano por coloração de hematoxilina-eosina. No inserto estão representados graficamente os componentes do microambiente tímico. TEC: célula epitelial tímica; JCM: Junção córtico-medular; TNC: complexo *Nurse* tímico. Fotomicrografia: autoria própria. Aumento: objetiva de 4x. Inserto: adaptação de Savino *et al.* (2002).

### 1.1.2 Diferenciação intratímica de linfócitos T

O desenvolvimento de linfócitos T é um processo coordenado por células do microambiente tímico, em particular pelas TEC, que em conjunto com as proteínas da matriz extracelular (MEC), compõem um ambiente tridimensional único e necessário para geração de linfócitos T imunocompetentes. Durante sua diferenciação, os linfócitos são submetidos a processos de seleção ou *checkpoints*, mediados pelas células estromais, que garantem especificidade ao não-próprio como também tolerância a antígenos do corpo, através do receptor de célula T (TCR – abreviatura do Inglês *T cell receptor*). Existem dois tipos de TCR, um mais comum, restrito ao MHC (abreviatura do Inglês *major histocompatibility complex*), composto pelas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  e outro, não-restrito ao MHC, composto pelas cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  (Revisado em Prinz *et al.*, 2013). As populações de linfócitos T TCR  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  são derivadas do timo e desempenham funções distintas. As etapas envolvidas na diferenciação intratímica, em camundongos e em humanos, estão ilustradas na figura 1.3 e estão detalhadas a seguir.





**Figura 1.3: Diferenciação intratímica de linfócitos T.** Na figura estão representadas, de maneira geral, as etapas da diferenciação intratímica, com destaque aos processos de seleção ou *checkpoints*. Brevemente, a diferenciação se inicia com a entrada de células precursoras hematopoiéticas provenientes da medula óssea (painel à esquerda) (BM – abreviatura do Inglês *bone marrow*), que contém os progenitores tímicos iniciais (ETP – abreviatura do Inglês *early thymic progenitors*), através dos vasos sanguíneos presentes na junção córtico-medular do órgão. No córtex, os ETP interagem com TEC através de ligantes da família NOTCH que os direcionam para o desenvolvimento de linfócitos T. A seguir, os timócitos imaturos duplo-negativos (DN; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) sofrem rearranjo dos genes para as cadeias β, δ e γ do receptor de célula T (TCR – abreviatura do Inglês *T cell receptor*). Após rearranjo, os timócitos DN, que expressam corretamente o TCRβ, sofrem expansão celular e progridem para o estágio duplo-positivo (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), em que são selecionados positivamente através da interação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – abreviatura do Inglês *major histocompatibility complex*) expressas em TEC corticais. Após a seleção positiva, os timócitos simples-positivos (SP; CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) migram para região medular, onde ocorre a seleção negativa. Tal seleção é mediada pela expressão de antígenos próprios pelas TEC medulares e células dendríticas, que elimina timócitos autorreativos. Alguns timócitos CD4<sup>+</sup> autorreativos se diferenciam em linfócitos T reguladores (Treg). Depois de alguns dias na medula, os linfócitos imunocompetentes emigram do timo para a periferia onde participarão da resposta imune. Adaptação de Miller (2011).

A diferenciação intratímica inicia-se ainda no timo fetal com a entrada de células precursoras hematopoiéticas através da camada de células mesenquimais que cerca o órgão. Posteriormente, com o desenvolvimento dos vasos sanguíneos,

as células precursoras migram da circulação através de vasos presentes na junção córtico-medular do órgão (Ramond *et al.*, 2014). Sabe-se que a entrada de células precursoras acontece pela interação de moléculas de adesão presentes no estroma tímico e seus receptores nas células precursoras, em conjunto com a ação quimiotática de quimiocinas (Revisado em Ladi *et al.*, 2006). No timo, as células progenitoras tímicas iniciais (ETP – abreviatura do Inglês *early thymic progenitor*) iniciam a sua diferenciação, e os diferentes estágios de desenvolvimento são definidos de acordo com a expressão das moléculas co-estimuladoras CD4 (cluster de diferenciação 4) e CD8 (cluster de diferenciação 8), reconhecidos como duplo negativo (DN), duplo positivo (DP) e simples positivo (SP). Em camundongos, o primeiro estágio definido como duplo negativo (DN) contém quatro subtipos de timócitos agrupados nas populações denominadas de DN1, DN2, DN3 e DN4, definidos pela expressão diferencial de CD44 e CD25; de modo semelhante, em humanos, os estágios das populações DN são caracterizadas pela expressão sequencial de CD34, CD38 e CD1a (Dik *et al.*, 2005).

O primeiro estágio de diferenciação ocorre ainda próximo à junção córtico-medular e correspondem as células DN1 (camundongos: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; humanos: CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>), as quais ainda possuem a capacidade de se diferenciar em outros tipos de células hematopoiéticas (Porritt *et al.*, 2004; Weerkamp *et al.*, 2006). Em camundongos, foram descritos diferentes fenótipos dentro da população DN1 baseados na expressão de CD117 (c-kit) e CD24, sendo as células CD117<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup> as mais comprometidas com a linhagem de linfócito T (Porritt *et al.*, 2004). No córtex, os timócitos DN1 interagem com TEC através de ligantes da família NOTCH, como *Delta-like ligand 1* (DLL1) e 4 (DLL4), ativando a maquinaria celular que os direciona para diferenciação em linfócitos T (Schmitt *et al.*, 2004; Heinzl *et al.*, 2007).

Quando comprometidas com a linhagem de linfócitos T, as células DN1 ativadas proliferam e originam a população de timócitos DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>; CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD1a<sup>-</sup>) (Dik *et al.*, 2005). Esta população, por sua vez, modula a expressão de moléculas de superfície e migra para a região subcapsular do timo, enquanto iniciam o rearranjo dos loci gênico das cadeias  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  do TCR. O rearranjo acontece por recombinação somática dos segmentos variedade (V), diversidade (D) e junção (J), presentes no loci gênico das cadeias do TCR, e é mediado pelas enzimas ativadoras de recombinação tipo 1 e 2 (Dik *et al.*, 2005). Durante o

rearranjo, os timócitos DN2 passam para o estágio DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>; CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>), caracterizado pela cessão da atividade proliferativa. Nesse momento, acontece o primeiro *checkpoint* do processo de diferenciação intratímica chamado de seleção  $\beta$ . Nesse processo, a cadeia  $\beta$  rearranjada se associa a uma cadeia  $\alpha$  invariante do TCR ( $pT\alpha$ ) e às moléculas CD3, para formar um complexo pré-TCR que interage com moléculas do estroma tímico. Essa interação ativa sinais que inibem a morte por apoptose, estimulam a expansão celular, e inibem a recombinação do locus do TCR $\beta$  por exclusão alélica (Revisado em Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). Em consequência, os timócitos que não expressaram o TCR $\beta$  eficientemente não recebem os sinais de sobrevivência e morrem por apoptose. Dessa maneira, a seleção  $\beta$  assegura que somente os timócitos contendo TCR $\beta$  correto prossigam na diferenciação.

Os timócitos DN3 de camundongos diminuem a expressão de CD25, formando a população DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>), que rapidamente expressa moléculas co-estimuladoras CD4 e CD8, dando origem aos timócitos do segundo estágio de diferenciação chamados de duplo positivos (DP), os quais iniciam o rearranjo no locus gênico da cadeia  $\alpha$  definitiva do TCR. É importante citar que nessa transição de DN para DP, é observada uma população intermediária de células imaturas simples positivas para CD4 em humanos e CD8 em camundongos (Dik *et al.*, 2005).

O correto rearranjo da cadeia  $\alpha$  do TCR possibilita a expressão completa do receptor, iniciando o processo de seleção positiva, o segundo *checkpoint* da diferenciação. Os timócitos DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>low</sup>) são selecionados positivamente através da interação TCR dos timócitos com moléculas MHC carregadas com peptídeos de antígenos próprios (Complexo MHC:peptídeo), expressas por TEC presentes na região cortical (Revisado em Klein *et al.*, 2014). Uma interação de afinidade/avidéz intermediária com o complexo MHC:peptídeo de classe I leva a diminuição da expressão de CD4, mantendo somente a expressão de CD8. Enquanto uma interação com o complexo MHC:peptídeo de classe II diminui a expressão de CD8 e mantém a do CD4 na membrana. Timócitos que não interagem ou que interagem com grande afinidade/avidéz com o complexo são eliminados por apoptose. A seleção positiva origina as células do último estágio de diferenciação dos linfócitos chamado de simples positivo (SP).

Após a seleção positiva, os timócitos SP CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup>) e CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup>) migram para a região medular onde ocorre a seleção negativa,

*checkpoint* final da diferenciação intratímica. Nele, as TEC da região medular apresentam peptídeos de antígenos tecido-específicos (TRA – abreviatura do Inglês *tissue-restricted antigens*), expressos na célula pela ação do fator de transcrição regulador autoimune (AIRE – abreviatura do Inglês *autoimmune regulator*), aos timócitos SP (Liston *et al.*, 2003). Aqueles timócitos que interagem fortemente com os antígenos próprios morrem por apoptose, enquanto os que interagem fracamente são selecionados e completam o processo de diferenciação tímica. A eliminação de timócitos autorreativos coloca a seleção negativa como um dos processos de tolerância central, a qual previne a resposta imune a antígenos próprios. Ainda como parte da tolerância central, alguns timócitos CD4<sup>+</sup> autorreativos são direcionados para diferenciação em linfócitos T reguladores.

Depois de alguns dias na região medular, os timócitos SP imunocompetentes emigram do timo pelas vênulas pós-capilares da junção córtico-medular, através do gradiente de concentração do lipídio bioativo esfingosina-1-fosfato produzido por pericitos presentes nos vasos sanguíneos (Matloubian *et al.*, 2004; Zachariah e Cyster, 2010). Esses novos emigrantes tímicos vão povoar os tecidos e órgãos linfoides secundários como baço, linfonodos e placas de Peyer, onde passam a integrar a população de linfócitos virgens periféricos auxiliando na manutenção de diferentes repertórios de TCR (Revisado em Fink e Hendricks, 2011). Os linfócitos T CD4 reconhecem antígenos carregados em moléculas MHC de classe II presentes na membrana de células apresentadoras de antígeno, de forma a auxiliar fagócitos na eliminação de microrganismos extracelulares e ativar a diferenciação de linfócitos B para produção de anticorpos. Enquanto o principal papel dos linfócitos T CD8 é de reconhecer antígenos carregados no MHC de classe I, direcionando a eliminação de células infectadas por vírus ou outros patógenos intracelulares.

### **1.1.3 Células epiteliais tímicas**

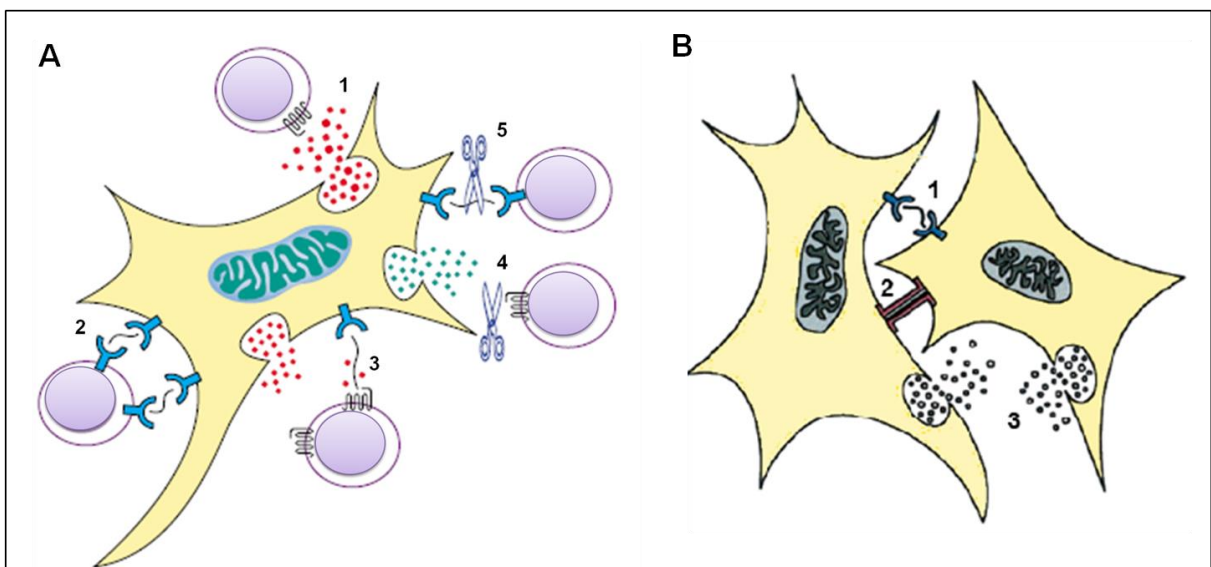
O microambiente tímico possui uma estrutura tridimensional composta, na sua maior parte, por timócitos e pelas TECs, as quais representam um elemento estritamente necessário para o potencial linfopoietico do timo. A importância do epitélio tímico para o desenvolvimento dos linfócitos T é evidenciado pela ausência da produção de linfócitos T imunocompetentes em indivíduos que carregam uma

mutação no gene que codifica o fator transcrição FOXP1, o principal responsável pela diferenciação das TEC durante o período embrionário (Nehls *et al.*, 1994; Pignata *et al.*, 1996; revisado em Boehm, 2008). Essas células representam o tipo celular mais abundante no timo e, em conjunto com macrófagos, células dendríticas e moléculas da matriz extracelular, auxiliam na diferenciação dos timócitos (Revisado em Alves *et al.*, 2009). Além disso, essas células formam complexos linfoepiteliais encontrados na região cortical do timo denominados complexos *Nurse* tímicos (TNC – abreviatura do Inglês *thymic nurse complex*) que abrigam linfócitos em desenvolvimento (Wekerle *et al.*, 1980).

Como descrito anteriormente, a formação do epitélio tímico ocorre a partir de TEP presente no timo primordial nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário e também pode ocorrer no timo pós-natal (Bleul *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2007; Ucar *et al.*, 2014). A formação do epitélio tímico recebe a contribuição tanto de células mesenquimais quanto linfócitos em desenvolvimento. Já foi demonstrado que as células mesenquimais presentes na crista neural auxiliam no desenvolvimento do timo primordial através da produção de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF; abreviatura do Inglês *fibroblast growth factor*) que contribuem para a diferenciação e manutenção das TECs (Revest *et al.*, 2001; Itoi *et al.*, 2007; revisado em Manley e Condie, 2010). Estudos com animais transgênicos, nos quais ocorre um bloqueio na diferenciação de linfócitos, mostraram que a presença de timócitos influencia a formação do córtex e da medula nos estágios tardios de desenvolvimento do epitélio tímico, tanto quanto na manutenção da estrutura do timo após o nascimento (Klug *et al.*, 1998; Klug *et al.*, 2002).

As TEC formam um tecido heterogêneo em termos de localização, fenótipo e função. Elas são divididas em dois subtipos, de acordo com a sua localização no timo, em corticais (cTEC) e medulares (mTEC), as quais são caracterizadas pela expressão da molécula de adesão de célula epitelial EpCAM (abreviatura do Inglês *epithelial cell adhesion molecule*), de moléculas do MHC de classe I e II, e diferentes tipos de citoqueratinas (Revisado em Alves *et al.*, 2014). Cada um dos subtipos de TEC possui marcadores específicos que auxiliam na sua identificação durante as abordagens experimentais, dentre eles o Ly51 (CD249) expresso por cTEC e a aglutinina 1 de *Ulex europaeus* (UEA-1) expressos por mTEC (Revisado em Alves *et al.*, 2014).

As células epiteliais presentes no timo são responsáveis pelos processos de seleção que geram linfócitos T imunocompetentes, como também linfócitos T reguladores, que irão atuar na resposta imune adaptativa nos tecidos e órgãos linfoides periféricos. Em camundongos, as TEC corticais são responsáveis pelo recrutamento de precursores hematopoiéticos, pelo comprometimento com a linhagem de células T, pela indução de recombinação dos genes do TCR, além de atuar na polarização da migração, proliferação, expressão das moléculas CD4 e CD8 e seleção positiva (Revisado em Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). Por sua vez, as TEC medulares são responsáveis pela atração dos timócitos positivamente selecionados, pela indução de tolerância central e pela migração das células T maduras para a periferia (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007; Nitta *et al.*, 2008). Essas funções são realizadas pela íntima interação que acontece entre as células epiteliais e os timócitos, as quais são fortemente influenciadas por hormônios e citocinas, que atuam de forma autócrina e parácrina, estimulando a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e quimiocinas (Revisado em Savino, 2007) (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Interações celulares no timo.** Em A estão representadas as interações entre TEC e os linfócitos em desenvolvimento. Essas interações acontecem através de fatores solúveis como quimiocinas e seus receptores (1), e entre receptores e moléculas da matriz extracelular (MEC) e seus receptores (2). Alternativamente, moléculas solúveis, como quimiocinas, podem se associar a MEC, modulando a ligação MEC-receptor (3). O controle dessas interações ocorre pela ação de enzimas chamadas de metaloproteinases de matriz (representadas pela tesoura) (4), que também atuam no remodelamento de elementos da

MEC (5). A figura B representa as interações celulares que as TEC mantém entre si através de ligantes e receptores de MEC (1), de junções comunicantes (2) e por substâncias solúveis de ação parácrina (3). Adaptação de Savino e Dardenne (2000); Savino *et al.*, (2002)

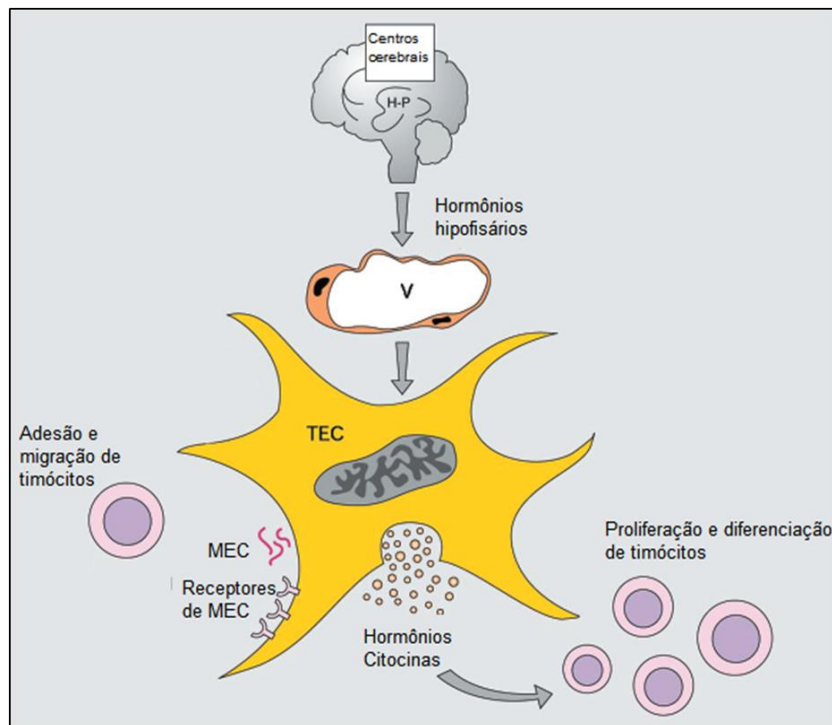
O epitélio tímico produz quimiocinas que atraem células precursoras hematopoiéticas para o timo em desenvolvimento e modulam a migração intratímica através da interação com receptores específicos ou com moléculas da matriz extracelular (Bleul e Boehm, 2000; Smaniotto *et al.*, 2005) (Figura 1.4 A e B). A quimiocina CCL25 (abreviatura do Inglês *chemokine (c-c motif) ligand 25*), produzida por TEC corticais, serve de fator quimiotático para células precursoras hematopoiéticas (Bleul e Boehm, 2000). Já foi visto que a quimiocina CXCL12 (abreviatura do Inglês *chemokine (c-x-c motif) ligand 12*) estimula a migração e contribui para a sobrevivência de células precursoras de linfócitos T (Ara *et al.*, 2003). Corroborando esses fatos, foi observada uma falha na entrada de células precursoras hematopoiéticas no rudimento tímico em camundongos deficientes em *Foxn1* acompanhado pela ausência da expressão das quimiocinas CCL25 e CXCL12 (Itoi *et al.*, 2001; Calderón e Boehm, 2011; 2012). Além disso, a ausência dos receptores de quimiocinas CCR9 (abreviatura do Inglês *chemokine (C-C motif) receptor 9*), CCR7 e CXCR4 (abreviatura do Inglês *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*) em células precursoras hematopoiéticas provoca uma falha na entrada e na expansão dessas células no timo em desenvolvimento (Ara *et al.*, 2003; Calderón e Boehm, 2011). As quimiocinas produzidas por TEC também são importantes na migração dos timócitos durante a diferenciação intratímica. As quimiocinas CCL25 e CXCL12 atuam principalmente em timócitos DN e DP durante sua migração pela região cortical, enquanto a quimiocina CCL19 participa da atração dos timócitos para medula e na saída de células maduras do timo (Revisado em Savino *et al.*, 2004; Takahama, 2006). Estes achados demonstram que as quimiocinas produzidas por TEC definem nichos importantes para o desenvolvimento intratímico.

A estrutura tridimensional do microambiente tímico é mantida pela produção de MEC por células do estroma, que formam um arcabouço de sustentação propício para a migração e consequente diferenciação dos linfócitos T (Figura 1.4). Já foi demonstrado que as TECs são capazes de produzir diversos tipos de MEC como fibronectina, colágeno IV, diferentes isotipos de laminina, galectinas e

glicosaminoglicanos como heparan sulfato e ácido hialurônico (Revisado em Savino *et al.*, 2003; Savino *et al.*, 2004) Além disso, essas células expressam receptores pelos quais interagem com a MEC do ambiente e com timócitos (Lannes-Vieira *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1994; Amarante-Mendes *et al.*, 1995) (Figura 1.4). Estudos *in vitro* utilizando linhagem de TEC humana pós-natal (THPN; abreviatura do Inglês *TEC human posnatal*) mostraram que essas células possuem receptores de matriz extracelular como ICAM-1, LFA-3, CD44, VLA-4, VLA-5, VLA-6 (Fernández *et al.*, 1994). Além disso, nosso laboratório demonstrou recentemente que essa linhagem é capaz de expressar moléculas de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidas em migração celular (Golbert *et al.*, 2013). Trabalhos recentes mostraram que a diminuição na expressão da cadeia  $\alpha$  das integrinas  $\alpha_6\beta_1$  (VLA-6 – abreviatura do Inglês *very late antigen 6*) e  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5 – abreviatura do Inglês *very late antigen 5*) em células THPN resultaram na alteração da expressão de genes envolvidos com migração celular além de provocar diminuição na interação entre as TEC e timócitos humanos através de ensaios *in vitro* de adesão (Linhares-Lacerda *et al.*, 2010; Golbert *et al.*, 2013). Particularmente, a diminuição de  $\alpha_6$  em THPN foi acompanhada por um aumento na expressão de HLA-DR e uma diminuição na expressão de HLA-ABC, demonstrando que existe uma interação entre receptores de MEC e a maquinaria celular envolvida com a seleção de timócitos (Golbert *et al.*, manuscrito em preparação).

Além de quimiocinas e MEC, o epitélio tímico serve como uma fonte de diversos tipos de hormônios e fatores de crescimento que contribuem para homeostasia do órgão, além de estar sob a influência de várias substâncias presentes na circulação sanguínea (Figura 1.5). Essas substâncias participam de um circuito de comunicação baseado no compartilhamento de ligantes e receptores que estabelecem um circuito de comunicação multidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino (Revisado em Blalock e Smith, 2007).





**Figura 1.5: Interações neuroimunoendócrinas no timo.** Diferentes hormônios produzidos na hipófise alcançam o timo através da circulação sanguínea (v=vaso sanguíneo) onde atuam sobre TEC estimulando a produção de fatores de crescimento, como hormônios e citocinas, moléculas da MEC e seus receptores. Por sua vez, essas moléculas influenciam diferentes processos celulares da diferenciação intratímica. TEC= Célula epitelial tímica; MEC= matriz extracelular. Adaptação de Savino e Dardenne (2000).

Dados da literatura mostram que a produção de MEC pelas TECs pode ser modulada após estímulo *in vitro* com interferon- $\gamma$  (Lannes-Vieira *et al.*, 1993; Lagrota-Cândido *et al.*, 1996). Também já foi demonstrado que o hormônio do crescimento (GH – abreviatura do Inglês *growth hormone*) e o fator 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1 – abreviatura do Inglês *insulin-like growth factor 1*) são produzidos no timo e podem atuar sobre TEC, aumentando a sua proliferação, a produção de citocinas e quimiocinas, e a expressão de moléculas e receptores de MEC (de Mello-Coelho *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 1997; Savino e Dardenne, 2000; Chu *et al.*, 2008). Além disso, os TNCs também são influenciados pelo GH, fato comprovado pela existência de um número maior de TNCs em animais transgênicos para o hormônio, como também em animais que receberam injeção intratímica de GH, quando comparados aos animais controles normais (Smaniotto *et al.*, 2005). Neste mesmo estudo foi demonstrado que TEC derivadas dos complexos TNCs de camundongos transgênicos para GH produziam mais laminina, uma molécula de

MEC importante na migração de linfócitos T, corroborando estudos anteriores, já citados acima. Essas alterações levam a uma modulação na interação timócito-TEC e consequente influência na migração dos timócitos (Savino *et al.*, 2004; Dardenne *et al.*, 2009; Smaniotto *et al.*, 2010).

#### 1.1.4 Fator de transcrição Forkhead box N1 (FOXN1)

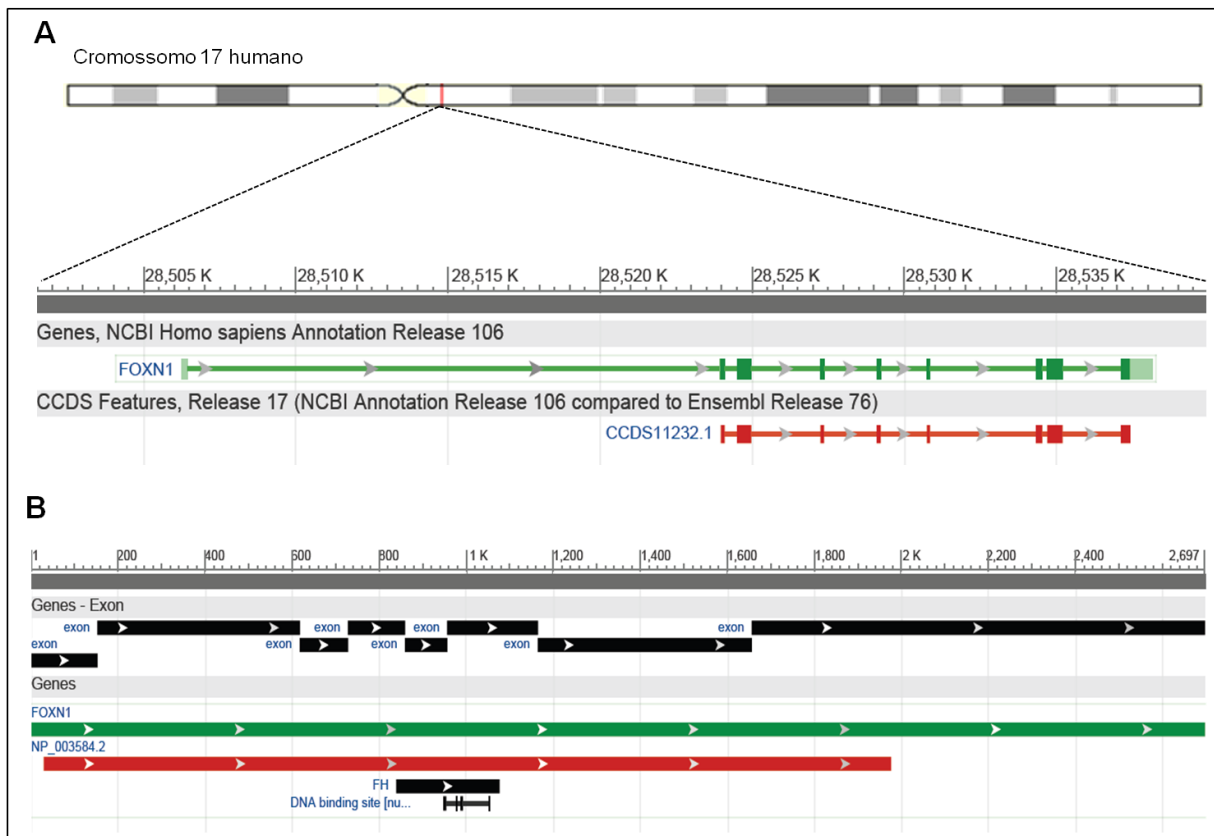
O fator de transcrição FOXN1 é expresso pelas células epiteliais do timo e da pele, e desempenha papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação das TEC e do folículo piloso, respectivamente (Brissette *et al.*, 1996; revisado em Blackburn e Manley, 2004). Esta proteína pertence a família dos fatores de transcrição *Forkhead box* (FOX), que compartilham um domínio de ligação ao DNA homólogo ao domínio de ligação encontrado no produto do gene *forkhead* (*fh*) de *Drosophila melanogaster*, de onde deriva o nome da família e também o nome do domínio de ligação ao DNA (*fh*) (Weigel *et al.*, 1989). O FOXN1 é expresso em animais vertebrados a partir do grupo dos gnatostomatos, e acredita-se que o seu gene tenha surgido como resultado da duplicação do gene *Foxn4* em um ancestral comum desses animais (Bajoghli *et al.*, 2009).

O gene *FOXN1*<sup>2</sup> humano está presente no *locus* 17q11-q12 do cromossomo 17, entre as posições 28.506.260 - 28.538.157 do genoma, com o tamanho de 31.898 pares de base (bp), compreendendo 9 éxons e 8 íntrons, sendo homólogo ao gene encontrado em outros mamíferos (Schorpp *et al.*, 1997) (Figura 1.5 A). Sua região codificante abrange os éxons 2 a 9 com cerca de 3.457 bp, incluindo os respectivos íntrons, cujo o RNA mensageiro maduro possui 2.697 bp, e codifica a proteína FOXN1 de 68,93 kDa com 648 aminoácidos (NCBI, 2013; UniProt, 2013) (Figura 1.5 B). O domínio *fh* de ligação ao DNA, codificado pelos éxons 5-7, é semelhante aos outros genes da família FOX, apresentando uma estrutura tridimensional característica em forma de hélice alada (*winged-helix*) que, quando ligada ao DNA, compreende três  $\alpha$ -hélices ligadas a três folhas- $\beta$  antiparalelas (Schüddekopf *et al.*, 1996; revisado em Coffe e Burgering, 2004). Além disso, evidências da literatura mostram que *Foxn1* possui um domínio conservado de

---

<sup>2</sup> Nomenclatura do genoma humano obtida do banco de dados do comitê de nomenclatura genômica HUGO (HGNC; *HUGO Gene Nomenclature Committee*). (Gray *et al.*, 2015)

ativação transcricional localizado na região C-terminal, codificado pelo éxon 8 (Schüddekopf *et al.*, 1996).



**Figura 1.6: Desenho esquemático do gene *FOXN1*, seu transcrito e proteína.** Em A está ilustrado o *locus* cromossômico do gene *FOXN1* humano, sua sequência genômica contendo íntrons e éxons (verde) e a região codificante (vermelho). Em B está mostrado o RNA mensageiro de *FOXN1*, contendo os éxons codificantes (preto), a sequência do RNA mensageiro maduro (verde) e a sequência proteica (vermelho), destacando o domínio conservado *fh* de ligação ao DNA. Esquemas adaptados da base de dados do NCBI (NC\_000017.11 – sequência genômica; NM\_003593.2 – RNAm e proteína) e da página de internet Gene Cards (GeneCards, 2014; NCBI, 2013).

O envolvimento de FOXN1 com desenvolvimento do timo foi sugerido a partir da observação, em camundongos e ratos, do fenótipo *nude*, o qual é caracterizado pela ausência de pêlos (alopécia congênita) e pelo desenvolvimento incompleto ou ausência total do timo acompanhado de uma imunodeficiência severa (Flanagan, 1966; revisado em Boehm, 2008). Estudos mostraram que esse fenótipo é causado por uma mutação no éxon 3 do gene *Foxn1*, resultante da deleção de um par de bases, que produz uma proteína mutante sem o domínio *fh* de ligação ao DNA

(Nehls *et al.*, 1994). Outra mutação no éxon 8, que codifica o domínio de ativação transcricional, também ocorre em ratos e acarreta o mesmo fenótipo observado nos animais *nude* (Schüddekopf *et al.*, 1996). Acredita-se que a perda de função observada nesses animais seja explicada pela falta do domínio de ativação transcricional, e não do domínio de ligação ao DNA, visto que os animais que apresentam a primeira mutação possuem o domínio de ligação ao DNA intacto (Schüddekopf *et al.*, 1996). Um fenótipo similar ao *nude*, em humanos, foi descrito em duas irmãs residentes de um vilarejo isolado no interior da Itália. Ambas apresentaram alopecia congênita, distrofia da unha e ausência do timo aliado a uma imunodeficiência severa (Pignata *et al.*, 1996). Esse fenótipo é caracterizado como uma doença autossômica recessiva, com uma grande incidência em uma pequena região da Itália que possui elevadas taxas de casamento consanguíneo. O fenótipo *nude* humano ocorre devido a uma mutação provocada pela substituição de uma citosina por uma timina (C→T) no éxon 5, o que resulta numa mutação sem sentido no resíduo 255 da proteína FOXP1 (Frank *et al.*, 1999), semelhante a mutação anteriormente encontrada nos animais *nude*.

No timo, a expressão de FOXP1 inicia-se ainda nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário. Em camundongos, sua expressão começa a partir do 11º dia de gestação em TEP presentes na terceira bolsa faríngea, acompanhada da expressão de glicoproteínas da família WNT, que podem estimular de maneira autócrina e/ou parácrina a expressão de FOXP1 no timo primordial (Balciunaite *et al.*, 2002). Além disso, já foi observado que as glicoproteínas WNT, especialmente WNT-4, podem induzir a expressão de FOXP1 em culturas primárias e em linhagens de TEC de camundongos em timo pós-natal (Balciunaite *et al.*, 2002). O provável mecanismo pelo qual WNT induz a expressão de FOXP1 é através da interação da proteína com receptores *Frizzled* presentes na superfície das TEC. Tal interação ativa uma importante via de sinalização que impede a degradação da proteína  $\beta$ -catenina, através da inibição da atividade do complexo proteico GSK-3 $\beta$ /Axin/APC. Dessa forma, a  $\beta$ -catenina se acumula no citoplasma e transloca para o núcleo, onde forma um complexo transcricional ativo com membros da família TCF/LEF de fatores de transcrição, que ativa a transcrição do gene FOXP1 (Balciunaite *et al.*, 2002; revisado em Staal e Luis, 2010). Essa via de sinalização pode ser estimulada pelo sal cloreto de lítio (LiCl), um conhecido inibidor da atividade da proteína GSK-3 $\beta$ , responsável pela fosforilação da  $\beta$ -catenina (Klein e Melton, 1996).

Durante o desenvolvimento do timo, FOXN1 atua na diferenciação de TEC progenitoras em TEC corticais e medulares (Su *et al.*, 2003). Esta função parece não estar presente no timo adulto, uma vez que foram identificadas células precursoras epiteliais FOXN1 negativas capazes de originar os subtipos de TEC em timos de animais adultos (Ucar *et al.*, 2014). Nas TEC, o FOXN1 está envolvido na expressão de moléculas MHC II, CD40, PAX1, catepsina L, CCL25 e do ligante DLL4, sendo este último um ligante importante para o comprometimento dos precursores linfóides com a linhagem de linfócitos T (Nowell *et al.*, 2011; Calderón e Boehm, 2012). Após o nascimento, o fator de transcrição continua sendo importante para a manutenção e homeostasia das TEC. Neste sentido, foi demonstrado em camundongos, que a diminuição dose-dependente de FOXN1 no timo pós-natal, através da inserção do cassete IRES-lacZ na região 3' não traduzida do gene *Foxn1*, resulta na desorganização do microambiente tímico, na redução da proliferação de TEC e numa diminuição na frequência de TEC UEA<sup>high</sup> MHCII<sup>high</sup> positivas (Chen *et al.* 2009). Em estudo recente, Bredenkamp e colaboradores (2014a) mostraram que fibroblastos embrionários murinos transfectados com o cDNA de *Foxn1* foram reprogramados para o fenótipo característico de TEC, e essas TEC induzidas foram capazes de estabelecer a diferenciação de linfócitos T, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essas observações demonstram claramente que FOXN1 desempenha um papel importante e indispensável para o desenvolvimento e função normais do timo.

## **1.2 Involução tímica associada à imunosenescência**

Durante o envelhecimento, as funções dos sistemas orgânicos no indivíduo diminuem como consequência de um processo multifatorial que abrange defeitos genéticos, alterações epigenéticas, desregulação nutricional, alterações na comunicação celular, exaustão de células-tronco, perda da função mitocondrial e da proteostase (López-Otín *et al.*, 2013). No sistema imunológico, esse processo é denominado de imunosenescência, e resulta na diminuição da função imunológica. Isso impede uma resposta imune eficiente a microrganismos patogênicos, às células malignas e a imunização, podendo acarretar a morte do indivíduo. De fato, pessoas idosas apresentam uma alta incidência de infecções, afetando órgãos como pulmões, pele e mucosas como também o trato urinário. Além disso, observa-se com frequência, em idosos, meningites provocadas por pneumococos e *Listeria sp.*,

infecções com *Mycobacterium tuberculosis* e infecções virais por citomegalovírus, herpes e influenza, sendo estas infecções severas e propensas a causar óbitos (Plowden *et al.*, 2004). Os pacientes idosos são alvos mais frequentes de infecções hospitalares para as quais os tratamentos disponíveis já não alcançam a eficácia esperada (OMS, 2014).

Os efeitos deletérios da imunosenescência estão associados a defeitos no desenvolvimento de células linfóides na medula óssea e no timo. A medula óssea é o sítio de diferenciação de células do sistema imune, a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTH), incluindo células mielóides, granulócitos, linfócitos B e precursores linfóides que irão colonizar o timo. O desenvolvimento hematopoiético é orquestrado pelas células do microambiente medular, composto por células-tronco mesenquimais, osteoclastos e adipócitos, as quais compõem nichos de diferenciação de CTH (Revisado em Sugiyama e Nagasawa, 2012).

Foi observado, em camundongos, um aumento na proliferação de CTH com a idade, contudo essas células falham em reconstituir, após transplante, a medula óssea de animais irradiados (Chambers *et al.*, 2007; Beerman *et al.*, 2013). Além disso, já foi visto que CTH de animais velhos (25 meses) apresentam desvio do potencial hematopoiético para o desenvolvimento de células mielóides levando ao prejuízo na produção de progenitores linfóides (Beerman *et al.*, 2013). Já o microambiente medular é caracterizado, durante o envelhecimento, pelo aumento no tecido adiposo e diminuição de osteoclastos, fato que pode ser consequência do favorecimento da diferenciação de células adiposas a partir de células-tronco mesenquimais (French *et al.*, 2002; Moerman *et al.*, 2004). Acredita-se que as alterações no nicho de diferenciação de CTH contribuam de maneira mais efetiva para senescência da medula óssea, um vez que CTH de animais com 2 meses de idade quando transplantadas para medula óssea de animais velhos, com 18 meses, apresentaram um desvio para diferenciação de células mielóides de modo similar a CTH de animais velhos (Sun *et al.*, 2012).

Similar à medula óssea, o timo também apresenta alteração na função ao longo do tempo de vida, num processo chamado de involução tímica, caracterizado principalmente pela diminuição na emigração de linfócitos T virgens para periferia e por modificações na arquitetura e composição do microambiente tímico, como aumento de células adiposas, diminuição e desorganização das regiões corticais e medulares (Aw *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; den Braber *et al.*, 2012). Esse

processo tem papel importante na imunosenescência pois a diminuição na produção de linfócitos T virgens causa uma diminuição no repertório de clones de receptores de células T (TCR) na periferia. Isto limita a resposta imune adaptativa contra novos patógenos, ainda que, em humanos, o número de linfócitos T virgens se mantenha próximo aos números encontrados em indivíduos jovens através de proliferação de linfócitos T virgens em estruturas linfóides periféricas (Douek *et al.*, 1998; Kilpatrick *et al.*, 2008; den Braber *et al.*, 2012).

Steinman e colaboradores (1985) observaram que, em humanos, a involução tímica é um processo fisiológico contínuo, não relacionado a puberdade, que tem início no primeiro ano de vida, com a redução das áreas de células epiteliais e aumento de tecido adiposo a partir da segunda década de vida. Ainda não se conhece por que a involução tímica ocorre, contudo algumas hipóteses podem auxiliar a entender o processo. Uma delas, proposta por Jacques Miller, é comentada na revisão de Dowling e Hodgkin (2009) em que os linfócitos T são células de vida longa e não necessitam de uma produção contínua, assim o timo deixa de ser um órgão necessário na vida adulta. Já George e Ritter (1996) exploraram a ideia que o timo representa um órgão dispensável, e que involução tímica contribui para direcionamento da energia do organismo para reprodução. A hipótese proposta por Dowling e Hodgkin (2009) mostra, a partir de modelos matemáticos, que a involução tímica favorece a seleção periférica de linfócitos T virgens. Já outros estudiosos argumentam que a involução tímica ocorre como um mecanismo compensatório da diminuição da migração de células precursoras provenientes da medula óssea que acontece com a idade (Revisado em Boehm e Swann, 2013).

Apesar dos defeitos relatados na produção de CTH durante a imunosenescência, estudos de transferência celular mostram que ocorre um recrutamento e colonização normal de células precursoras linfóides para o timo de animais velhos, com 18 meses de idade (Gui *et al.*, 2007). Além disso, experimentos utilizando a técnica de transplante sob a cápsula renal demonstraram que células precursoras linfóides de animais velhos (18-22 meses) são capazes de colonizar o timo proveniente de animais jovens além de induzir uma diferenciação intratímica semelhante às células de animais jovens, de 2 meses de idade (Sun *et al.*, 2012). Estes trabalhos indicam, de forma clara, que as alterações no desenvolvimento de linfócitos T durante a involução tímica se deve a mudanças em células do estroma

do tímico em relação às células do compartimento linfóide. De fato, estudos em modelos animais de camundongos mostram que TEC de animais, entre 17-18 meses, apresentam uma menor proliferação e uma maior taxa de apoptose quando comparado com células de animais jovens de 6 semanas (Gui *et al.*, 2007). Acredita-se que tais alterações tenham uma relação estreita com a expressão do fator de transcrição FOXN1, responsável pela diferenciação e pela manutenção de TEC (Su *et al.*, 2003).

Com relação a esse fato, foi demonstrada a diminuição na expressão de *Foxn1* em timos de camundongos a partir do 3º mês de vida quando comparado com timo de animais com 1 mês de idade (Ortman *et al.*, 2002; Kvell *et al.*, 2010). Estudos utilizando modelo murino de deleção condicional dos éxons 5 e 6 do gene *Foxn1*, resultou em atrofia tímica em animais jovens, a partir de 3 meses de idade, semelhante a observada em timo de animais velhos, com mais de 14 meses de idade (Sun *et al.*, 2010). Neste mesmo modelo experimental, foi verificada, nos timos dos camundongos transgênicos para deleção de *Foxn1*, uma redução no número e aumento de apoptose de mTEC, especificamente do subtipo UEA-1<sup>high</sup> MHC II<sup>high</sup>, quando comparado com animais controles com expressão normal do fator (Cheng *et al.*, 2010). De maneira oposta, timos de camundongos com idade entre 12-35 meses, transgênicos para *Foxn1*, apresentaram morfologia semelhante a timos de animais jovens (3 meses), como também mantiveram altos números de ETP e TEC quando comparado com animais velhos normais de mesma idade (Zook *et al.*, 2011). Corroborando os dados acima, a retomada da expressão de *Foxn1* em TEC de animais com 12 e 24 meses de idade foi suficiente para restabelecer o microambiente tímico de forma semelhante ao timo de animais jovens (2 meses) (Bredenkamp *et al.*, 2014b).

### **1.2.1 Regeneração terapêutica do timo**

O declínio da função do sistema imune adaptativo durante a senescência afeta especialmente a população de pacientes idosos, que são alvos frequentes de infecções hospitalares para os quais os tratamentos já não são efetivos, trazendo consequências médico-econômicas para os sistemas de saúde (OMS, 2014). Esse fato traz à luz a necessidade de novas terapias que restaurem a função imunológica nesses indivíduos. Uma estratégia possível é o restabelecimento da produção



normal de linfócitos T imunocompetentes através da regeneração terapêutica da função tímica.

Diversos modelos de regeneração do timo são encontrados na literatura, muitos deles envolvem dieta com restrição calórica, bloqueio na produção de hormônios sexuais, tratamento com hormônios pituitários, fatores de crescimento e citocinas, que recuperam a função das células epiteliais tímicas e dos timócitos, e em consequência a função tímica (Yang *et al.*, 2009; revisado em Heng *et al.*, 2010; revisado em Taub *et al.*, 2010). Alguns desses modelos já estão sendo empregados em estudos clínicos com pacientes humanos com o intuito de investigar o papel dessas substâncias na regeneração tímica após infecções, transplante de medula óssea e durante o envelhecimento (revisado em Ventevogel e Sempowski, 2013). Como exemplo, um estudo pioneiro em pacientes adultos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – abreviatura do Inglês *human immunodeficiency virus*), o tratamento com o hormônio do crescimento, GH, promoveu um aumento na função tímica e no número de linfócitos T CD4+ *naïve* e total circulantes (Napolitano *et al.*, 2008). Além disso, Herasimtschuk e colaboradores (2008) (Herasimtschuk *et al.*, 2008) demonstraram que a administração conjunta de GH com a terapia antiviral altamente ativa (HAART – abreviatura do Inglês *highly active antiretroviral therapy*) em pacientes lipodistróficos portadores de HIV-1 melhorou a resposta específica de linfócitos T ao vírus.

Além das estratégias farmacológicas, modelos experimentais em engenharia de tecidos, terapia celular e gênica começam a ser explorados para a criação de um tecido tímico funcional. Estudos pioneiros demonstraram a diferenciação *in vitro* de linfócitos T, a partir de células precursoras hematopoiéticas humanas, em sistemas de co-cultivo com estroma tímico de camundongos em arcabouços tridimensionais de tântalo (CellFoam) (Poznansky *et al.*, 2000). Essa observação favoreceu a ideia da construção de um órgão *in vitro*, suscetível a transplante, para reposição do timo senescente. Nesse contexto, a identificação de células precursoras epiteliais tímicas capazes de originar os subtipos de TEC podem ser ferramentas importantes para o restabelecimento da microestrutura tímica (Ucar *et al.*, 2014; revisado em Lepletier *et al.*, 2015). Contudo, pouco ainda se sabe sobre a biologia e o papel dessas células no timo adulto.

Na terapia gênica, o principal alvo dos estudos é o fator de transcrição FOXP1 expresso em TEC. Recentemente, Bredenkamp e colaboradores (2014a)

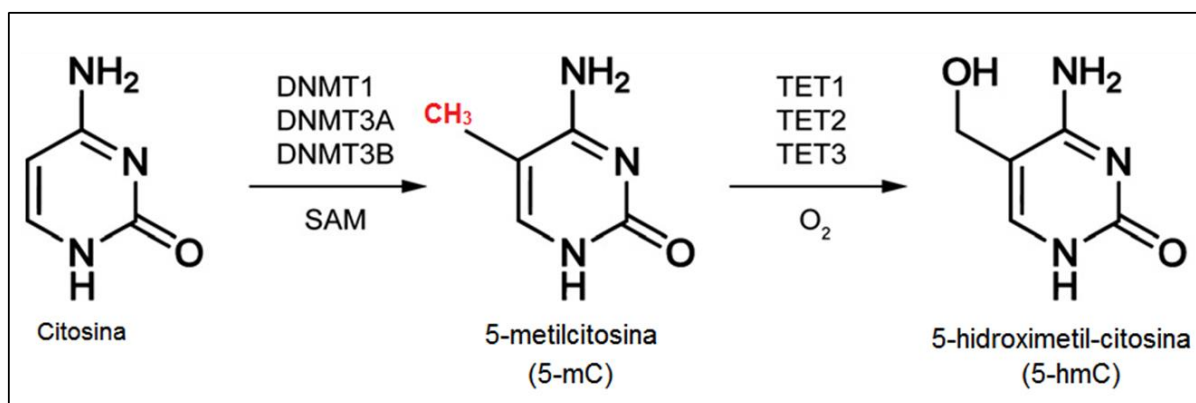
demonstraram a transdiferenciação de fibroblastos embrionários murinos em TEC através de transfecção do gene *Foxn1*. Os fibroblastos transdiferenciados em TEC foram capazes de formar tecido tímico após transplante sob cápsula renal de camundongos além de estimular a diferenciação de linfócitos T tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, esse mesmo grupo demonstrou que a indução da expressão de *Foxn1* foi capaz de restabelecer a função e arquitetura tímica em camundongos velhos (Bredenkamp *et al.*, 2014b). Esses últimos resultados indicam que a diminuição de FOXN1 durante a involução tímica é um evento-chave para o declínio da função do órgão. Desse modo, entender os mecanismos envolvidos na sua diminuição pode ajudar a elaborar estratégias terapêuticas menos evasivas e custo-efetivas para serem empregadas em pacientes imunocomprometidos.

### 1.3 Metilação de DNA

Epigenética é a área do conhecimento que estuda modificações na cromatina que podem ser herdadas por meio de mitose ou meiose, mas que não modificam a sequência do DNA (Revisado em Berger *et al.*, 2009). Esses padrões epigenéticos são estabelecidos por enzimas específicas durante a formação dos gametas e no período de desenvolvimento embrionário, podendo ser modificado ao longo da vida do indivíduo durante processos de diferenciação celular, envelhecimento, na resposta ao estresse e em processos patológicos como neoplasias e autoimunidade (Lopatina *et al.*, 2002; Beerman *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). As modificações epigenéticas englobam alterações químicas em nucleotídeos da sequência do DNA como a metilação de citosinas e modificações pós-traducionais de histonas tais como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação e isomerização, que irão atuar no controle da transcrição gênica, modificando o estado de compactação da cromatina (Revisado em Berger, 2007).

A metilação do DNA resulta de uma reação enzimática que adiciona um grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição do carbono 5 do anel aromático da citosina, na direção 5', ocorrendo principalmente em citosinas localizadas na direção 5' a uma guanina, conhecidos como dinucleotídeo CpG. Porém, a presença de dinucleotídeos não-CpG metilados como CpA, CpT e CpC é frequente em plantas e recentemente foi observado em células de mamíferos (Yan *et al.*, 2011). A reação de metilação é realizada por uma família de enzimas chamadas metiltransferases de DNA (DNMTs

– abreviatura do Inglês *DNA methyltransferases*), as quais realizam a transferência de um grupo CH<sub>3</sub> da S-adenosil-L-metionina (SAM) para a deoxicitosina, formando os produtos S-adenosil-homocisteína e 5-metilcitosina (5-mC), respectivamente (Revisado em D'aquila *et al.*, 2013) (Figura 1.6). As DNMTs podem atuar de duas maneiras principais, na geração de novos padrões de metilação e na manutenção de padrões preexistentes. A enzima DNMT1 foi a primeira metiltransferase descoberta, sendo responsável por manter a metilação preexistente a partir do reconhecimento de moléculas de DNA semi-metiladas geradas durante a replicação do DNA, enquanto que as DNMT3A e DNMT3B são as metiltransferases que atuam produzindo novos padrões de metilação (Gruenbaum *et al.*, 1982; Okano *et al.*, 1999). A metilação também pode ser regulada pela ação de enzimas desmetilantes como as proteínas de translocação da família Ten-11 (TET – abreviatura do Inglês *ten-11 translocation family proteins*), que oxidam 5-mC em 5-hidroximetil-citosina (5-hmC) (Figura 1.6). Essa nova base inibe a ação de DNMTs, possui baixa afinidade com proteínas ligantes de CpG metilados e podem ser intermediários em processos de reparo do DNA (Revisado em Dahl *et al.*, 2011).



**Figura 1.7: Processo enzimático de metilação de citosinas no DNA.** A figura descreve as reações enzimáticas envolvidas na metilação de citosinas no DNA. Durante a replicação, as citosinas são alvo da ação de enzimas metiltransferases de DNA (DNMT1, 3A e 3B) que transferem o grupo metil (CH<sub>3</sub>) da S-adenosil-L-metionina (SAM) para a deoxicitosina produzindo o nucleotídeo modificado 5-metilcitosina (5-mC). O 5-mC sofre ação de agentes desmetilantes da família de proteínas de translocação TET que oxidam 5-mC em 5-hidroximetil-citosina (5-hmC). Adaptação de Dahl *et al.* (2011).

Os dinucleotídeos CpG são pouco frequentes no genoma pois, uma vez metilados por ação das DNMTs, sofrem desaminação espontânea com a

substituição da 5-mC por uma timina (Lander *et al.*, 2001). Contudo, regiões intergênicas, íntrons e regiões contendo elementos repetitivos do genoma, que possuem alta porcentagem de guanina e citosina (GC), apresentam CpG metilados (Revisado em D'aquila *et al.*, 2013). Acredita-se que a metilação em elementos repetitivos representa um mecanismo contra a expressão indesejada desses elemento (Yoder *et al.*, 1997). De fato, estudos recentes têm mostrado que a hipometilação de elementos repetitivos derivados de transposon, como o elemento nuclear intercalado longo *LINE-1* (abreviatura do Inglês *long interspersed nuclear elements-1*) e o elemento nuclear intercalado curto *Alu*, está presente durante a progressão de vários tipos de câncer, além disso, alterações na metilação nesses elementos já foram relacionadas com doenças autoimunes e obesidade (Huang *et al.*, 2014; Na *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014).

Os CpG que não sofrem mutação estão geralmente metilados, contudo dinucleotídeos CpG não-metilados são encontrados em diferentes regiões do genoma, formando conjuntos chamados de ilhas CpG (CGI – abreviatura do Inglês *CpG island*). Essas ilhas constituem sequências de até 1000 pb com alto conteúdo de GC (acima de 55%) presentes tanto nas regiões promotoras, associadas a sítios de início de transcrição (TSS – abreviatura do Inglês *transcriptional start site*), quanto nas regiões inter e intragênicas (Brenet *et al.*, 2011; revisado em Deaton e Bird, 2011). A presença de metilação em CGIs nas regiões promotoras e do primeiro éxon pode estar relacionada tanto com a inibição quanto com a ativação da transcrição de genes, sendo um importante mecanismo de controle da expressão gênica (Brenet *et al.*, 2011; Chatterjee e Vinson, 2012). Além disso, a presença de metilação em CGIs de regiões intragênicas também está envolvida na regulação da atividade de promotores alternativos (Maunakea *et al.*, 2010).

A metilação de DNA é um evento epigenético presente na formação dos gametas e nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Nesses processos ocorre uma desmetilação total do genoma que é restaurado mais tarde pela ação das enzimas DNMTs, que estabelecem um novo padrão epigenético mantido nas células seguintes, num processo chamado de reprogramação epigenética (Reik *et al.*, 2001). Acredita-se que tais eventos sejam essenciais para o crescimento normal do organismo, visto que animais mutantes deficientes em DNMTs morrem no 11º dia de estágio embrionário (Li *et al.*, 1992). Além disso, a metilação em CpG está envolvida na inativação de alelos por *imprinting* genômico e

na inativação do cromossomo X que ocorre em mamíferos (Li *et al.*, 1992; Cotton *et al.*, 2014). Alterações no padrão de metilação de CpG tem sido relacionada a diversos tipos de doenças como câncer, doenças autoimunes, cardiovasculares e neurológicas, além de ter um importante papel durante a senescência e na exposição a poluentes ambientais (Wong *et al.*, 2004; Baccarelli *et al.*, 2009; De Prins *et al.*, 2013; Van Roon *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015).

No sistema imunológico, modificações epigenéticas são observadas em processos de diferenciação e de ativação celular (Revisado em Wilson *et al.*, 2005; revisado em Deaton *et al.*, 2011; Almamun *et al.*, 2014). No timo, especificamente, a expressão do fator de transcrição AIRE em TEC é controlada pela metilação de CpG presentes no promotor de seu gene. Foi observado, em humanos, que TEC medulares e corticais possuem baixa porcentagem de metilação na região promotora de *AIRE*, o que foi correlacionado com a presença de expressão do gene nessas células, enquanto que células derivadas de timomas e tímócitos apresentaram alta porcentagem de metilação do promotor de forma inversamente proporcional à expressão do gene (Kont *et al.*, 2011). Alterações na metilação de CpG também são observadas em regiões reguladoras de genes que codificam as citocinas interleucina-2 (IL-2) e IL-4 em linfócitos recém-emigrantes do timo e na diferenciação de linfócitos T auxiliares para o fenótipo Th<sub>2</sub> (Berkley *et al.*, 2013). O gene para o fator de transcrição FOXP3 (abreviatura do Inglês *forkhead box P3*), um importante marcador de linfócitos T reguladores, possui uma região com CpG não metilados em sua terminação 5' não traduzida (5' UTR), denominada de região desmetilada específica de Treg (TSDR; abreviatura do Inglês *treg-specific demethylation region*) que regula a expressão do gene e é suscetível a modificações durante a ativação da célula em processos patológicos (Floess *et al.*, 2007; Polansky *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2014).

Além dos processos descritos acima, alterações no padrão de metilação no genoma de células do sistema imune estão sendo relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias e doenças autoimunes. Uma redução na metilação na região do promotor do gene *ITGAL* que codifica a cadeia  $\alpha$  da integrina  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1 – abreviatura do Inglês *lymphocyte function-associated antigen 1*) foi observada em linfócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e também em linfócitos de pacientes com esclerose múltipla (Lu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014a). Enquanto que um aumento na metilação de CpG na região promotora do gene

*FOXP3* foi observada em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com esclerose múltipla (Wang *et al.*, 2014b). Além disso, linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com lúpus ativo possuem um aumento na expressão de perforina acompanhado com uma hipometilação na região promotora do gene que codifica a proteína, o que pode contribuir para a patogênese da doença (Kaplan *et al.*, 2004). A metilação de ilhas de CpG presentes em regiões promotoras de genes supressores de tumor em células hematopoiéticas é observada em diferentes tipos de neoplasias. Com relação a isso, a inativação dos genes para as proteínas inibidoras de quinase dependente de ciclina p15 e p16 foi observada em diversos tipos de leucemias (Herman *et al.*, 1997).

### **1.3.1 Metilação de DNA na imunosenescência**

Ao longo da vida do indivíduo as funções dos sistemas orgânicos são diminuídas num processo chamado de senescência. Tal processo é acompanhado por alterações epigenéticas, especialmente na metilação de CpG. Estudos pioneiros demonstraram que ocorre uma redução da metilação em diferentes tecidos do organismo ao longo do envelhecimento e que essa alteração pode ser resultado de múltiplos fatores que afetam a atividade de DNMTs, o metabolismo de carbono envolvido na síntese de SAM e a estabilidade do DNA (Romanov e Vanyushin, 1981; Pogribny *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 1987). Já foi demonstrado que hipometilação ao longo do envelhecimento pode ocorrer em regiões repetitivas do DNA, como os elementos *Alu* (Bollati *et al.*, 2009). A redução da metilação de CpG em elementos repetitivos do DNA pode contribuir para a patogênese de doenças relacionadas ao envelhecimento como neoplasias e autoimunidade (Huang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014). Além disso, a redução global da metilação no genoma, observada em células senescentes *in vitro*, pode ser resultado da perda do seu potencial de replicação, fato que é corroborado pela ausência desse fenômeno em células imortalizadas (Lopatina *et al.*, 2002).

Paradoxalmente, durante o envelhecimento, algumas regiões do genoma apresentam um aumento na metilação em CpG, essas regiões estão relacionadas com a expressão de genes tecido-específicos importantes na manutenção da homeostasia local. Um aumento na metilação do promotor do gene para colágeno tipo I aliado a uma diminuição na expressão do gene foi observado no tecido do

ligamento periodontal de indivíduos velhos (Takatsu *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2006). Fato semelhante foi observado para gene do receptor de estrogênio, em que foi mostrado um aumento na metilação em amostras de células do cólon de indivíduos velhos e também em amostras de tumor de colon (Issa *et al.*, 1994). O aumento da metilação com a idade também foi demonstrado em genes relacionados como o desenvolvimento de tumores, o que pode contribuir com a alta incidência de câncer na população mais velha (Waki *et al.*, 2003; So *et al.*, 2006). Esses estudos ilustram a dinâmica de metilação do DNA durante o envelhecimento, caracterizada pela hipometilação total do genoma acompanhado pela hipermetilação de genes tecido-específicos, considerada um biomarcador do processo de senescência (Maegawa *et al.*, 2010; Koch e Wagner, 2011; revisado em Johnson *et al.*, 2012).

Assim como a maioria dos sistemas do organismo, o sistema imunológico também entra em processo de senescência que pode ser mediado por alterações epigenéticas. Modificações no padrão de metilação de DNA em células-tronco hematopoiéticas podem contribuir para o declínio na sua função durante o envelhecimento (Beerman *et al.*, 2013; Beerman e Rossi, 2014). Uma redução na expressão de enzimas DNMTs, enzimas modificadoras de histonas e enzimas de remodelamento da cromatina acompanhado por uma hipometilação global do genoma foram observadas no baço e no timo de ratos velhos, com 18 meses de idade (Sidler *et al.*, 2013). Estudos anteriores já haviam demonstrado uma redução na metilação global, ao longo do envelhecimento, em timos de bovinos e em timócitos humanos (Romanov e Vanyushin, 1981; Golbus *et al.*, 1990). Em linfócitos T, o aumento na expressão da integrina LFA-1 durante o envelhecimento é relacionado com a hipometilação de CpG presentes na região promotora do gene *ITGAL*, que codificada a cadeia  $\alpha_L$  da integrina, de modo semelhante ao que acontece em linfócitos de pacientes com doenças autoimunes (Zhang *et al.*, 2002). Monócitos de doadores idosos também apresentaram uma diminuição na metilação de CpG em regiões intrônicas dos genes para neuropilina-1 (*NRP1*) e para neurexina-2 (*NRXN2*) (Tserel *et al.*, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Estudar a regulação epigenética de *FOXP1* no epitélio tímico humano durante a senescência.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar aspectos morfológicos de timo humano provenientes de doadores de diferentes idades;
- Analisar a expressão dos genes *FOXP1*, *DLL1*, *DLL4* e *WNT-4* em amostras de timo humano;
- Avaliar a expressão da proteína FOXP1 em amostras de timo humano;
- Investigar os mecanismos de expressão do gene *FOXP1* em linhagem de TEC humana pós-natal;
- Determinar o padrão de metilação de DNA em resíduos CpG presentes em regiões do gene *FOXP1* em linhagem de TEC humana e em amostras de timo humano.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Anticorpos

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizados os anticorpos primários anti-FOXN1 humano produzido em cabra, anti- $\beta$ -catenina humana produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemanha) e anti-citoqueratina total de vaca produzido em coelho da Dako (Aligent Technologies, Glostrup, Dinamarca). Os anticorpos secundários anti-Ig de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 produzido em cabra (GAR-488 – *goat anti-rabbit*) e anti-Ig de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 produzido em cabra (GAM-488 – *goat anti-mouse*) foram obtidos da Molecular Probes (Life Technologies) enquanto que o anti-Ig de cabra produzido em burro conjugado ao fluorocromo Alexa 546 (DAG-546 - *donkey anti-goat*) foi obtido da Invitrogen.

### 3.2 Cultivo celular

A linhagem de TEC humana de origem pós-natal (THPN – abreviatura do Inglês *TEC human postnatal*) foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Toribio (Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Espanha). Esta linhagem foi obtida de timo de criança através da técnica de explante tímico seguida de clonagem por diluição limitante (Fernández *et al.*, 1994). No presente estudo, as células THPN foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Mediatech, Virgínia, EUA,) acrescido de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), ciprofluxacina 100 U/mL e 10% de soro bovino fetal (Cultilab, São Paulo, Brasil) e mantidas em estufa com fornecimento de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Alternativamente, as células THPN foram cultivadas em sistema de cultivo em estruturas tridimensionais utilizando microcarreadores macroporosos de celulose (Cytopore<sup>TM</sup>, Asaki Kasei Medical Co., GE Healthcare, Japão), com base no método descrito por Paraguassú-Braga e colaboradores (2012), com algumas modificações. Os microcarreadores foram inicialmente hidratados em PBS, autoclavados e equilibrados com meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (meio completo) sobre insertos Transwell<sup>TM</sup> (Costar, Corning Incorporated, EUA). Após 30 minutos, células THPN em suspensão

num volume de  $2 \times 10^5$  células foram adicionadas aos poços contendo 100  $\mu\text{L}$  da solução de microcarreadores e cultivadas em meio completo por até quatro dias em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.3 Amostras de timo humano

Amostras de timo humano foram obtidas de crianças e adultos submetidos à cirurgia cardíaca do Instituto Nacional de Cardiologia Gottsegen Gyorgy (Budapeste, Hungria) e do departamento de cirurgia cardíaca da Universidade de Debrecen (Debrecen, Hungria), respectivamente. Os procedimentos para coleta das amostras foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa e ciência do Conselho de Pesquisa Médica da Hungria (ETT-TUKEB; *Egészségügyi Tudományos Tanács-Tudományos és Kutatásetikai Bizottság*) sob o número 11739-/2014/EKU (107/2014.) (ANEXO 1). Os fragmentos foram mantidos em meio RPMI completo a  $4^\circ\text{C}$  até o uso. Depois de retirado tecido conjuntivo adjacente, as amostras foram divididas em pequenos pedaços e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  para a realização dos experimentos de PCR em tempo real e imunofluorescência. Para análise histológica, fragmentos de timo foram fixados em solução de formalina neutra, clarificados com xilol, desidratados em concentrações crescentes de álcool e incluídos em parafina. Cortes parafinados das amostras de timo foram corados com hematoxilina-eosina para análise morfológica do órgão.

Ao todo foram utilizadas 15 amostras de timo humano, de doadores femininos e masculinos, com idades entre cinco dias e 78 anos, conforme descrito na tabela 3.1. As amostras foram divididas em três diferentes grupos de acordo com a idade do doador. No grupo denominado “pós-natal” foram agrupadas as amostras dos doadores com idades de cinco dias e 1 ano; o grupo “jovem-adulto” inclui timos de doadores com idades de 7, 10, 14 e 17 anos e o grupo “adulto-idoso” compreende as amostras de doadores com 49, 57, 59, 66, 75 e 78 anos (Tabela 3.1). Amostras dos doadores de cinco dias e 59 anos foram utilizadas como referência para os estudos de análise de metilação de DNA.

**Tabela 3.1:** Características das amostras de timo humano.

Grupos	Amostra	Idade	Sexo	Experimentos
Pós-natal	1	5 dias	Feminino	PCRq, Histologia, Imunofluorescência, Metilação de DNA
	2	1 ano	D	PCRq
	3	1 ano	D	PCRq
	4	1 ano	D	PCRq
Jovem-adulto	5	7 anos	Feminino	PCRq, Histologia
	6	10 anos	Masculino	PCRq, Histologia
	7	14 anos	Masculino	PCRq, Histologia
	8	17 anos	Masculino	PCRq, Histologia
Adulto-idoso	9	49 anos	Feminino	PCRq
	10	57 anos	Feminino	PCRq, Histologia, Imunofluorescência
	11	57 anos	Feminino	PCRq, Histologia
	12	59 anos	Masculino	PCRq, Histologia, Metilação de DNA
	13	66 anos	Masculino	PCRq
	14	75 anos	Feminino	PCRq, Histologia
	15	78 anos	D	PCRq, Histologia

PCRq: Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativo; D: desconhecido

### 3.4 Indução da via de sinalização de WNT pelo tratamento com cloreto de lítio

Células da linhagem THPN foram cultivadas em meio completo por dois dias para crescimento e estabelecimento de uma monocamada de células. Após esse tempo, as células foram tratadas com 20 mM de cloreto de lítio (LiCl) pelos períodos de 6 e 18 horas como descrito previamente (Balciunaite *et al.*, 2002; Staal *et al.*, 2004). Células cultivadas nas mesmas condições, tratadas ou não com cloreto de sódio (20 mM) foram utilizadas como controle negativo. Após o tratamento as células

em cultura foram utilizadas para obtenção de RNA ou fixadas com metanol 100% para serem utilizadas em ensaios de imunofluorescência.

### 3.5 Imunofluorescência

A dupla detecção de citoqueratina total e FOXN1 nas amostras de timo humano foi realizada através de imunofluorescência, após marcação sequencial com anticorpos específicos descritos no item 3.1. Para isso, cortes congelados de timo, entre 10 µm e 20 µm, foram fixados em lavagens sucessivas de acetona 100%, hidratados em PBS e incubados por 30 minutos com PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS/BSA 1%; BSA – abreviatura do Inglês *bovine serum albumin*) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo primário para citoqueratina total (1:100), por uma hora e 30 minutos, em câmara úmida. Após incubação, os cortes foram lavados com PBS e imediatamente submetidos à incubação com anticorpo secundário GAR-488 (1:400), por 45 minutos, em temperatura ambiente, em câmara escura. Após primeira marcação, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo primário específico para FOXN1 (1:50) por uma hora e 30 minutos, em câmara úmida, seguido de lavagem e marcação com anticorpo secundário DAG-546 (1:400) por 45 minutos, em temperatura ambiente, na câmara úmida. Finalizada as marcações, os cortes foram montados com meio de montagem para imunofluorescência *ProLong® Gold antifade reagent* (Life Technologies, Oregon, EUA) contendo corante nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para posterior observação da marcação. De forma semelhante, células THPN cultivadas em placas de oito poços ou em microcarreadores foram fixadas em metanol 100%, hidratadas com PBS, bloqueadas com PBS/BSA 1% e incubadas com anticorpos primários para citoqueratina total (1:100), FOXN1 (1:50) e  $\beta$ -catenina (1:30) por uma hora e 30 minutos em câmara úmida. Após esse tempo, as amostras foram lavadas em PBS seguido de incubação com anticorpos secundários GAR-488, DAG 546 ou GAM-488 (1:400), durante 45 minutos, em câmara escura. Após lavagem com PBS, as placas foram montadas com meio de montagem contendo o corante nuclear DAPI, para posterior observação em microscópio de fluorescência. Em ambos os ensaios, a análise e a captura de imagens foram realizadas no microscópio de fluorescência *Zeiss Axio Imager A2* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com o

programa de computador *Axio Vision Release 4.8.2* (Zeiss). Amostras incubadas somente com anticorpos secundários e anticorpos primários de imunoglobulinas não relacionadas foram utilizadas como controles negativos, não constatando marcação significativa.

### **3.6 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)**

O RNA total de amostras de timo humano e de células THPN obtidas de diferentes sistemas de cultivo foi isolado pelo método fenol-clorofórmio como descrito a seguir. Pequenos fragmentos de tecido tímico congelado foram processados com auxílio de homogenizador de tecidos (T10 Basic, IKA®) em 1 ml de Trizol (TriReagent®, MRC, Ohio, EUA), seguido da extração de RNA pelo método fenol-clorofórmio. Células da linhagem THPN cultivadas em monocamadas ou em arcabouços 3D, como descrito no item 3.2, foram liberadas do substrato pelo tratamento com tripsina/EDTA 0,002g (Gibco BRL, Maryland, EUA) por 10 minutos, centrifugadas, lavadas em PBS e homogenizadas em 1ml de Trizol. As amostras de timo e THPN, em Trizol, foram incubadas com 200 µl de clorofórmio, agitadas por 15s e centrifugadas por 15 minutos a 4°C na velocidade de 12000 g. Após centrifugação, a mistura contendo uma separação definida em três fases, uma fase inferior de cor vermelha, uma fase intermediária de cor branca e uma fase superior aquosa transparente foi obtida, sendo essa última fase a que contém o RNA. Cuidadosamente, a fase aquosa das amostras foi separada em um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol 100%, seguido de uma leve mistura pela inversão do tubo. A solução foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente, e em seguida novamente centrifugada por 10 minutos a 4°C na velocidade de 12000 g. Após centrifugação, o sobrenadante das amostras foi retirado, preservando o sedimento contendo RNA. O sedimento de cada amostra foi lavado com 1 mL de álcool 75% e centrifugado por 5 minutos a 4°C na velocidade de 12000 g. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram secas a temperatura ambiente, para eliminar os restos de álcool presentes na amostra. Após secagem, o RNA foi resuspendido com água livre de RNases e DNases, incubado por 10 minutos a 65°C, levemente agitado e colocado no gelo para posterior quantificação. A pureza e a concentração do RNA total das amostras foram determinadas no espectrômetro NanoDrop ND 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA) a partir da razão das

absorbâncias nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm. As amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C até o uso.

Somente amostras de RNA livres de proteínas e fenol foram utilizadas para as reações de síntese do cDNA. Para cada reação, foram utilizados até 2 µg de RNA total com o kit *High Capacity cDNA Synthesis* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A reação de síntese do cDNA foi realizada no volume total de 40 µL contendo 20 µL de RNA na concentração de 100 ng/µL e 20 µL da mistura contendo 2 µL de tampão RT (10X), 0,8 µL de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs, 100mM), 2µL de oligonucleotídeos aleatórios (10X, RT *random primers*), 1 µL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase em água livre de RNases (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). As reações foram realizadas no termociclador *A&B thermocycler 2720* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com uma etapa de incubação por 10 minutos a 25 °C, seguido de uma incubação por 2 horas a 37 °C e uma etapa final de 5 minutos a 85 °C para inativação da enzima. O cDNA obtido foi diluído cinco vezes, com água livre de RNases, e mantido em freezer a -20 °C até utilização.

### **3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Reações de PCR foram utilizadas para avaliação da expressão gênica em amostras de timo humano e em células da linhagem THPN. Nas reações, iniciadores específicos para os genes estudados foram selecionados de trabalhos prévios, após revisão da literatura, ou desenhados a partir de sequências específicas depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI – abreviatura do Inglês *National Center for Biotechnology Information*) do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH – abreviatura do Inglês *National Institute of Health*) utilizando o programa de computador Primer3, disponível na página de internet do NCBI (Ye *et al.*, 2012). Todas as sequências utilizadas estão listadas na Tabela 3.1.

Amplificações de PCR após reação da transcriptase reversa (RT-PCR) foram realizadas para avaliação da indução da expressão de *FOXN1*, em células THPN, após tratamento com LiCl. Para cada reação, foi utilizado 8 µl de cDNA diluído (1:5) de cada amostra misturado em água livre de RNases contendo 1X de tampão da enzima Taq polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,025mM de dNTPs, 0,05

U/μl da enzima Taq polimerase (Todos da Applied Biosystems, Califórnia, EUA), e 0,5 μM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *FOXN1* e para o gene constitutivo *HPRT-1* (Tabela 3.1). As reações foram realizadas no termociclador *A&B thermocycler 2720* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) contendo um ciclo para desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos a 60°C e extensão por 30 segundos a 72°C. Após reação, dez microlitros de cada reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% por 40 minutos sob voltagem 90. As bandas amplificadas foram visualizadas sob a luz ultravioleta pela coloração com brometo de etídio.

Para a análise da expressão gênica por PCR quantitativo (PCRq), 5 μL de cDNA diluído de cada amostra foram adicionados a 5 μL de Maxima Sybr Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Califórnia, EUA) contendo 0,3 μM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3.1) em placas de 384 poços. As reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM® 7900HT *sequence analysis* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) contendo o programa de computador *Sequence Detector System 2.2* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), seguindo o protocolo de ciclos em três estágios, conforme especificado pelo fabricante, com uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos com desnaturação por 15s a 95°C, anelamento por 30s a 60° C e extensão por 30s a 72°C. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Depois da amplificação, os valores Ct (abreviatura do Inglês *cycle threshold*) de cada amostra foram transformados em quantidade relativa pela fórmula  $Q = E^{(Ct_{min} - Ct_{Amostra})}$ , em que Q é quantidade, E é a eficiência da amplificação (=2; definida como 100%),  $Ct^{min}$  é o menor Ct para o gene e  $Ct^{Amostra}$  é o Ct da amostra do gene de interesse. Em seguida, os valores Q dos controles endógenos (*HPRT-1*, *RPL13A* e *TFRC*) de cada amostra foram utilizados como entrada no programa de computador *GeNorm*, para determinar a estabilidade de expressão através do valor de *M* (Vandesompele *et al.*, 2002). Os genes menos estáveis, os quais apresentaram *M* de maior valor, foram excluídos na análise. Os genes considerados estáveis foram utilizados para o cálculo do fator de normalização (FN), o qual foi utilizado para obtenção de valores de expressão normalizados (VEN) de cada gene de interesse através da fórmula  $VEN = Q_{gene\ de\ interesse} / FN$ .

**Tabela 3.2:** Sequências senso e reverso dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e de PCR quantitativo\*.

Gene-Alvo	Sequência senso (5'→3')	Sequência reverso (5'→3')	Tamanho do produto (pb)	Observações
<i>FOXN1</i> (NM_003593.2)	TCCCTCACTCACTGACTTCG (1628-1647)	GTGGCATCGAAGATGATGTC (1746-1727)	119	Ref. (Clark et al., 2005)
Delta-like 1 ( <i>DLL1</i> ) (NM_005618.3)	TGCAACCAGGACCTGAACTA (1323-1342)	CTCCGTTCTTACAAGGGCTG (1491-1472)	163	†
Delta-like 4 ( <i>DLL4</i> ) (NM_019074.3)	CAGAGTGTCCGATATCAGCG (2288-2307)	CTCCTGCCTTATACCTCCGT (2402-2383)	115	†
<i>WNT-4</i> (NM_030761.4)	CAGCAGAGCCCTCATGAACC (647-666)	GCCAGCACGCTTTACCTCACA (768-747)	122	Ref. (Liu et al., 2012)
<i>HPRT-1</i> (NM_000194.2)	CCTGGCGTCGTGATTAGTG (183-201)	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC (320-301)	138	†
<i>TFRC</i> (NM_001128148.1)	CTAGTGTTCTTCTGTGTGGCAGTT (115-138)	ACAATGGTTCTCCACCAAACAAG (197-175)	83	†
<i>RPL13A</i> (NM_001270491.1)	CGGACCGTGCAGGTATGCT (244-263)	AGCAGGAACCAACCATCCGCT (368-347)	123	†

\*Os genes *HPRT-1* (Hipoxantina fosforribosiltransferase 1), *TFRC* (receptor de transferrina) e *RPL13A* (proteína ribossomal L13A) foram utilizados como controles endógenos. (†) Oligonucleotídeos desenhados com o programa de computador Primer3. *FOXN1*: *forkhead box N1*; *DLL1*: *Delta-like 1 (Drosophila)*; *DLL4*: *Delta-like 4 (Drosophila)*; *WNT-4*: *wingless-type MMTV integration site family, member 4*.

### 3.8 Extração de DNA genômico das amostras de timo humano

Pequenos fragmentos congelados de timo e células da linhagem THPN foram submetidos à extração de DNA genômico utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Wisconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células THPN foram cultivadas em garrafas de cultura celular em meio RPMI completo até atingirem o estado de confluência de 80%. Então, as células foram removidas da garrafa utilizando solução de tripsina/EDTA 0,002g (Gibco, Maryland, EUA), centrifugadas, contadas e lavadas em PBS. Após nova centrifugação, as células contidas no sedimento foram lisadas com a adição de 600 µL solução de lise



nuclear (fornecido pelo fabricante), em conjunto com ação mecânica, até não ter aglomerados de células visíveis. As amostras de timo humano foram lisadas em solução de lise nuclear, com auxílio de pistilo, até não ter pedaços de tecido visíveis. Após lise, as amostras foram incubadas com RNase A (4 mg/ml; fornecida pelo fabricante) por 15 minutos a 37°C. Depois, as amostras foram tratadas com 200 µL de solução de precipitação de proteínas (fornecido pelo fabricante), agitadas por 20 segundos, colocadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas por 4 minutos a 12000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA foi coletado e transferido para um tubo plástico contendo 600 µL de isopropanol 100%. As amostras foram agitadas por inversão do tubo até o aparecimento de uma massa branca em forma de fios (DNA) e centrifugadas por 12000 rpm a temperatura ambiente. O sedimento contendo o DNA foi lavado com álcool 70%, pela inversão do tubo, e novamente centrifugado por 1 minuto por 12000 rpm. Após lavagem, as amostras foram submetidas à secagem, em temperatura ambiente, por 30 minutos, seguido da adição de 50 µL de solução de rehidratação de DNA [Tris-HCl (10 mM; pH 7.4) EDTA (1 mM; pH 8.0)] e incubação por 1 hora a 65°C. Após extração, a pureza e a concentração das amostras de DNA foi obtida no espectrofotômetro NanoDrop ND 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA) a partir da razão das absorbâncias nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram mantidas a 4°C até o uso.

### **3.9 Tratamento com bissulfito de sódio**

O tratamento com bissulfito converte todas as citosinas não-metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas são resistentes ao tratamento (Darst *et al.*, 2010). Dessa forma, é possível gerar dois tipos distintos de sequências de DNA, que podem ser avaliados por diferentes técnicas moleculares como PCR específico para metilação e sequenciamento de DNA. No estudo, foram utilizados 2 µg de DNA de cada amostra para o tratamento com bissulfito de sódio com o kit *Epitect® Bisulfite* (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo as recomendações do fabricante. Para as reações de conversão, o DNA das amostras, diluído em 20 µL de água livre de RNases e DNases, foi misturado com 85µL da solução de bissulfito de sódio (*bisulfite mix*; fornecido pelo fabricante) e 35µL do tampão de proteção do DNA (*DNA protect buffer*; fornecido pelo fabricante) totalizando um volume de 140 µL. As

reações de conversão foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) nas condições indicadas na tabela 3.2. Durante a reação, as citosinas não-metiladas sofrem sulfonação (adição de bisulfito) e desaminação (remoção do grupo amina), convertendo-se em sulfonato de uracila. Após essa etapa, o DNA convertido foi purificado utilizando colunas de sílica (*EpiTect spin columns*, Qiagen, Hilden, Alemanha) como descrito pelo fabricante. Brevemente, todo conteúdo da reação foi misturado a 560 µL de tampão BL, transferido para coluna de sílica e centrifugado por um minuto a 13.000 rpm para ligação do DNA convertido. Após centrifugação, as colunas foram lavadas com 500 µL de tampão BW, seguido de centrifugação por um minuto a 13.000 rpm. Na etapa seguinte, as colunas foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente, com tampão BD, o qual promove a remoção do bisulfito do sulfonato de uracila, convertendo-o em uracila. Depois da incubação, as colunas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão BW conforme descrito acima. Após lavagens, as colunas foram centrifugadas por um minuto a 13.000 rpm e incubadas por cinco minutos a 56°C para retirada total de quaisquer líquidos remanescentes. Ao final, o DNA convertido foi eluído em água livre de RNAses e DNAses, quantificado por espectrometria e mantido em freezer a - 20°C até uso. A conservação do DNA convertido em baixas temperaturas é necessária visto que o processo de conversão resulta na perda de complementaridade do DNA, fazendo com que fique mais instável, sendo assim mais propenso a degradação.

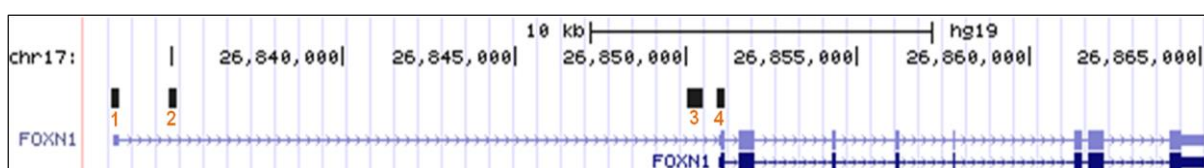
**Tabela 3.3:** Condições da reação de conversão de DNA com bissulfito de sódio.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	25 min	60 °C
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	1 h 25 min	60 °C
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	2 h 55 min	60 °C

### 3.10 Análise de metilação do DNA

### 3.10.1 Seleção das regiões e desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para DNA convertido com bissulfito de sódio

Regiões contendo possíveis resíduos de CpG metilados foram selecionadas na sequência do gene *FOXN1* de acordo com dados experimentais contidos no banco de dados do genoma humano, montagem h19, da Universidade da Califórnia – Santa Cruz (UCSC; Califórnia, EUA), realizado por laboratórios pertencentes ao Consórcio Enciclopédia de Elementos de DNA (ENCODE – abreviatura do Inglês *Encyclopedia of DNA Elements*), na seção metilação de DNA por RRBS (abreviatura do Inglês *reduced representation bisulfite sequencing*) (Kent *et al.*, 2002; ENCODE, 2012). As regiões selecionadas foram utilizadas como alvos para desenho de iniciadores específicos para sequências de DNA tratado com bissulfito de sódio (Figura 3.1). O desenho dos iniciadores foi realizado com o programa de computador *MethylPrimer Express* versão 1.0 (Applied Biosystems) e com o programa *MethPrimer* (Li e Dahiya, 2002). Estes programas possuem algoritmos para o desenho de iniciadores específicos para DNA tratado com bissulfito seguindo os critérios descritos por Li e Dahiya (2002). As sequências dos iniciadores utilizados estão listados na tabela 3.3.



**Figura 3.1: Localização genômica das regiões selecionadas para análise de metilação de resíduos CpG no gene FOXN1.** As regiões foram selecionadas através de dados experimentais de metilação de CpG depositados pelo consórcio ENCODE na base de dados da UCSC. Adaptação da representação gráfica do gene *FOXN1* obtida banco de dados do genoma humano (hg19) da UCSC (Kent *et al.*, 2002).

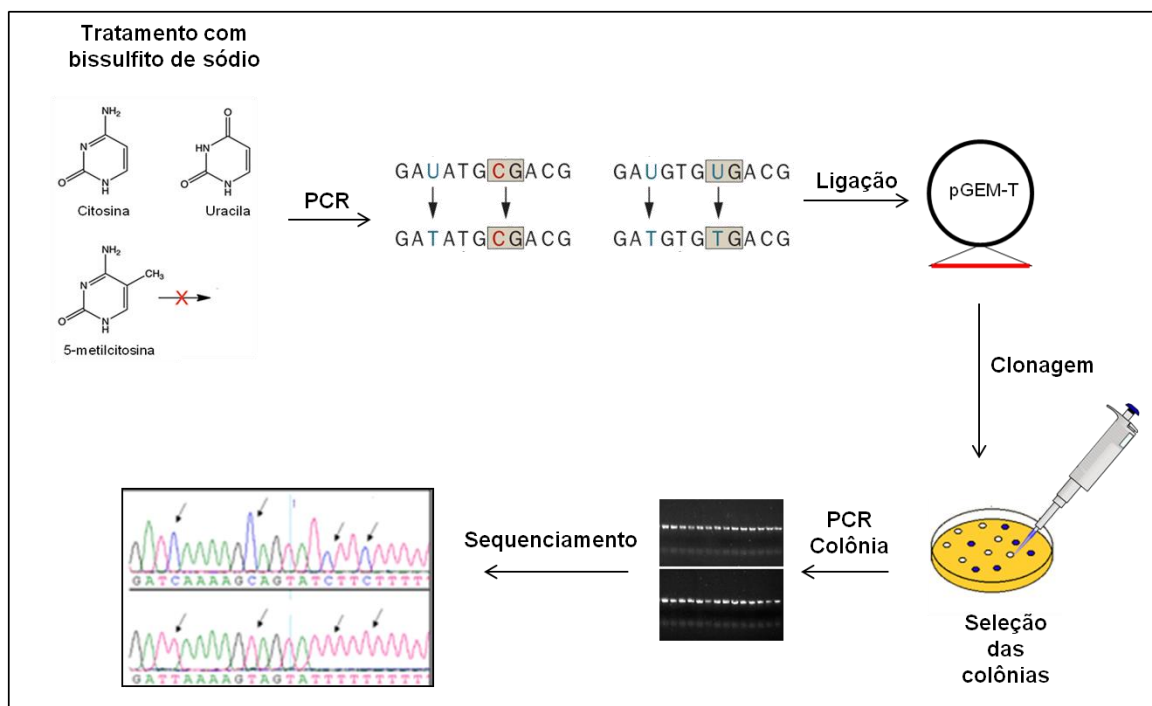
**Tabela 3.4:** Sequências senso e reverso dos iniciadores específicos para regiões do gene *FOXN1* após conversão com bissulfito de sódio\*\*.

Nome de região	Sequencia senso (5→3)	Sequencia reverso (5→3)	Tamanho do produto
1 (C07)	TTTGTTAAATAAGAGTTAAGGAGTAAATTA	ATCTAAAAAACCAAAAACCTCTATCC	208 pb
2 (C20)	GTTTAGGGTGAGTTAGGTAGGGATAG	AAAAACAAATTTCTAACTCTAAAAATAAAT	258 pb
3 (DB1)	TTGTTGGTATTGTTTGAGAGGA	CCTCCATACAAATAAACCAACC	416 pb
4 (DB2)	GGTTTTAGTTTAAGGATGGGGT	TTAACCTAAACCCAAACCCA	273 pb

\*\*Os iniciadores foram desenhados com auxílio dos programas *MethylPrimer Express* e *MethPrimer* segundo critérios estabelecidos por Li e Dahiya (2002).

### 3.10.2 Sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio

Sequenciamento do DNA convertido com bissulfito de sódio foi utilizado para quantificar os resíduos de CpG metilados presentes no gene de *FOXN1* nas sequências previamente selecionadas. Para isso, foram utilizadas amostras de DNA convertido da linhagem celular THPN e amostras de timo humano dos doadores de cinco dias e 59 anos. As etapas realizadas para o sequenciamento são detalhadas nos tópicos abaixo e esquematizadas na figura 3.2.



**Figura 3.2:** Representação esquemática das etapas experimentais utilizadas para o sequenciamento de DNA convertido com bissulfito de sódio.

a) PCR das amostras de DNA convertidas com bissulfito de sódio: Amostras de DNA obtidas de timo humano e da linhagem celular THPN, convertidas com bissulfito de sódio, foram utilizadas em reações de PCR utilizando a enzima *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Invitrogen). Cada reação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo 60 ng de DNA convertido misturados com 2,5 µL de tampão de PCR (1X; *High Fidelity PCR buffer*, Invitrogen), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM; Invitrogen), 1 µL de sulfato de magnésio (2 mM; MgSO<sub>4</sub>) e 500 nM dos iniciadores específicos para regiões estabelecidas como descrito no item 3.10.1. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial por 1 minuto a 94 °C, seguido de 35 ciclos com 15 segundos de desnaturação a 94 °C, anelamento por 30 segundos, com a temperatura de 58 °C para os iniciadores das regiões DB1, DB2 e C07 e 60 °C para os iniciadores da região C20; e alongação por 45 segundos a 68 °C. Depois de finalizadas, as reações foram mantidas a 4 °C ou no freezer a -20°C para serem utilizadas posteriormente.

b) Purificação dos produtos de PCR: Após amplificação, o volume total da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização dos produtos através de coloração por brometo de etídeo e posterior purificação dos produtos utilizando o kit QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha) para purificação a partir de gel de agarose, segundo as instruções do fabricante. As bandas correspondentes aos produtos desejados foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi, pesadas e colocadas em um tubo cônico plástico em que foi adicionado o tampão de solubilização QC (*QC buffer*) no volume igual a três vezes ao peso da banda previamente aferido. A seguir, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 50°C até completa dissolução do gel seguido da adição de um volume (igual ao peso do gel) de isopropanol 100%. A seguir, as amostras foram agitadas gentilmente e colocadas em colunas de sílica (*QIAquick column*, Qiagen, Hilden, Alemanha) para purificação do produto, segundo instruções do fabricante. As colunas contendo os produtos a serem purificados foram centrifugadas por um minuto a 13.000 rpm, para ligação do DNA. Após centrifugação, foram adicionados 500 µL tampão QC nas colunas, seguido de centrifugação por um minuto a 13.000 rpm, para retirada de possíveis vestígios de agarose. Depois desta etapa, as colunas foram incubadas

com 750 µL tampão de lavagem PE (Qiagen, Hilden, Alemanha) por cinco minutos e posteriormente centrifugadas, por um minuto a 13.000 rpm, para retirada do tampão. As colunas, então, foram submetidas a uma nova centrifugação para remover quaisquer vestígios de tampão PE. Ao final, as amostras foram eluídas em 25 µL de água ultra pura para posterior quantificação no espectrofotômetro NanoDrop ND 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA). Os produtos purificados foram mantidos em freezer -20°C para posterior utilização.

c) Clonagem dos produtos purificados: os produtos purificados foram inseridos no plasmídeo pGEM-T (pGEM®-T *Easy Vector System I*; Promega, Wisconsin, EUA) através de reação de ligação utilizando a enzima T4 ligase (Promega, Wisconsin, EUA), conforme instruções do fabricante, com algumas modificações. Cada reação de ligação foi realizada num volume total de 11 µL em que 4 µL do produto purificado (20 - 24 ng) foi misturado com 5 µL de tampão de ligação (*2X Rapid Ligation Buffer*), 1 µL do vetor pGEM®-T *Easy* (50 ng) e 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (3U/µl). A mistura foi incubada a 16 °C (temperatura ótima para atividade da enzima T4 DNA Ligase) durante 4 horas. A seguir, 5 µL da reação de ligação foi adicionada a 100 µL de bactérias competentes (*Escherichia coli*, linhagem JM109), as quais foram colocadas para proliferar em meio de cultura estéril líquido LB Broth base (Lennox Broth base, Invitrogen, Califórnia, EUA) durante uma hora e 30 minutos a 37°C, em tubos cônicos plásticos, sob agitação constante de 600 rpm. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por três minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e o sedimento de bactérias, ressuspendido em 100 µL de meio LB Broth base, foi semeado em placas bacteriológicas contendo meio de cultura sólido LB ágar (Lennox L Agar, Invitrogen, Califórnia, EUA) contendo ampilicina, 50 mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e 100 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para seleção das colônias positivas. As bactérias foram cultivadas por 16 horas em estufa a 37°C.

d) Verificação da inserção do fragmento de interesse e purificação do inserto: placas contendo colônias em crescimento foram selecionadas para verificação da inserção do fragmento desejado utilizando o sistema de seleção de colônias azuis e brancas. Até 10 colônias brancas foram selecionadas, recolhidas das placas e

incubadas com 20 µL de Quilex (5%) por 10 minutos a 95 °C para isolamento do DNA plasmidial. A confirmação da inserção do fragmento de interesse foi realizado através de reação de PCR em um volume total de 50 µL utilizando a polimerase de DNA AmpliTaq® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), em que 3 µL da reação do Quilex foi acrescido na mistura contendo 5 µL de tampão de PCR, 15 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>; *GeneAmp 1X PCR Buffer*), 2,5 µL de dNTPs (0,2 mM) e 2,5 µL de cada par dos iniciadores utilizados em (a). As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) nas condições: desnaturação inicial por 1 minuto a 95 °C, seguido de 35 ciclos com 15 segundos de desnaturação a 94 °C, anelamento por 30 segundos, com a temperatura de 58 °C para os iniciadores das regiões DB2 e C07 e 60 °C para os iniciadores da região C20; alongação por 45 segundos a 72 °C e extensão final por 6 minutos a 72 °C. Após reação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmação da amplificação do fragmento desejado. Então, os produtos de amplificação de cada uma das colônias foram isolados com kit de purificação de produtos de PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo as orientações do fabricante. Ao final, o produto purificado foi eluído em 23 µL de água, livre de RNases e DNases, e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop ND 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA) para serem utilizados nas reações de sequenciamento.

e) Reação de sequenciamento: 90 ng dos produtos purificados de cada colônia foram utilizados para reação de sequenciamento com o kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Cada reação foi realizada com tampão de sequenciamento, BigDye® e os iniciadores, senso ou reverso, utilizados nas reações de PCR anteriores. As reações foram feitas no termociclador GeneAmp® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), com uma desnaturação inicial por 1 minuto a 96 °C seguido de 25 ciclos com 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. A seguir, os produtos foram purificados por precipitação com isopropanol 65%, seguido de lavagem em etanol 60% e secagem a temperatura ambiente. Os produtos foram ressuspensos em formamida e encaminhados para leitura no sequenciador de 96 capilares ABI3730xl (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) da Plataforma de Sequenciamento de DNA RPT01A da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ (PDTIS/FIOCRUZ).

### 3.10.3 Análise do sequenciamento

As sequências obtidas após as reações de sequenciamento foram analisadas no programa de computador *BioEdit: Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (Ibis Biosciences, Califórnia, EUA), para retirada de possíveis sequências não relatadas e análise dos cromatogramas quanto a correta adição de bases. Após essa análise prévia, as sequências selecionadas foram alinhadas com a sequência genômica de interesse utilizando o algoritmo de múltiplo alinhamento de sequências *ClustalW* versão 1.83 (Larkin *et al.*, 2007). As sequências alinhadas foram então utilizadas para quantificação dos resíduos CpG com o auxílio do programa de computador *BiQ analyzer* v2.00 (Bock *et al.*, 2005), em que percentual de metilação em cada CpG por clone e o percentual médio total foi determinado para cada sequência, por amostra, tendo como parâmetros o percentual de identidade de sequência acima de 80% e o percentual de conversão de citosinas em timinas (C→T) acima de 90%. Diagramas do tipo *lollipop* foram confeccionados para cada amostra com auxílio do programa da internet QUMA (abreviatura do Inglês *Quantification Tool for Methylation Analysis*) (Kumaki *et al.*, 2008).

### 3.11 Análise estatística

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador *GraphPad Prism* versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$  em teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Dunn.

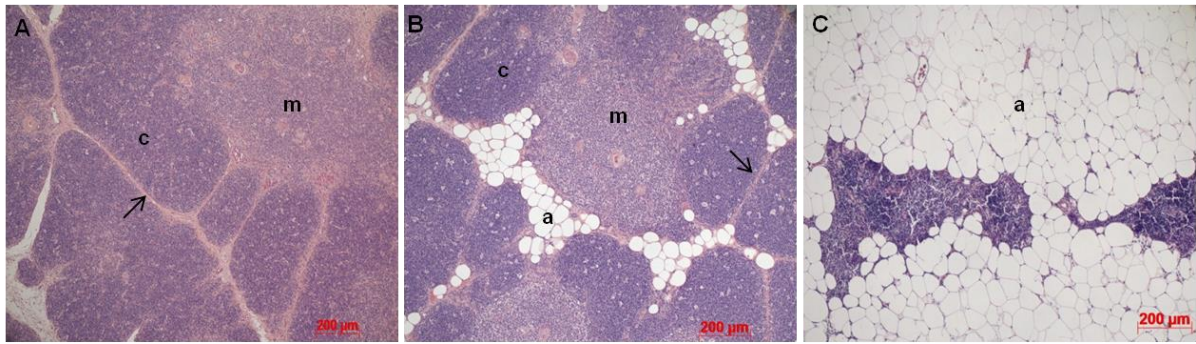


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Arquitetura tecidual e distribuição de células epiteliais no timo humano em diferentes idades

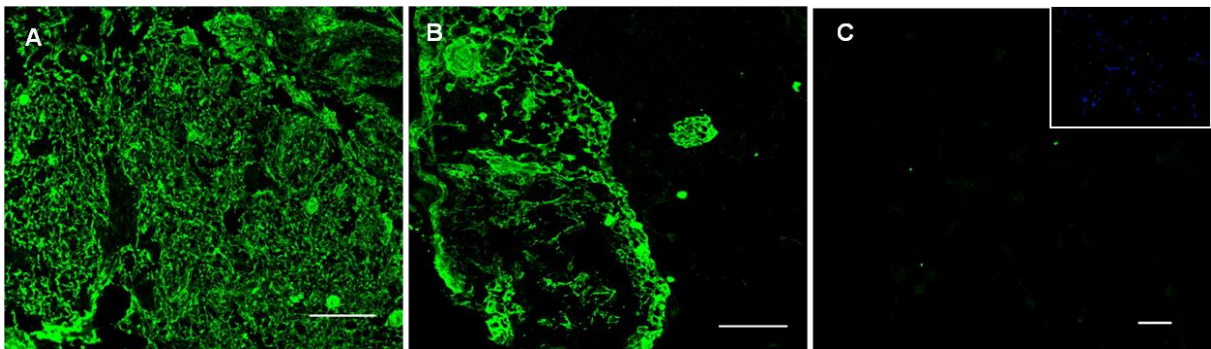
Cortes histológicos de timo foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação das características morfológicas. Nas amostras de timo pós-natal e jovem-adulto, representadas pelos timos dos doadores de cinco dias e 14 anos, respectivamente, pode-se observar uma morfologia característica do timo, com lóbulos envoltos em uma cápsula de tecido conjuntivo contendo as regiões cortical e medular bem distintas, sendo que no timo de 14 anos é possível observar a infiltração de células de tecido adiposo (Figuras 4.1A e B). Nas amostras de timo adulto-idoso, representada pelo timo do doador de 75 anos, foi possível observar uma desorganização da arquitetura tímica, apresentando pequenos espaços de tecido epitelial com regiões linfoides circundadas por tecido adiposo (Figura 4.1C). Além disso, no timo adulto-idoso foi observado que as regiões cortical e medular estão desorganizadas, com poucos linfócitos (Figura 4.1C).

Além da morfologia, também foi analisada a expressão de citoqueratina total, um marcador para TEC, nas amostras de timo em estudo. Foi visto que, em timo pós-natal, representado pela amostra de cinco dias, há uma deposição normal de citoqueratina, como uma fina malha distribuída por todo órgão. Em contraste, no tecido tímico adulto-idoso, da amostra de timo de 57 anos, foi observada uma deposição irregular da proteína, com algumas áreas livres de citoqueratina (4.2A e B). Quando foi analisada a deposição de citoqueratina em timo de 78 anos, não foi possível observar marcação para citoqueratina (Figura 4.2C).



**Figura 4.1: Aspectos morfológicos de amostras de timo humano em diferentes idades.**

As fotomicrografias mostram cortes parafinados de amostras de timo humano, corados com hematoxilina-eosina, provenientes dos doadores de cinco dias (A), 14 anos (B) e 75 anos (C), respectivamente. c=região cortical; m=região medular; a=tecido adiposo; seta=trabécula de tecido conjuntivo. Aumento da objetiva: 4x.



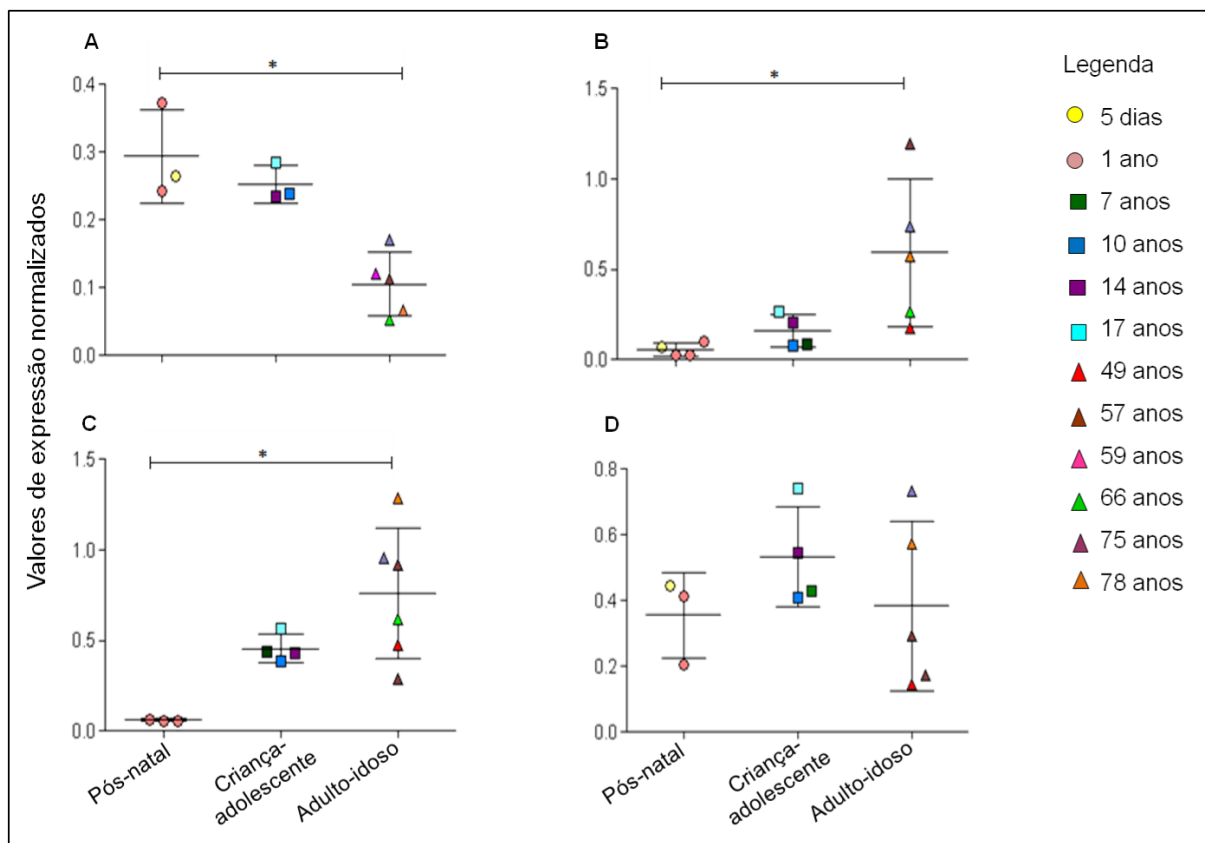
**Figura 4.2: Deposição de citoqueratina total em amostras de timo humano em diferentes idades.**

As fotomicrografias mostram a deposição de citoqueratina em amostras de timo através de imunofluorescência. Cortes congelados de timo, proveniente de doadores de idade de cinco dias (A), 57 anos (B) e 78 anos (C), foram hidratados, bloqueados e incubados com anticorpos específicos para citoqueratina total (verde) para posterior visualização em microscópio de fluorescência. Inseto: DAPI. Aumento da objetiva: 20x. Barra: 100 µm (A, B); 50 µm (C).

#### 4.2 Expressão de *FOXN1*, *DLL1*, *DLL4* e *WNT-4* em amostras de timo humano

Para análise da expressão gênica, amostras de RNA provenientes de timo de diferentes idades foram utilizadas para síntese de cDNA e posterior amplificação com iniciadores específicos através de PCR em tempo real. Foi verificada uma menor expressão do gene *FOXN1* no grupo adulto-idoso em comparação com os grupos pós-natal ( $p=0,018$ ) (Figura 4.3A). Por outro lado, foi observada uma maior

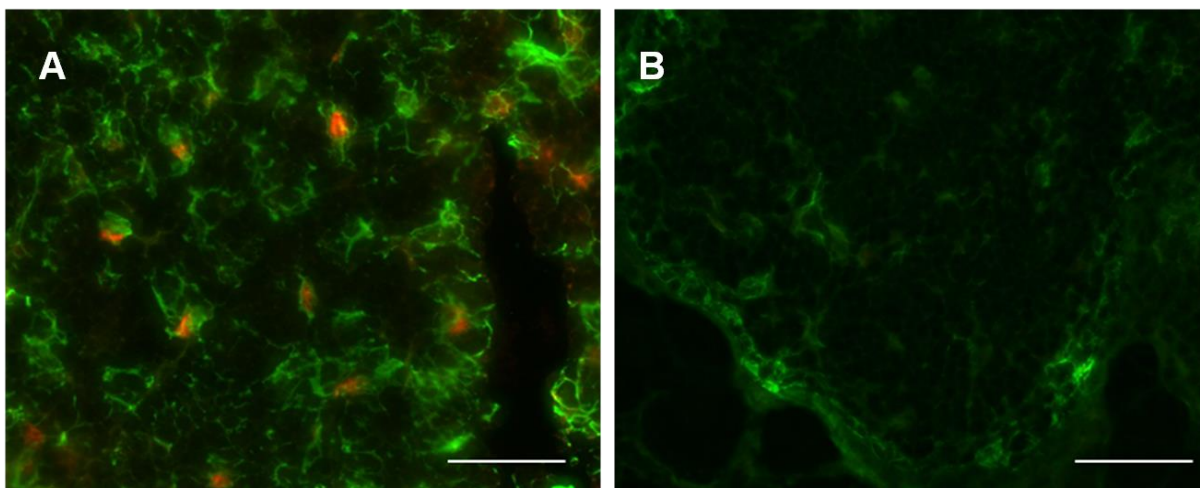
expressão dos genes *DLL1* e *DLL4* em amostras do grupo adulto-idoso em comparação com amostras do grupo pós-natal ( $p=0,014$  e  $0,021$ , respectivamente) (Figura 4.3B e D). Enquanto que não foi observada diferença na expressão do gene *WNT-4* entre os grupos estudados (Figura 4.3C).



**Figura 4.3: Expressão dos genes *FOXN1*, *DLL1*, *DLL4* e *WNT-4* em amostras de timo humano através de PCR quantitativo em tempo real.** Nos gráficos estão representados a média  $\pm$  erro-padrão dos valores de expressão normalizados dos genes *FOXN1* (A), *DLL1* (B), *WNT-4* (C) e *DLL4* (D). Os valores de expressão normalizados foram obtidos como descrito no item 3.7 do capítulo Material e métodos. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Dunn. (\*)  $p < 0,05$ . Legenda: círculos amarelos= 5 dias de idade; círculos rosas-claro= 1 ano de idade; quadrados verdes-escuro= 7 anos de idade; quadrados azuis= 10 anos de idade; quadrados roxos= 14 anos de idade; quadrados azuis-turquesa=17 anos de idade; triângulos vermelhos= 49 anos; triângulos marrons= 57 anos; triângulos rosas= 59 anos; triângulos lilás= 75 anos; triângulos laranjas= 78 anos.

### 4.3 Expressão proteica de FOXN1 em amostras de timo humano

Uma vez que foi observada uma menor expressão do gene *FOXN1* em amostra de timo do grupo adulto-idoso, despertou-se o interesse de avaliar a expressão de FOXN1, ao nível protéico, no tecido tímico das amostras em estudo. Para isso, cortes congelados de timo das amostras de cinco dias e de 57 anos foram submetidas à imunofluorescência para avaliar a marcação intranuclear do fator de transcrição FOXN1. Essas amostras foram escolhidas como representantes dos grupos pós-natal e adulto-idoso pois esses dois grupos apresentaram expressão diferencial de *FOXN1* durante os ensaios de PCRq. Particularmente, a amostra de 57 anos foi escolhida por ainda apresentar áreas de TEC positivas para citoqueratina (Figura 4.2B). Foi possível observar a marcação nuclear característica para FOXN1 em cortes de timo das amostras de cinco dias, contudo não foi observada expressão de FOXN1 nas amostras de 57 anos, corroborando com os resultados de observados nos ensaios de expressão gênica (Figura 4.4A e B).

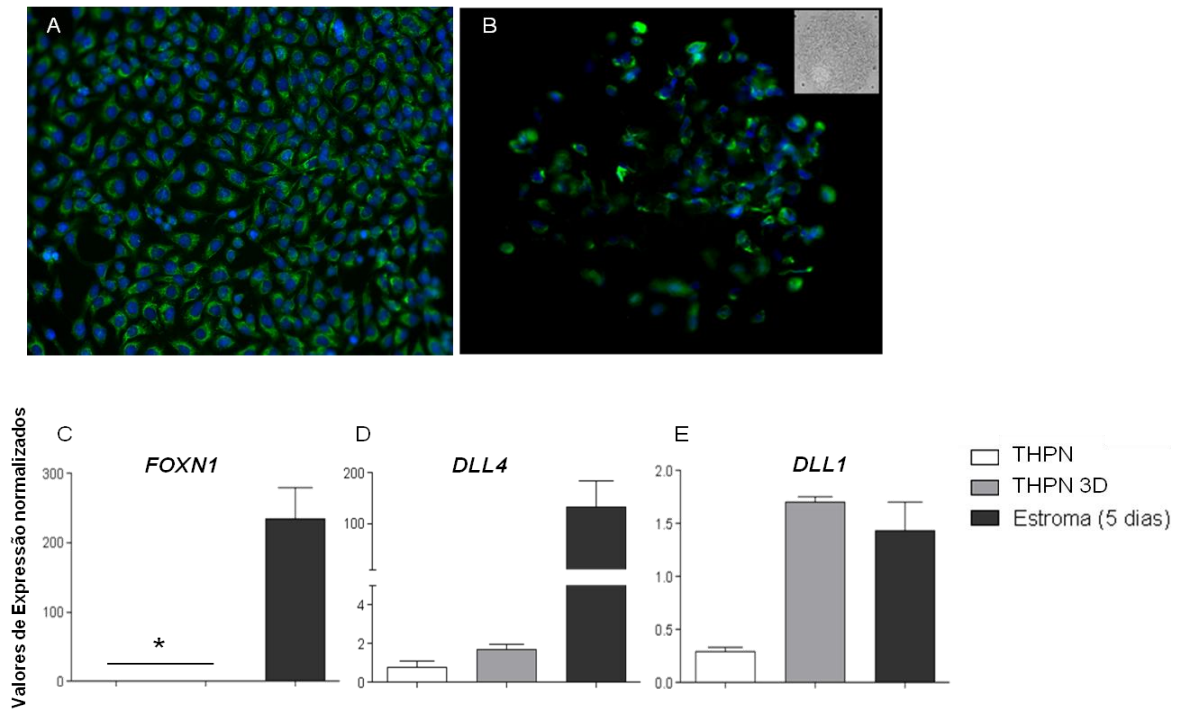


**Figura 4.4: Expressão proteica de FOXN1 em amostras de timo humano.** As fotomicrografias mostram a marcação intranuclear do fator de transcrição em amostras de timo provenientes de doadores de cinco dias (A) e 57 anos (B) por imunofluorescência. Cortes congelados de timo das amostras foram hidratados, bloqueados, incubados com anticorpos específicos para citoqueratina total (verde) e para FOXN1 (vermelho) para posterior visualização em microscópio de fluorescência. Fotomicrografia representativa de dois experimentos. Aumento da objetiva: 40x. Barra: 20  $\mu$ m.

### 4.4 Expressão gênica de *FOXN1*, *DLL1* e *DLL4* em células da linhagem de TEC humana

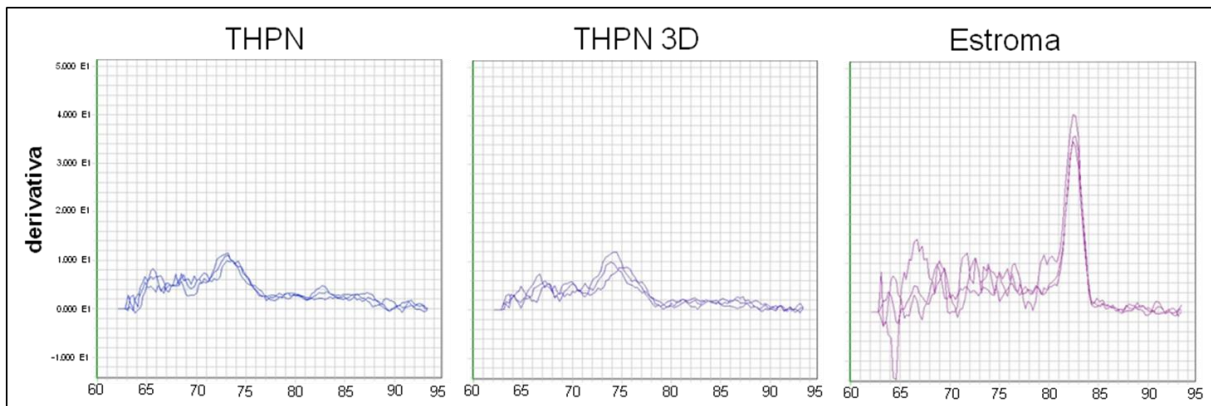
Com o intuito de entender as alterações observadas nas amostras de timo no presente estudo, foi realizada análise da expressão dos genes *FOXN1*, *DLL1* e *DLL4* em amostras da linhagem celular THPN, que representa uma fonte homogênea de TEC. Para isso, amostras de RNA de TEC cultivadas em monocamadas e em sistemas de cultivo tridimensional (3D) foram utilizadas como molde para síntese de cDNA, o qual foi usado para reações de PCRq (Figura 4.5 A). Foi observado que as células cultivadas em monocamadas expressam os genes *DLL1* e *DLL4*, e que o cultivo em 3D por 4 dias foi capaz de aumentar a expressão de ambos os genes (Figura 4.5 D e E). De maneira oposta, a expressão do gene *FOXN1* não foi verificada nas amostras derivadas de ambos os sistemas de cultivo (Figura 4.5 C).

A ausência de expressão de *FOXN1* nos cultivos de THPN pode ser confirmada pela análise da curva de dissociação do produto amplificado durante o ensaio de PCRq. Como pode-se observar na figura 4.6, as amostras de THPN possuem curvas de dissociação inespecíficas, com ausência de um único pico, em temperaturas menores que as observadas na amostra controle positivo de estroma tímico humano. Nesta amostra foi verificado a presença de um pico uniforme na temperatura aproximada de 82,5°C, gerado pela dissociação do produto de amplificação. Para descartar a possível interferência da quantidade de cDNA utilizada nos ensaios de PCRq, foram realizados ensaios com 5 pontos de diluição (1 a 1:16), utilizando cDNA proveniente de amostras de THPN cultivadas em monocamadas e amostra positiva de estroma tímico. Foi possível verificar, na curva de dissociação demonstrada na figura 4.7, que não houve amplificação específica do produto em amostras de THPN quando comparamos com a amplificação do produto das amostras positivas de timo.

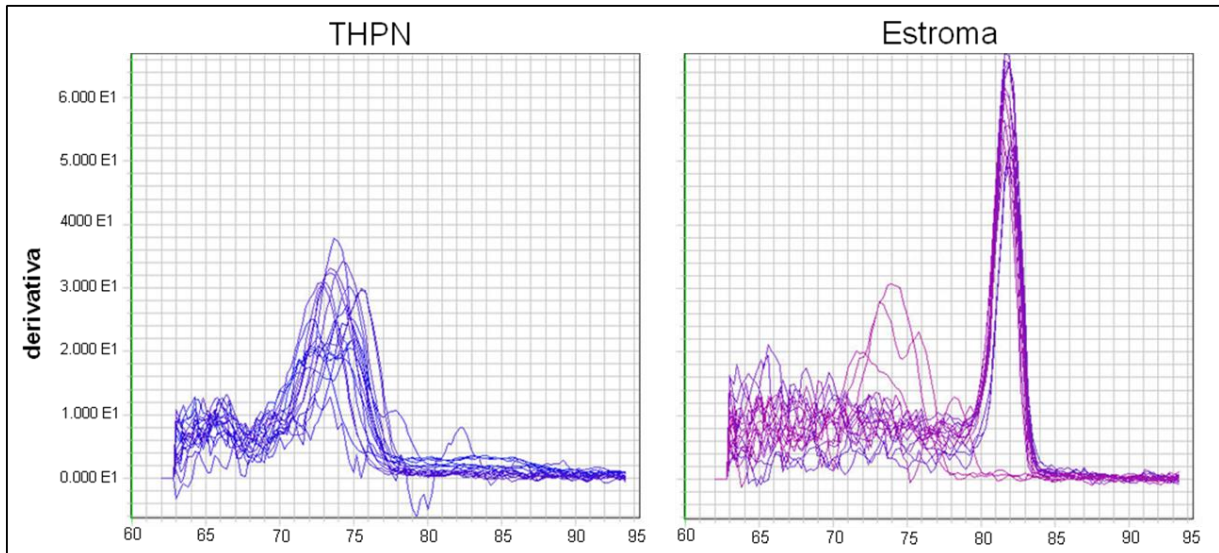


**Figura 4.5: Expressão de *FOXN1*, *DLL1* e *DLL4* em TEC cultivadas em monocamadas convencionais (2D) e em sistema de cultivo 3D.** Deposição de citoqueratina (verde) em células da linhagem THPN cultivadas por 4 dias em monocamadas (A) ou em microcarreadores macroporosos (B) através de imunofluorescência. Inseto em B= microcarreador em campo claro; Azul=DAPI. Aumento da objetiva: 10x. Culturas de células THPN em monocamadas ou em arcabouços 3D foram utilizadas para avaliação da expressão dos genes *FOXN1* (C), *DLL4* (D) e *DLL1* (E) por PCR quantitativo em tempo real. Amostras de estroma de timo proveniente de doador de 5 dias foi utilizado com controle positivo. (\*)=não-detectado. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro-padrão dos valores de expressão normalizados de um experimento em triplicata.





**Figura 4.6: Curva de dissociação do produto de amplificação do gene *FOXN1* em células epiteliais tímicas e amostra de estroma tímico humano.** Culturas de células THPN em monocamadas (THPN) ou em arcabouços 3D (THPN 3D) foram utilizadas para avaliação da expressão dos gene *FOXN1* por PCR quantitativo em tempo real. Amostras de estroma de timo proveniente de doador de 5 dias (Estroma) foi utilizado com controle positivo. Após amplificação, a curva de dissociação do produto foi gerada para cada amostra através do programa de computador *Sequence Detector System 2.2*.



**Figura 4.7: Curva de dissociação do produto de amplificação do gene *FOXN1* em células epiteliais tímicas e em amostra de estroma tímico humano.** Amostras de cDNA de células da linhagem THPN (THPN) e de estroma tímico (Estroma) diluídas em 5 pontos de 1 a 1:16 foram utilizadas para avaliação da expressão de *FOXN1* por PCR quantitativo em tempo real. Após amplificação, a curva de dissociação do produto foi gerada para cada um dos pontos de diluição, de cada amostra, através do programa de computador *Sequence*

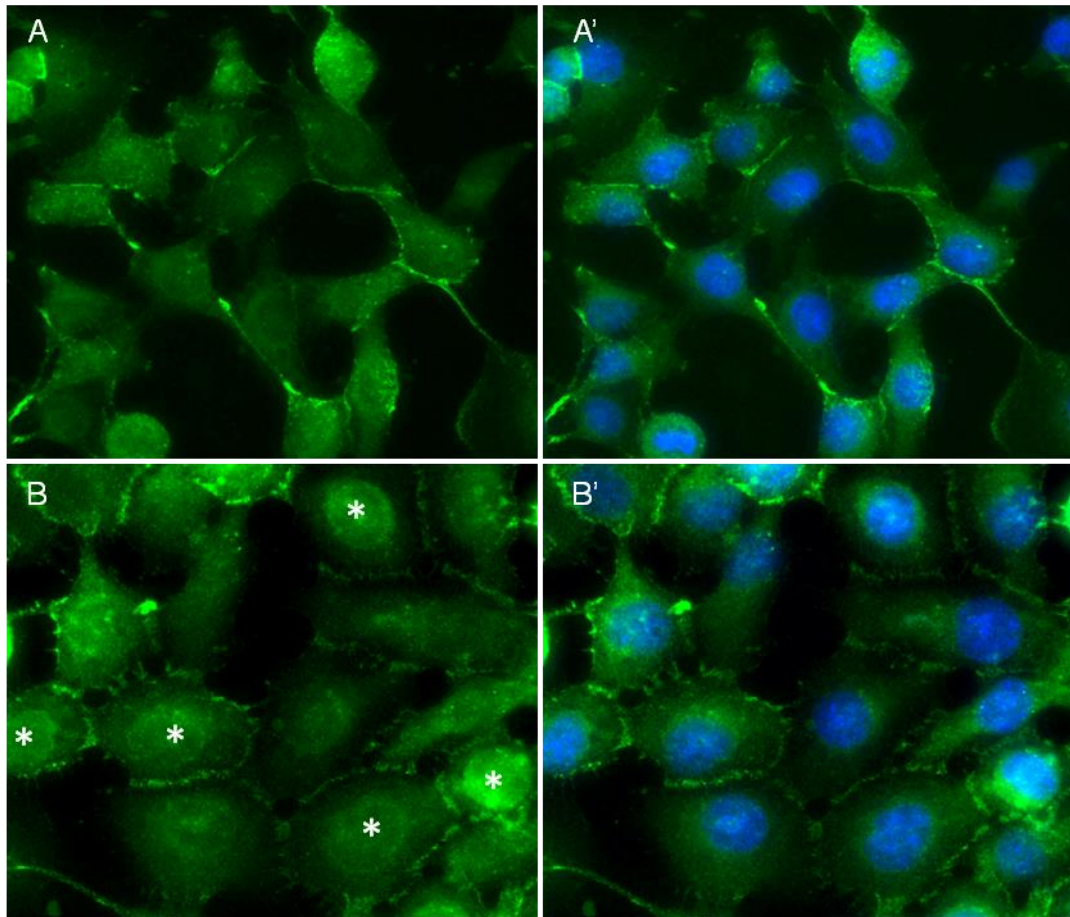
*Detector System 2.2.* As figuras representam as curvas de dissociação de dois experimentos independentes.

#### **4.5 Indução da via de sinalização de WNT em linhagem de TEC humana**

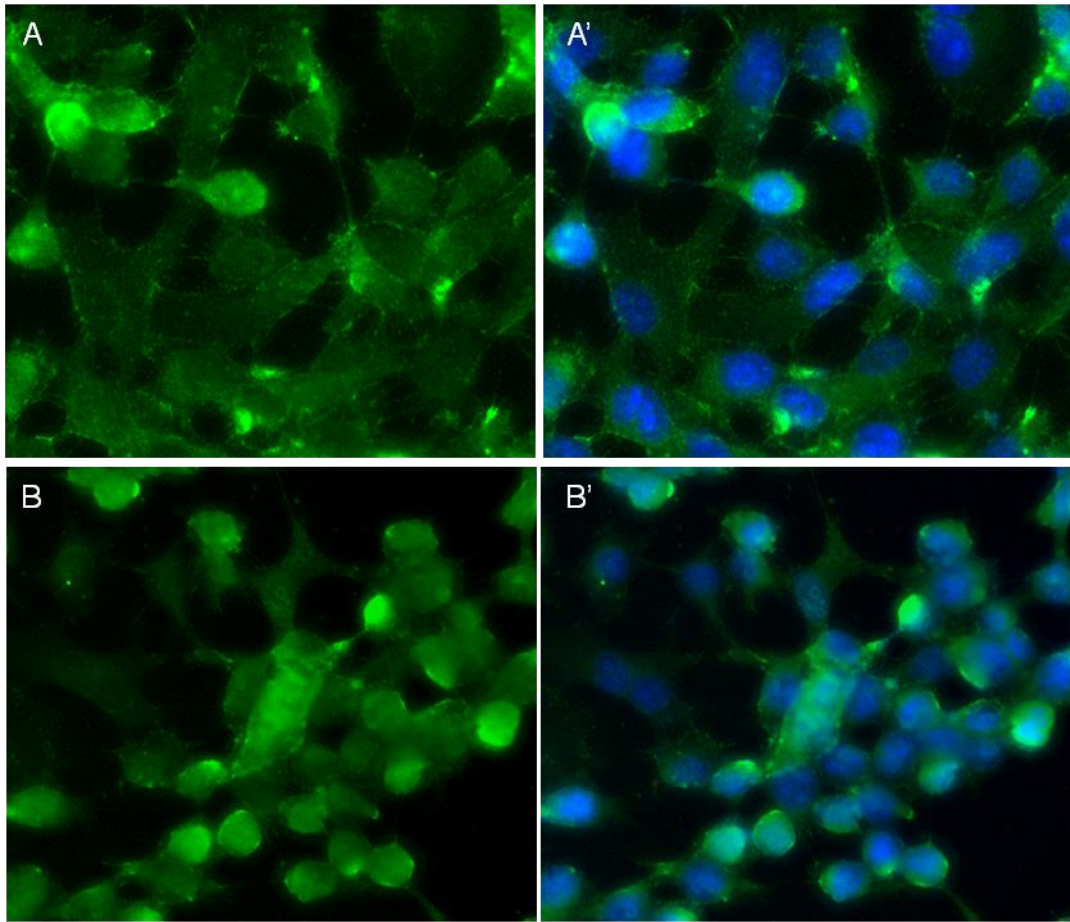
Sabendo que a expressão de FOXN1 pode ser estimulada por glicoproteínas WNT, foi realizada a indução da via de sinalização dessas proteínas através do tratamento com LiCl, um conhecido indutor da via clássica de WNT, na tentativa de estimular a expressão de FOXN1 nas células THPN. O tratamento foi conduzido em culturas convencionais, na concentração de 20 mM, pelos períodos de 6 e 18 horas. Posteriormente, as células tratadas ou não com LiCl foram fixadas em metanol ou coletadas em Trizol, para realização de ensaios de imunofluorescência e de RT-PCR, respectivamente.

Como pode-se observar na figura 4.8, o tratamento com LiCl por 6 horas induziu acúmulo da proteína  $\beta$ -catenina no núcleo celular, mostrando que, neste regime de tratamento, a via de sinalização foi induzida com sucesso. Além disso, as células tratadas com LiCl por 6 horas apresentaram alterações morfológicas como maior espalhamento e aumento de adesões célula-célula (Figura 4.8 A, A' e B, B'). Enquanto que no tratamento por 18 horas foi observada presença de células menores, formando aglomerados celulares, em que não é possível distinguir a translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo celular (Figura 4.9 A, A' e B, B'). Através de RT-PCR, foi possível verificar que nenhum dos tratamentos foi capaz de induzir a expressão do gene *FOXN1* (Figura 4.10). Também não foi detectada expressão protéica de FOXN1 em nenhum dos tratamentos estudados (Figura 4.11 A, A' e B, B').

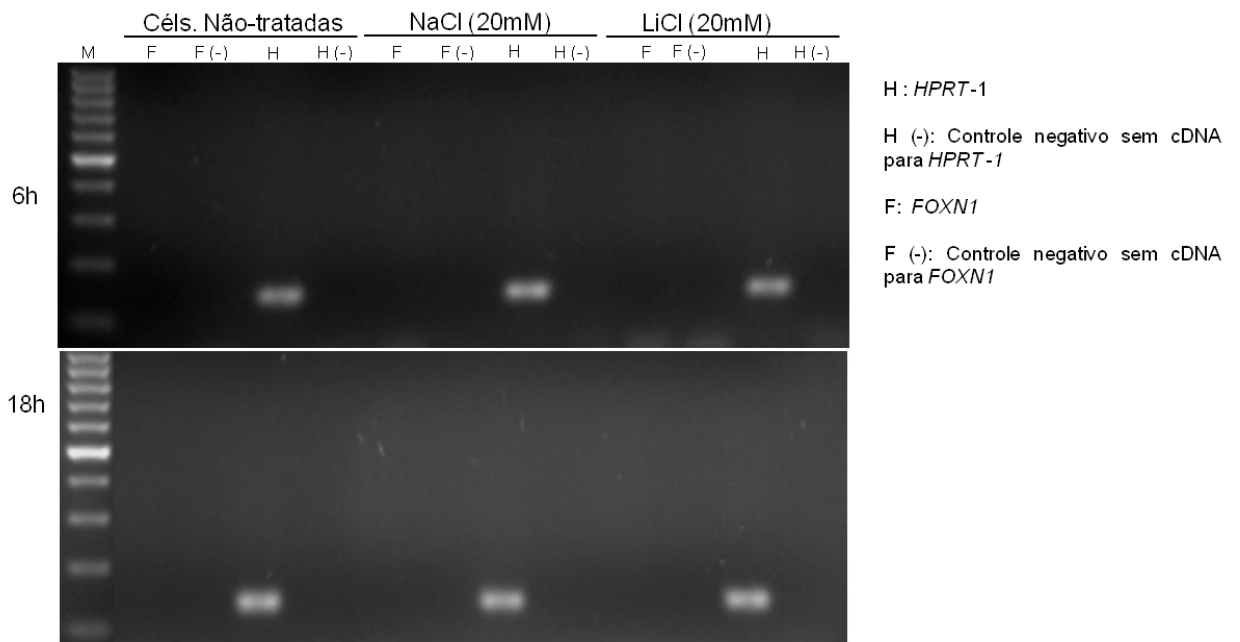




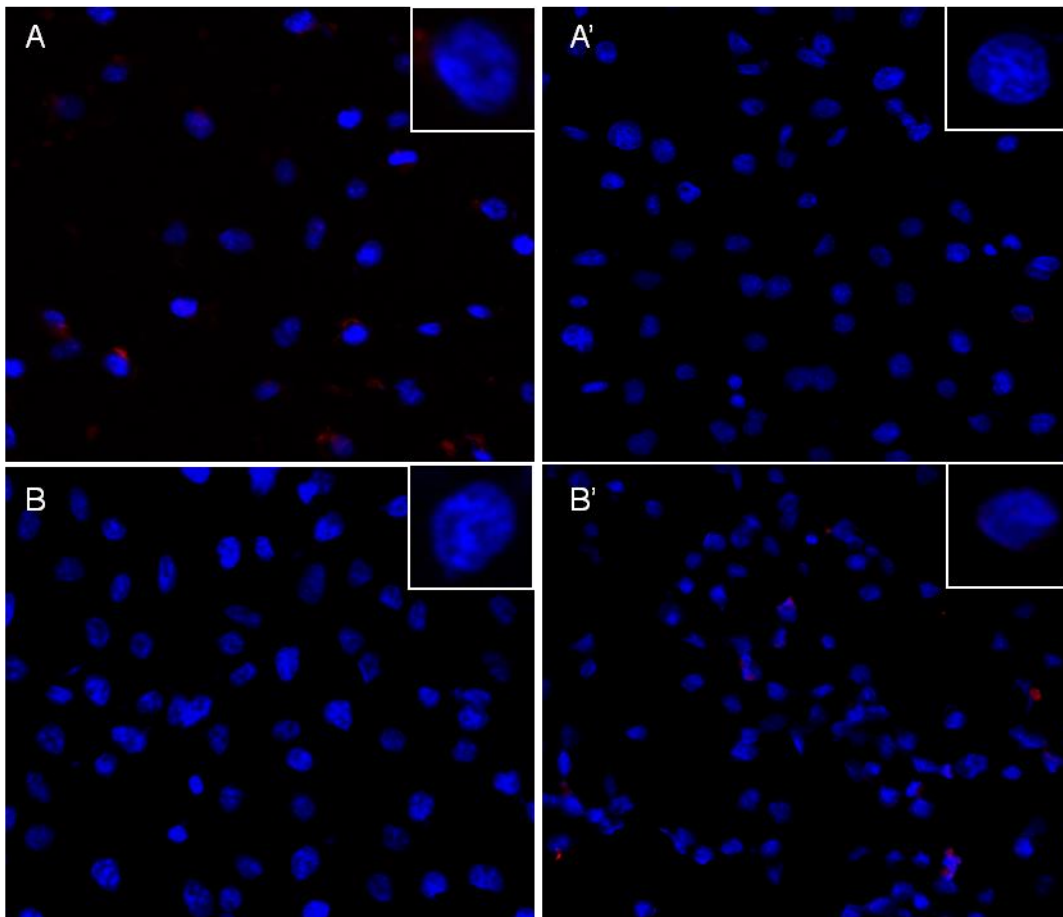
**Figura 4.8: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão de  $\beta$ -catenina em linhagem de TEC humana.** Células da linhagem THPN cultivadas em monocamadas foram tratadas com LiCl pelo período de 6 horas para posterior análise da expressão de  $\beta$ -catenina (verde) através de imunofluorescência. Células não-tratadas (A e A') e células tratadas com LiCl por 6 horas (B e B') Aumento da objetiva: 40x. Azul: DAPI.



**4.9: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão de  $\beta$ -catenina em linhagem de TEC humana.** Células da linhagem THPN cultivadas em monocamadas foram tratadas com LiCl pelo período de 18 horas para posterior análise da expressão de  $\beta$ -catenina (verde) através de imunofluorescência. Células não-tratadas (A e A') e células tratadas com LiCl por 18 horas (B e B') Aumento da objetiva: 40x. Azul: DAPI.



**Figura 4.10: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão gênica de *FOXN1* em linhagem de TEC humana.** Células da linhagem THPN cultivadas em monocamadas foram tratadas com LiCl pelos períodos de 6 e 18 horas para posterior análise da expressão de *FOXN1* através de RT-PCR. Células não-tratadas e tratadas com cloreto de sódio (NaCl; 20mM) foram utilizadas como controle. Legenda – F: *FOXN1*; F (-): Controle negativo sem enzima RT para *FOXN1*; H: *HPRT-1*; H (-): Controle negativo sem enzima RT para *HPRT-1*.



**4.11: Efeitos do tratamento com LiCl na expressão protéica de FOXN1 em linhagem de TEC humana.** Células da linhagem THPN cultivadas em monocamadas foram tratadas com LiCl pelos períodos de 6 e 18 horas para posterior análise da expressão de FOXN1 (vermelho) através de imunofluorescência. Células não-tratadas (A e B), células tratadas com LiCl por 6 horas (A') e células tratadas com LiCl por 18 horas (B'). Aumento da objetiva: 20x. Azul: DAPI.

#### 4.6 Análise de metilação de DNA no gene *FOXN1*

No intuito de entender, a nível molecular, a diminuição na expressão gênica e protéica de FOXN1 com a idade, foi proposto avaliar a metilação de DNA em regiões distintas da sequência gênica de *FOXN1* através de sequenciamento de DNA convertido com bissulfite de sódio. Para tal análise, primeiramente foi realizado o levantamento dos resíduos de CpG, possivelmente metilados, presentes na sequência do gene a partir dos dados experimentais depositados pelo Consórcio ENCODE obtidos através de análise global de metilação de DNA por RRBS (abreviatura do Inglês *reduced representation bisulfite sequencing*) em amostras de leucócitos e de tecido de pele humanos. Foi possível catalogar 139 resíduos de CpG

que apresentaram metilação na sequência gênica de *FOXN1*, distribuídos na região promotora, nos éxons 1, 2, 3, 7, 8, 9 e nos íntrons 1, 2, 3, 6, 7 e 8 de acordo com o banco de dados (Tabela 4.1). Dos 139 resíduos encontrados, 92 apresentaram mais que 10 leituras de sequência (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** Quantificação de resíduos CpG na sequência do gene *FOXN1*.

<b>Região do gene</b>	<b>Nº de CpG</b>	<b>CpG com score &gt;10</b>
Promotor	8	1
1º Éxon	10	10
1º Intron	62	31
2º Éxon	13	7
2º Intron	4	1
3º Éxon	7	5
3º Intron	5	3
4º Éxon	-	-
4º Intron	-	-
5º Éxon	-	-
5º Intron	-	-
6º Éxon	-	-
6º Intron	5	-
7º Éxon	10	7
7º Intron	3	-
8º Éxon	5	-
8º Intron	3	-
9º Éxon	4	-

Após verificação dos possíveis resíduos de CpG metilados no banco de dados do ENCODE, quatro regiões distintas foram selecionadas para quantificação dos resíduos CpG através de sequenciamento de DNA como demonstrado na figura 3.1 do capítulo de Material e métodos. Das sequências escolhidas, somente duas foram consideradas para o sequenciamento, pois tiveram seus produtos amplificados de maneira eficiente pelos seus respectivos iniciadores. A primeira região denominada de C20 compreende uma sequência de 259 pb localizada no primeiro íntron do gene *FOXN1* (Figura 4.12 A e B). Essa região possui uma região repetitiva simples (CCCG)<sub>n</sub> de 27 pb contida em uma CGI predita de 100 pb (Figura 4.12 B). Dados experimentais do ENCODE, depositados na base de dados da UCSC, mostram que a região C20 se localiza próxima a regiões regulatórias do genoma caracterizadas pela presença de modificações pós-traducionais de histonas e está contida no sítio de ligação ao DNA da enzima RNA polimerase II e da proteína ligante de DNA "dedo de zinco" CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Figura 4.12 A).

A segunda região nomeada de DB2 está localizada no segundo éxon do gene *FOXN1*, compreendendo uma sequência de 273 pb (Figura 4.13 A e B). Ela contém a sequência sinal para o início da transcrição e tradução, e possui sequências conservadas dos sítios de ligação para fatores de transcrição PAX5 (abreviatura do Inglês *paired box gene 5*), PAX3, ATF1 (abreviatura do Inglês *activating transcription factor 1*), CREB1 (abreviatura do Inglês *cAMP response element-binding protein 1*), ATF2, (antigo CREBP1; abreviatura do Inglês *cAMP responsive element binding protein 2*), c-jun (Figura 4.13 A e B).

Dados experimentais do ENCODE mostram que, em amostras de pele humana, a região C20 apresenta uma hipometilação em 12 dos seus 13 resíduos CpG, enquanto que amostras de leucócitos humanos apresentam uma hipermetilação nos CpG mencionados (Figura 4.14 A e B). Já na região DB2, dados experimentais do ENCODE mostram uma leve hipometilação em um dos resíduos CpG da região DB2 em amostras de pele humana quando comparado com percentual de metilação observado nos resíduos de amostras de leucócitos humanos (Figura 4.14 C e D).

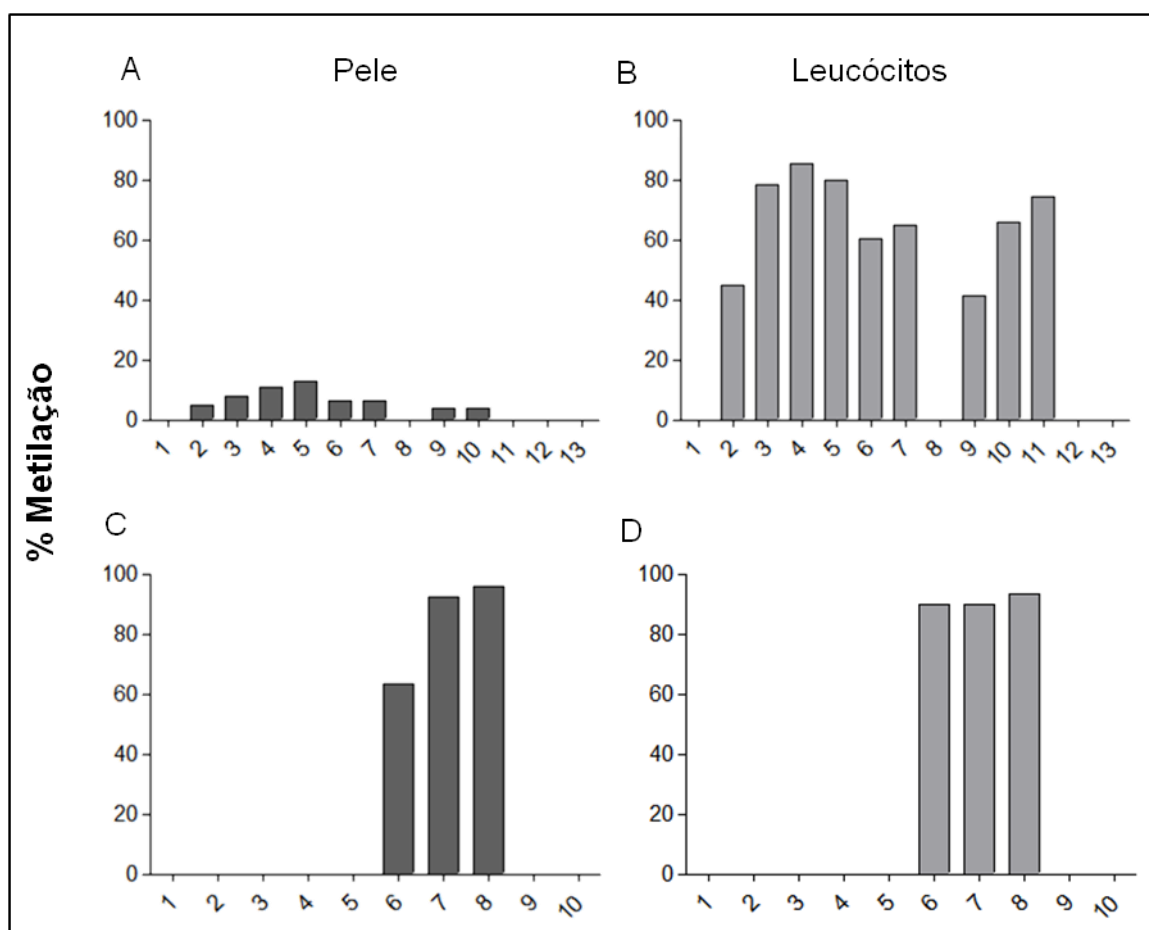


e pós-conversão com bissulfito de sódio (linha de baixo), da região C20. Em vermelho estão mostrados os resíduos CpG a serem investigados através do sequenciamento. As setas (> e <) indicam a região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento enquanto que a região sublinhada corresponde a CGI. Em amarelo está destacado a região repetitiva simples. A região de CGI foi obtida no programa *MethPrimer* no momento do desenho dos primers como descrito no capítulo de Material e métodos. A região repetitiva simples foi obtida da base de dados *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org/>). A representação gráfica e da sequência do gene *FOXN1* foram adaptadas do banco de dados de genoma humano (hg19) da UCSC (UCSC Genome Browser), utilizando a seção de regulação gênica do ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/>).





<) indicam a região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento. Em azul está destacada a sequência conservada do sítio de ligação ao DNA dos fatores de transcrição PAX3, CREB1, C-jun, CREBP1 e ATF1 e em verde está mostrado do sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição PAX5. Realçado em cinza está a sequência que codifica o códon de início da tradução. A representação gráfica e da sequência do gene *FOXN1* foram adaptadas do banco de dados de genoma humano (hg19) da UCSC (UCSC Genome Browser), utilizando a seção de regulação gênica do ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/>).



**Figura 4.14: Percentual de metilação em amostras de pele e leucócitos humanos.** Os gráficos representam o percentual de metilação em CpG nas regiões C20 (painel superior) e DB2 (painel inferior) em amostras de pele (A e C) e leucócitos humanos (B e D). Os valores percentuais foram obtidos de dados experimentais de metilação de DNA através de RRBS do consórcio ENCODE, depositados na base de dados da UCSC.

Para o sequenciamento de DNA, foram utilizadas amostras de DNA de timo do doador de cinco dias, 59 anos e amostras de DNA da linhagem THPN como

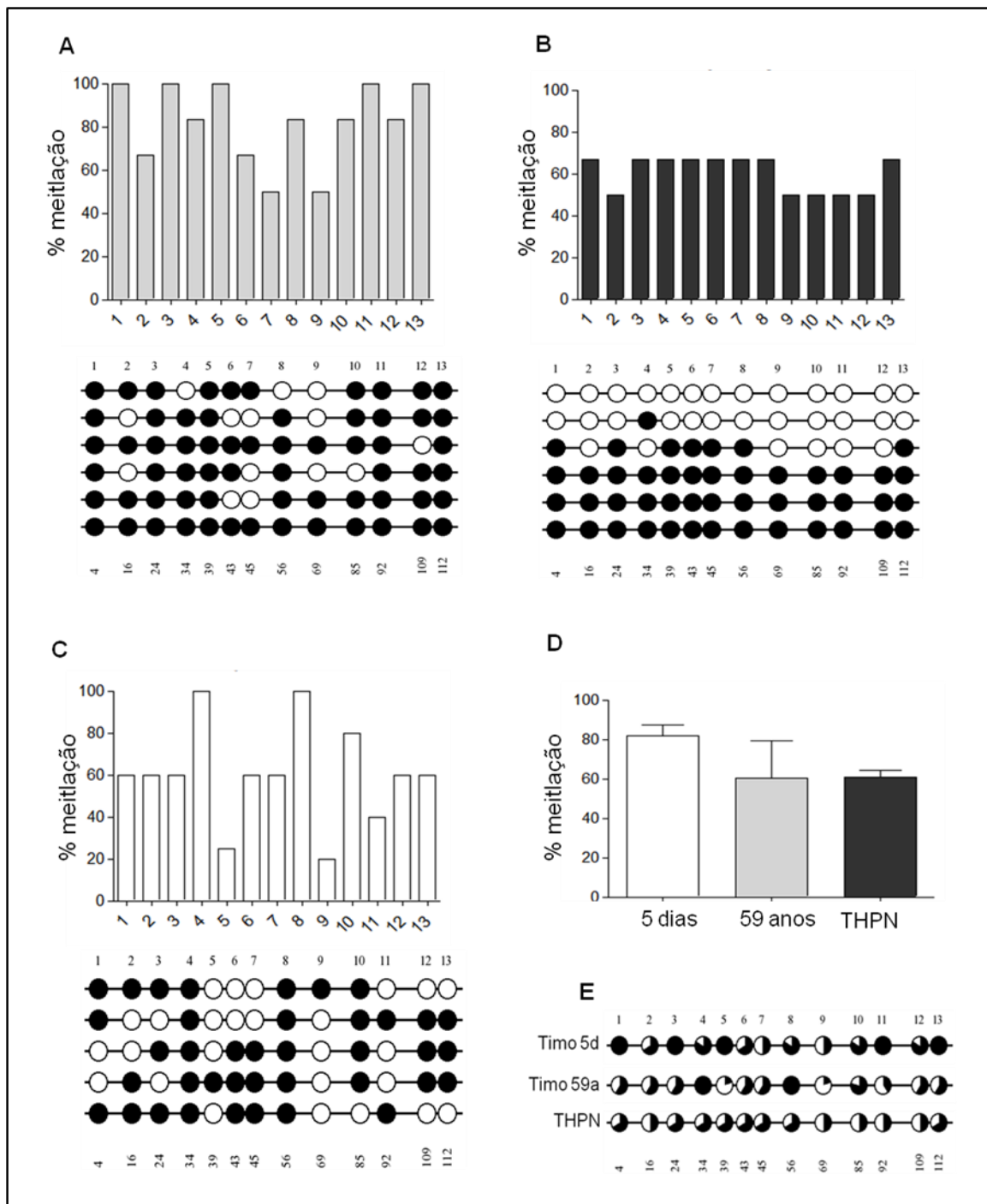
referência, uma vez que essas células não apresentaram expressão do gene *FOXN1* (Figura 4.5). Amostras de DNA convertido com bissulfito foram amplificadas e seus produtos foram clonados para posterior análise como descrito anteriormente em Material e métodos. Para cada região foram selecionados até 10 clones, de cada amostra, que foram utilizados para reações de sequenciamento. As sequências obtidas de cada clone foram analisadas quanto à presença de sequências não desejadas e selecionadas quanto à eficiência do sequenciamento de acordo com os picos presentes nos cromatogramas através do programa de computador *BioEdit*. As sequências selecionadas foram alinhadas com a sequência genômica de referência utilizando o algoritmo ClustalW 1.8 conforme mostrado na figura 4.15, e posteriormente quantificados com programa de computador *BiQ analyzer*, como descrito anteriormente. Sequências com percentual de conversão menor que 90%, percentual de identidade de sequência menor que 80% e sequências de clones idênticas foram excluídas das análises posteriores.



**Figura 4.15: Alinhamento das sequências obtidas após sequenciamento de regiões do gene *FOXN1*.** Na figura está mostrado um múltiplo alinhamento representativo das sequências dos clones obtidos de amostras de DNA convertido com bissulfito de sódio

através do algoritmo ClustalW 1.83. Em laranja estão representados os resíduos CpG metilados, em lilás estão mostrados os resíduos CpG não metilados, caracterizados pela conversão das citosinas em timinas, e em verde claro estão as citosinas não convertidas.

Para região C20, foram analisados cinco clones da amostra THPN e seis clones das amostras de timo de cinco dias e 59 anos. Quanto a média percentual de metilação em cada uma das posições de CpG, foi observado que clones provenientes de amostras de THPN apresentaram 100% de metilação nas posições 4 e 8, enquanto que os clones das amostras de timo de cinco dias apresentaram o mesmo percentual em cinco posições CpG: 1, 3, 5, 11 e 13 (Figuras 4.16 A, C e E). Já os CpG estudados nas sequências da amostra de timo de 59 anos apresentaram percentual de metilação entre 50% e 60% (Figura 4.16 B e E). Quando foi analisado o percentual total de metilação presente em cada clone, foi possível observar uma média percentual de metilação de 82% na amostra de timo de cinco dias, 60% na amostra 59 anos e 61% na amostra THPN, indicando uma possível hipometilação na região estudada para as amostras de timo de 59 anos e na amostra THPN, contudo essa diferença não foi significativa (Figura 4.16 D). De modo interessante, dois tipos de clones com padrões de metilação distintos são encontrados na amostra de timo de 59 anos, um apresenta-se completamente desmetilado, enquanto que o outro possui todos os seus CpG com metilação completa (Figura 4.16 B).

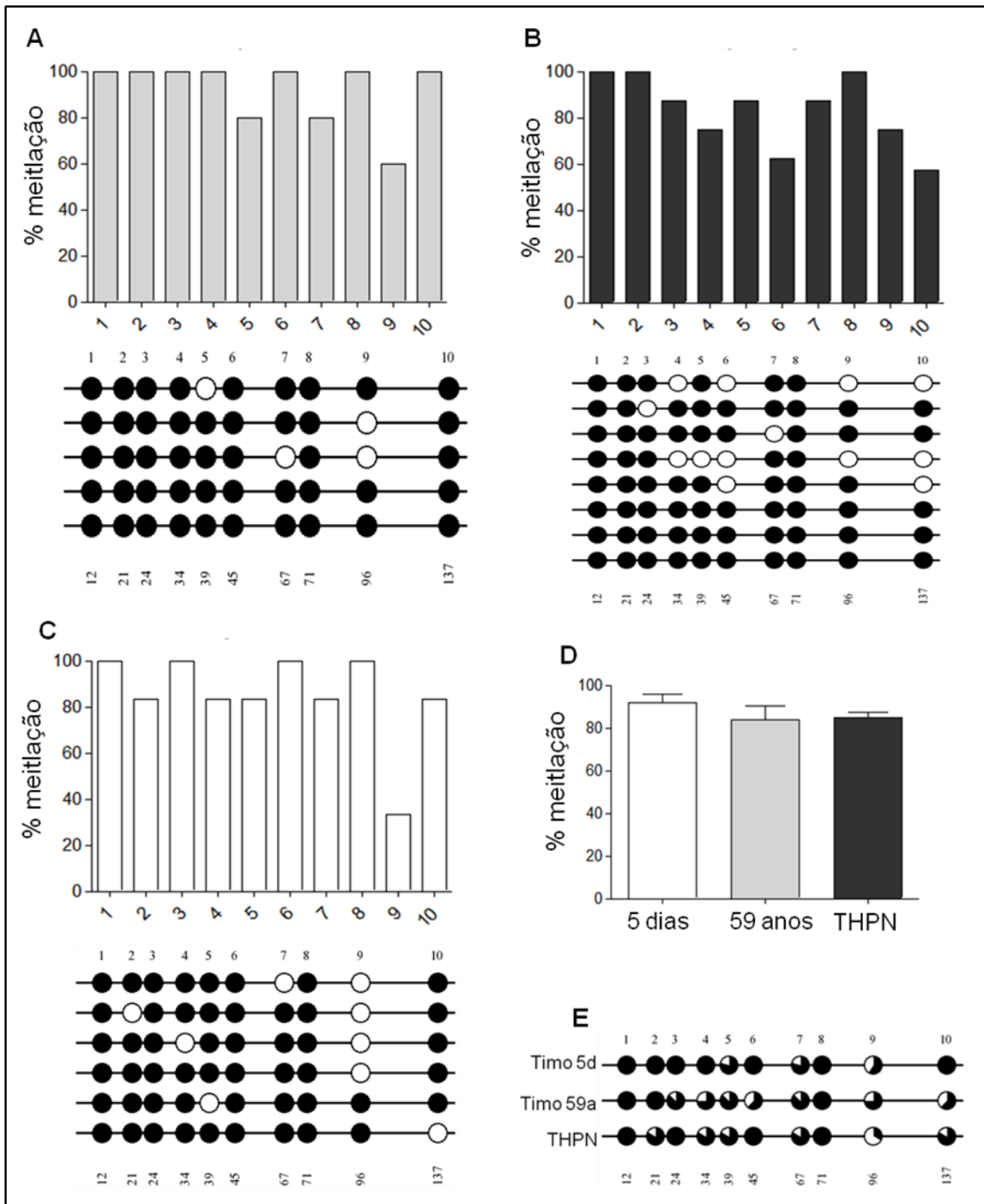


**Figura 4.16: Quantificação dos resíduos de CpG metilados na região C20 do gene *FOXN1*.** Os gráficos representam o percentual de metilação observado para cada resíduo CpG, nos clones derivados de amostras de DNA convertido com bissulfito, de timo doador de cinco dias (A), de 59 anos (B) e da linhagem celular THPN (C). Em D, os gráficos representam a média  $\pm$  erro-padrão do percentual de metilação, por sequência, de cada um dos clones das amostras de DNA convertido com bissulfito de sódio. Os valores percentuais foram obtidos após múltiplo alinhamento de sequência utilizando o algoritmo ClustalW seguido da quantificação de citosinas convertidas ou não em timinas através do programa de computador *BiQ analyzer*. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste estatístico

não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Dunn ( $p= 0,1816$ ). Os diagramas apresentados nos painéis inferiores das figuras A, B, C e na figura E foram confeccionados utilizando o programa da internet QUMA e representam os resíduos CpG metilados (círculos pretos) e não-metilados (círculos brancos) ao longo da sequência estudada.

A metilação na região DB2 foi avaliada em cinco clones de amostras de DNA convertido provenientes de timo de cinco dias, oito clones da amostra de timo de 59 anos e seis clones da amostra THPN. Na figura 4.17 podemos observar que, de forma geral, a média percentual de metilação nas posições de CpG em todas as amostras foram semelhantes, com exceção dos CpG nas posições 6, 9 e 10. No CpG 6 a média percentual de metilação foi de 63% nos clones da amostra 59 anos enquanto que a mesma posição nas amostras de timo de cinco dias e em THPN o percentual foi de 100% (Figuras 4.17 A-E). Já o CpG 9 apresentou percentuais mais divergentes, em que os clones das amostras de cinco dias, 59 anos e em THPN tiveram 60%, 75% e 33% de metilação, respectivamente. De modo semelhante, o CpG 10 apresentou percentuais de metilação diferentes em cada uma das amostras, sendo de 100% na amostra de cinco dias, 57% na amostra 59 anos e 83% nas sequências dos clones da amostra THPN (Figuras 4.17 A-E). Quando foi analisado o percentual total de metilação presente em cada clone, por amostra, foi possível observar uma média percentual de metilação de 92% na amostra de timo de cinco dias e 85% nas amostras 59 anos e THPN, mostrando uma leve diminuição na metilação nessas duas últimas amostras, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 4.17 D).





**Figura 4.17: Quantificação dos resíduos de CpG metilados na região DB2 do gene *FOXN1*.** Os gráficos representam o percentual de metilação observado para cada resíduo CpG, nos clones derivados de amostras de DNA convertido com bissulfato de sódio, de timo doador de cinco dias (A), de timo de 59 anos (B) e da linhagem celular THPN (C). Em D, os gráficos representam a média  $\pm$  erro-padrão do percentual de metilação, por sequência, de cada um dos clones das amostras de DNA convertido com bissulfato de sódio. Os valores percentuais foram obtidos após múltiplo alinhamento de sequência utilizando o algoritmo ClustalW seguido da quantificação de citosinas convertidas ou não em timinas através do programa de computador *BiQ analyzer*. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste

estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Dunn ( $p= 0,3531$ ). Os diagramas apresentados nos painéis inferiores das figuras A, B, C e na figura E foram confeccionados utilizando o programa da internet QUMA e representam os resíduos CpG metilados (círculos pretos) e não-metilados (círculos brancos) ao longo da sequência estudada.



## 5 DISCUSSÃO

A imunosenescência é um processo fisiológico caracterizado pelo declínio da função imunológica ao longo dos anos do qual a involução tímica pode ter uma importante participação. A involução do timo se inicia ainda nos primeiros anos de vida em humanos, acompanhada pela perda de tecido linfóide, acúmulo de células adiposas e redução na emigração de linfócitos T virgens (Steinmann *et al.*, 1985; Douek *et al.*, 1998; Kilpatrick *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Den Braber *et al.*, 2012). Esse declínio na função tímica afeta especialmente a população de pacientes idosos, que são alvos frequentes de infecções hospitalares para os quais os tratamentos já não são efetivos, trazendo consequências médico-econômicas para os sistemas de saúde (OMS, 2014). Pouco se sabe sobre as causas da involução tímica, contudo uma vasta gama de estudos aponta que alterações na atividade e na função das células epiteliais tímicas podem estar envolvidas no processo (Gui *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012).

No intuito de entender os mecanismos envolvidos na involução do timo ao longo do envelhecimento, foi proposto, neste estudo, investigar a regulação de genes importantes para a função do timo durante a senescência. Para isso, foram utilizadas amostras de timo humano, de diferentes idades, provenientes de doadores distintos que submetidos à cirurgia cardíaca. Elas foram divididas em grupos, de acordo com a idade, em pós-natal, jovem-adulto e adulto-idoso. Nessas amostras, foi avaliada a expressão de genes importantes para o desenvolvimento e função linfopoiética do timo. Além disso, também utilizamos células da linhagem THPN, em que foram investigados mecanismos de indução da expressão gênica de *FOXP1*. Ao nível molecular, também foi estudado o mecanismo de regulação da expressão gênica de *FOXP1*, ao longo da idade, através de metilação de DNA.

A desorganização do microambiente do timo é uma das principais características da involução tímica. Neste trabalho, primeiramente, foram avaliados os aspectos morfológicos das amostras em estudo através de coloração histológica de rotina. Os timos do grupo pós-natal apresentaram uma arquitetura microscópica característica do órgão, ainda sem sinais de involução, ao contrário das amostras de timo do grupo jovem-adulto em que já foi possível observar presença de células adiposas, principalmente próxima às regiões das trabéculas de tecido conjuntivo. Nos timos do grupo adulto-idoso, observou-se a perda da arquitetura tímica, com

poucos aglomerados de TEC contendo linfócitos, e a presença de uma grande quantidade de tecido adiposo. Essas características estão de acordo com a literatura em que foi demonstrado, em humanos, diminuição no espaço epitelial, acompanhado pelo aumento do espaço perivascular e do tecido adiposo, em timos de indivíduos idosos (Steinmann *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 1999). Além disso, já foi demonstrado, em camundongos velhos, uma diminuição na expressão de marcadores de cTEC e mTEC, acompanhada do aparecimento de áreas livres de TEC e do aumento no número de fibroblastos (Aw *et al.*, 2008).

Além da morfologia, também foi avaliada a deposição de citoqueratina total nos tecidos tímicos dos diferentes grupos. A citoqueratina é um filamento intermediário componente do citoesqueleto que está presente no citoplasma celular e é utilizado como marcador de células epiteliais tímicas em abordagens experimentais e para diagnóstico (Laster *et al.*, 1986; Barak *et al.*, 2004). Foi observado, na amostra de timo pós-natal (cinco dias de idade), uma deposição normal de citoqueratina, distribuída pelo órgão como uma fina rede de filamentos intracelulares. Já no timo adulto-idoso (57 anos), foi observada uma distribuição irregular da deposição da proteína, com regiões semelhantes a áreas livres de TEC. Na amostra de timo de 78 anos não foi possível observar deposição para citoqueratina em nenhuma parte do órgão. Esse padrão de marcação pode ser resultante da substituição de TEC por células do tecido adiposo, células mesenquimais ou linfócitos T da periferia como descrito acima.

As TEC fornecem sinais celulares e moleculares que conduzem a diferenciação intratímica de linfócitos T. Um desses sinais é a interação entre ligantes e receptores da família NOTCH. Já foi demonstrado, em diferentes trabalhos, que os ligantes DLL1, DLL4, *Jagged-1* (JAG-1) e JAG-2 são expressos por TEC, e em menor quantidade por timócitos, além de seus respectivos receptores serem também expressos em timócitos (Felli *et al.*, 1999; Fiorini *et al.*, 2008; Van De Walle *et al.*, 2011). O DLL4 presente nas TEC está envolvido com comprometimento dos precursores hematopoiéticos para o desenvolvimento dos linfócitos T, além de ser importante para manutenção da arquitetura tridimensional do timo (Mohtashami e Zuniga-Pflucker, 2006; Hozumi *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2008). Apesar da gama de estudos sobre NOTCH e seus ligantes, pouco se sabe sobre sua participação na involução tímica ao longo do tempo. Foi verificada, neste estudo, a expressão gênica de *DLL1* e *DLL4* nas amostras de timo pós-natal, jovem-adulto e adulto idoso. Foi

possível observar que os genes *DLL1* e *DLL4* estão expressos no timo humano em diferentes idades, mas há aumento significativo na expressão de ambos os genes em amostras de timo adulto-idoso quando comparado às amostras de timo pós-natal. Esses dados corroboram com estudo constante na literatura que mostrou a expressão de *DLL1*, *DLL4*, *JAG-1* e *JAG-2* em TEC provenientes de amostras de timo humano (Van De Walle *et al.*, 2011). Por outro lado, diferente do resultado obtido para as amostras de timo humano, estudos em modelos experimentais de camundongos mostraram uma diminuição na expressão de *DLL4* em TEC cortical proveniente de timo de animais entre 12 e 24 meses de idade (Bredenkamp *et al.*, 2014b).

Diferentes técnicas para purificação de TEC são encontradas na literatura, algumas envolvem maceração do tecido para liberação dos timócitos, seguido de processos enzimáticos para separação de TEC da matriz extracelular do órgão, enquanto outras empregam técnicas de explante em que pequenos pedaços de tecido tímico são cultivados *in vitro* até a liberação das células (Fernández *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 2002; Seach *et al.*, 2012). Para a análise da expressão gênica, neste estudo, foram realizadas diferentes tentativas para separação do componente epitelial de amostras de timo adulto-idoso, mas estas não foram bem-sucedidas, assim os ensaios de PCRq foram realizados a partir de RNA obtidos de fragmentos tímicos como um todo. Devido a isso, é possível que a alta expressão de *DLL1* e *DLL4* esteja relacionada com a presença de células adiposas que são encontradas em grande quantidade em amostras de timo adulto-idoso em relação áreas de TEC, como discutido anteriormente neste capítulo. De fato, já foi observada expressão de *DLL4* em tecido adiposo humano e de animais submetidos à dieta rica em gorduras (Fukuda *et al.*, 2012). Tecnologias que aprimorem a purificação de TEC de amostras de timo humano de doadores idosos serão necessárias para elucidar o papel dos ligantes de NOTCH durante a senescência do timo. Mas, considerando a expressão desses genes no microambiente tímico como um todo, pode-se destacar que a presença desses ligantes no timo, mesmo em outro tipo celular, parece não ser suficiente para manter a produção normal de linfócitos T. Curiosamente, foi observado que células de estroma de medula óssea da linhagem OP9-DL1, as quais possuem alta expressão do ligante *DLL1*, quando tratadas com fatores adipogênicos sofrem uma redução na sua habilidade de induzir a diferenciação de linfócitos T *in vitro* (Yang *et al.*, 2009). Além disso, já foi visto que NOTCH e seus ligantes podem

atuar em vias de sinalização que induzem a senescência, o que poderia contribuir para o fenótipo do timo em envelhecimento observado no estudo (Beverly *et al.*, 2006; Venkatesh *et al.*, 2011).

Além dos ligantes da família NOTCH discutidos acima, também foi avaliada expressão do gene para glicoproteína WNT-4. Essa glicoproteína pertence a uma família de moléculas solúveis produzidas no timo, tanto por TEC quanto por timócitos, que desempenham importantes funções no desenvolvimento do órgão e na diferenciação dos linfócitos T, estando também relacionadas com a involução tímica (Pongracz *et al.*, 2003; Louis *et al.*, 2008; Kvell *et al.*, 2010; Osada *et al.*, 2010). Foi constatado que o gene *WNT-4* está ativo em timo humano de diferentes idades, com um leve aumento na sua expressão em amostras de timo jovem-adulto, mas que não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com as outras amostras no estudo. Diferente do que foi encontrado para as amostras de timo humano, estudos mostraram uma menor expressão de *Wnt4* aliado a um aumento na expressão dos genes específicos de diferenciação de adipócitos *Pparg* (abreviatura do Inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) e *Plin2* [abreviatura do Inglês *perilipin 2*; antigo *Adrp* (abreviatura do Inglês *adipose differentiation related protein*)] em TEC de camundongos de 12 meses de idade (Kvell *et al.*, 2010). A utilização de timo total para as análises de expressão gênica pode acrescentar vieses na interpretação desse dado em relação à expressão gênica em TEC, assim, considerando o órgão como todo, é plausível supor que a WNT4 produzida no microambiente tímico, durante senescência, ative receptores inibitórios que interferem na sinalização da glicoproteína em TEC. Varecza e colaboradores (2011) demonstraram que ocorre um aumento na expressão dos receptores *Frizzled* do tipo 4, 6 e 8 no timo de camundongos velhos, os quais atuam em vias inibidoras da sinalização WNT. Em linha com esse raciocínio, foi verificado em timos humanos provenientes de doadores com idade entre 50 e 70 anos, através de microarranjo de DNA, um aumento na expressão de genes que atuam na via inibitória de Wnt como *PPARG*, *CEBPA* (abreviatura do Inglês *CCAAT-enhancer-binding protein alfa*), *SFRP1* (abreviatura do Inglês *secreted frizzled-related protein 1*) e *TIMP1* (abreviatura do Inglês *TIMP metallopeptidase inhibitor 1*) (Ferrando-Martinez *et al.*, 2015).

No timo, a glicoproteína WNT4 atua nas TEC estimulando a expressão do fator de transcrição FOXP1 (Balciunaite *et al.*, 2002). A diminuição na expressão

desse fator vem sendo estudada como uma das marcas da senescência tímica em camundongos, contudo ainda não se tem informações de estudos sobre a sua expressão em timo humano ao longo do envelhecimento. Gotter e colaboradores (2004) (Gotter *et al.*, 2004) demonstraram a expressão de *FOXN1* em TEC de timos humanos provenientes de doadores recém-nascidos de até um ano e seis meses de idade. Em acordo com esse achado, foi verificado que *FOXN1* está expresso nas amostras de timos humanos estudadas, contudo uma diminuição significativa na sua expressão foi observada em amostras de timo adulto-idoso. Esse resultado está em concordância com dados da literatura que relataram uma diminuição na expressão de *Foxn1* no timo durante o envelhecimento (Ortman *et al.*, 2002; Kvell *et al.*, 2010). Nesses estudos também foi mostrado que o conteúdo de TEC se manteve inalterado ao longo do tempo. Mas, como já descrito anteriormente, nas amostras de timo adulto-idoso acontece uma diminuição na área de TEC, assim, para amenizar os efeitos da diminuição no compartimento epitelial nessas amostras, foi verificada expressão protéica de *FOXN1*, em fragmentos congelados de timo, por imunofluorescência. Os dados obtidos estão de acordo com a expressão gênica, em que foi visto uma diminuição na expressão de *FOXN1* nas áreas de TEC de amostras de timo adulto-idoso em comparação com as amostras de timo pós-natal.

Os resultados acima descritos levam a acreditar que as TEC presentes no timo adulto-idoso podem ser resistentes a indução da expressão de *FOXN1*, já que foi observada, nessas amostras, expressão do gene para glicoproteína *WNT4*, que faz parte da via de sinalização para expressão de *FOXN1* (Balciunaite *et al.*, 2002). De fato, já foi demonstrado que a redução na expressão de *Wnt4* em timo de animais velhos de 12 meses de idade é acompanhada pela redução na expressão de *Foxn1* (Kvell *et al.*, 2010). Supondo que esta via de sinalização também esteja conservada em humanos, a sua ativação induziria a expressão de *FOXN1*. Para testar essa hipótese, células da linhagem de TEC humana pós-natal (THPN) foram cultivadas em arcabouços tridimensionais de celulose (3D) ou tratadas com LiCl, o qual mimetiza a via de sinalização clássica de WNT. Ambas condições de cultivo já foram descritas para indução da expressão de *FOXN1* em camundongos (Balciunaite *et al.*, 2002; Mohtashami e Zúñiga-Pflücker, 2006). Foi visto que, tanto as células THPN cultivadas em monocamadas quanto às células cultivadas em 3D, apresentaram expressão dos genes para os ligantes da família NOTCH, *DLL1* e *DLL4*, contudo não foi observada expressão de *FOXN1* nessas células. O

tratamento com LiCl, no período de 6 horas, foi capaz de estimular a via de WNT, o qual foi verificado pelo acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleos das células tratadas. Contudo, esse regime de tratamento não foi capaz de induzir a expressão de FOXN1.

De posse desses resultados, é possível supor que as células THPN, similar as TEC presente no timo senescente, são resistentes a estímulos específicos para indução de FOXN1. De maneira interessante, já foi observado em timos de animais transgênicos para *Foxn1* e nas linhagens celulares OP9 (estroma de medula óssea) e TE89 (TEC humana), as quais são transfectadas com gene para FOXN1 murino e humano, respectivamente, que o transgene estimula a sua expressão endógena, sugerindo que FOXN1 pode regular positivamente sua própria expressão (Zook *et al.*, 2011). Neste contexto, pode-se considerar que a indução da expressão de FOXN1 via WNT4, ou pela ação do próprio fator, acontece por uma alça de regulação que requer um gene *FOXN1* responsivo. Assim, ainda que existam as lacunas no entendimento dos processos de regulação gênica em timos humanos e considerando os resultados obtidos nas análises de expressão gênica e proteica descritas acima, e em conjunto com estudos constantes na literatura, a hipótese do presente estudo é que a resistência à indução da expressão de FOXN1, tanto em TEC de amostras de timo idoso quando em células da linhagem THPN, pode ser resultado do silenciamento da transcrição gênica mediado por mecanismos de regulação epigenéticos.

Para o nosso conhecimento, não há estudos que demonstrem o controle epigenético do gene *FOXN1*, assim, no intuito de elucidar essa questão, foi realizada a análise de metilação do DNA de diferentes regiões do gene *FOXN1*, por sequenciamento de DNA, após conversão com bissulfato de sódio. Primeiramente foi feito um levantamento dos resíduos de CpG presentes na sequência gênica de *FOXN1* a partir de dados experimentais dos laboratórios do Consórcio ENCODE, disponibilizados no banco de dados da UCSC (ENCODE, 2012). Com base nesse levantamento, regiões contendo resíduos CpG no íntron 1 (C20) e no éxon 2 (DB2) foram selecionadas para verificação de metilação nas amostras de DNA convertido de células da linhagem THPN e nas amostras de timo pós-natal (5 dias) e adulto-idoso (59 anos). Foi observado um baixo percentual de metilação na região C20, em diferentes resíduos CpG, em clones de timo adulto-idoso e em clones provenientes da linhagem THPN, contudo a diferença não foi significativa quando comparada ao

percentual de metilação nos clones das amostras de timo pós-natal. Na região DB2 também foi observada uma leve diminuição no percentual de metilação nos clones das amostras de timo adulto-idoso e de THPN, mas que não foi estatisticamente significativa quando comparada a metilação dos clones de timo pós-natal. Curiosamente, a região C20 avaliada neste estudo, contém uma região repetitiva de DNA com 27 pb, que abriga quatro dos resíduos CpG analisados: 3, 4, 5, 6, dos quais apenas o CpG 4 dos clones da amostra THPN apresentou 100% de percentual de metilação. Com relação a esse dado, já foi demonstrado uma hipometilação em regiões repetitivas do genoma como elementos *Alu* e LINE durante o envelhecimento em humanos (Bollati *et al.*, 2009). Como esses elementos representam quase 40% do genoma humano, alguns estudos consideram que alterações na metilação em suas regiões representam o padrão de metilação global do genoma (Bollati *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2014).

A composição heterogênea das amostras de timo, principalmente a amostra de 5 dias, a qual contém grande quantidade de linfócitos, dificulta uma análise mais precisa da metilação em TEC. Contudo, quando comparamos os padrões de metilação constantes na base de dados do ENCODE, para amostras de pele humana, em que há expressão de *FOXN1* (Frank *et al.*, 1999; Mandinova *et al.*, 2009), pode-se observar um baixo percentual de metilação nos resíduos CpG da região C20 e no CpG 6 da região DB2. Enquanto que leucócitos humanos, os quais não expressam constitutivamente o fator (Su *et al.*, 2004), possuem alto percentual de metilação em ambas as regiões. Com base nestes dados e considerando que as amostras de células da linhagem de TEC humana e de timo adulto-idoso, que possuem pouco ou nenhum linfócito, apresentam resíduos CpG com maior percentual de metilação quanto comparado com amostra de pele humana, é possível sugerir um aumento na metilação nas regiões estudadas. Além disso, a presença de clones na amostra de timo adulto-idoso com CpG completamente desmetilados indicam uma possível hipometilação no gene *FOXN1* presente em outros tipos celulares que não TEC. Em relação a isso, foi observada no timo de ratos velhos, uma redução na expressão de enzimas DNMTs, enzimas modificadoras de histonas e enzimas de remodelamento da cromatina acompanhado por uma hipometilação global do genoma (Sidler *et al.*, 2013). Essa hipótese corrobora o entendimento geral de que, durante a imunosenescência, existe uma hipometilação global do genoma acompanhada por um aumento da metilação em

regiões reguladoras de genes tecido-específicos (Maegawa *et al.*, 2010; Koch e Wagner, 2011; Johnson *et al.*, 2012).

Apesar desses resultados, trabalhos que analisem a expressão dos genes e sua regulação nos diferentes tipos de TEC, em timos jovens e velhos, são necessários para um melhor entendimento do papel dessas moléculas como causa e/ ou consequência da involução tímica durante o envelhecimento em humanos. Esses estudos poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias para regeneração terapêutica da função tímica.



## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que os genes *DLL1*, *DLL4*, *FOXN1* e *WNT4* estão presentes no microambiente tímico ao longo do envelhecimento em humanos e que *DLL1*, *DLL4* e *FOXN1* estão diferencialmente expressos em amostras de timo adulto-idoso em comparação com amostras de timo pós-natal. Além disso, foi observado que há diminuição na expressão gênica de *FOXN1* e uma possível diminuição da proteína FOXN1 em cortes congelados de timo provenientes de doadores do grupo adulto-idoso.

Ao investigar as causas das alterações gênicas observadas nas amostras tímicas em estudo, utilizando células da linhagem de TEC humana pós-natal como modelo, foi possível concluir que o gene *FOXN1* está silenciado, mesmo quando em presença de condições que ativam a sua via de sinalização. Foi proposto, então, que tal silenciamento é resultado do controle da transcrição gênica por mecanismo epigenético de metilação de DNA. A análise do padrão de metilação de DNA em CpG presentes no gene *FOXN1* indica que a diminuição da sua expressão, observada nas amostras de timo adulto-idoso e em THPN, pode ser consequência de um aumento na metilação em regiões reguladoras do gene *FOXN1* em TEC. Além disso, foi proposto que há uma hipometilação no gene em outras células do microambiente tímico.

## 7 PERSPECTIVAS

Para maior compreensão dos resultados aqui apresentados e buscando aprofundar o conhecimento sobre diminuição de *FOXN1* no timo durante o envelhecimento, pretende-se:

1. Avaliar a expressão de *FOXN1* em timos humanos provenientes de doadores de diferentes idades através de hibridização *in situ*;
2. Estabelecer um protocolo de isolamento de TEC provenientes de timo de doadores idosos para investigar o padrão de metilação através de sequenciamento de DNA;
3. Estabelecer uma linhagem de TEC humana com altos níveis de *FOXN1* para avaliação gênica e funcional;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almamun M, Levinson BT, Gater ST, Schnabel RD, Arthur GL, Davis JW, Taylor KH. Genome-wide DNA methylation analysis in precursor B-cells. *Epigenetics*. 2014; 9(12):1588-95.

Alves NL, Huntington ND, Rodewald HR, Di Santo JP. Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle". *Trends Immunol*. 2009; 30(10):468-74.

Alves NL, Takahama Y, Ohigashi I, Ribeiro AR, Baik S, Anderson G, Jenkinson WE. Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur J Immunol*. 2014; 44(1):16-22.

Amarante-Mendes JG, Chammas R, Abrahamsohn P, Patel PC, Potworowski EF, Macedo MS. Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. *Cell Immunol*. 1995;161(2):173-80.

Anderson MR, Enose-Akahata Y, Massoud R, Ngouth N, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Epigenetic modification of the FoxP3 TSDR in HAM/TSP decreases the functional suppression of Tregs. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014; 9(4):522-32.

Ara T1, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T, Nagasawa T. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol*. 2003; 170(9):4649-55.

Aw D, Silva AB, Maddick M, von Zglinicki T, Palmer DB. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell*. 2008; 7(2):158-67.

Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179(7):572-8.

Bajoghli B1, Aghaallaei N, Hess I, Rode I, Netuschil N, Tay BH, Venkatesh B, Yu JK, Kaltenbach SL, Holland ND, Diekhoff D, Happe C, Schorpp M, Boehm T. Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates. *Cell*. 2009; 138(1):186-97.

Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, Gill J, Boyd R, Sussman DJ, Holländer GA. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol.* 2002; 3(11):1102-8.

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004; 37(7):529-40.

Beerman I, Bock C, Garrison BS, Smith ZD, Gu H, Meissner A, Rossi DJ. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(4):413-25.

Beerman I, Rossi DJ. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. *Exp Cell Res.* 2014; 329(2):192-9.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009; 23(7):781-3.

Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007; 447(7143):407-12.

Berkley AM, Hendricks DW, Simmons KB, Fink PJ. Recent thymic emigrants and mature naive T cells exhibit differential DNA methylation at key cytokine loci. *J Immunol.* 2013; 190(12):6180-6.

Beverly LJ, Ascano JM, Capobianco AJ. Expression of JAGGED1 in T-lymphocytes results in thymic involution by inducing apoptosis of thymic stromal epithelial cells. *Genes Immun.* 2006; 7(6):476-86.

Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(4): 278-89.

Blake JA, Bult CJ, Eppig JT, Kadin JA, Richardson JE, Group MGD. The Mouse Genome Database: integration of and access to knowledge about the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D810-7.

Blalock JE, Smith EM. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav Immun.* 2007; 21(1):23-33.

Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol.* 2000; 30(12):3371-9.

Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönting JS, Boehm T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature*. 2006; 441(7096):992-6.

Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics*. 2005; 21(21):4067-8.

Boehm T, Swann JB. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(11):831-8.

Boehm T. Thymus development and function. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(2):178-84.

Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009; 130(4):234-9.

Bredenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2014a; 16(9):902-8.

Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*. 2014b; 141(8):1627-37.

Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One*. 2011; 6(1):e14524.

Brissette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP. The product of the mouse nude locus, *Whn*, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev*. 1996 ;10(17):2212-21.

Calderón L, Boehm T. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell*. 2012; 149(1):159-72.

Calderón L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(18):7517-22.

Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 2007; 5(8):e201.

Chatterjee R, Vinson C. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1819(7):763-70.

Chen L, Xiao S, Manley NR. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood.* 2009; 113(3):567-74.

Cheng L, Guo J, Sun L, Fu J, Barnes PF, Metzger D, Chambon P, Oshima RG, Amagai T, Su DM. Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic atrophy. *J Biol Chem.* 2010; 285(8):5836-47

Chu YW, Schmitz S, Choudhury B, Telford W, Kapoor V, Garfield S, Howe D, Gress RE. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood.* 2008; 112(7):2836-46.

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:463-93.

Clark RA, Yamanaka K, Bai M, Dowgiert R, Kupper TS. Human skin cells support thymus-independent T cell development. *J Clin Invest.* 2005; 115(11):3239-49.

Coffer PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(11):889-99.

Corbeaux T, Hess I, Swann JB, Kanzler B, Haas-Assenbaum A, Boehm T. Thymopoiesis in mice depends on a *Foxn1*-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(38): 16613-8.

Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS, Brown CJ. Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet.* 2014.

Dahl C, Grønbæk K, Guldborg P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta.* 2011; 412(11-12):831-6.

D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, Passarino G. Epigenetics and aging. *Maturitas*. 2013; 74(2):130-6.

Dardenne M, Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Savino W. Growth hormone modulates migration of developing T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1153:1-5.

Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010; Chapter 7:Unit 7.9.1-17.

de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Dardenne M, Savino W. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol*. 1997; 76(1-2):39-49.

De Prins S, Koppen G, Jacobs G, Dons E, Van de Mierop E, Nelen V, Fierens F, Int Panis L, De Boever P, Cox B, Nawrot TS, Schoeters G. Influence of ambient air pollution on global DNA methylation in healthy adults: a seasonal follow-up. *Environ Int*. 2013; 59:418-24.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011; 25(10):1010-22.

Deaton AM, Webb S, Kerr AR, Illingworth RS, Guy J, Andrews R, Bird A. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res*. 2011; 21(7):1074-86.

den Braber I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, Westera L, Mögling R, de Boer AB, Willems N, Schrijver EH, Spierenburg G, Gaiser K, Mul E, Otto SA, Ruitter AF, Ackermans MT, Miedema F, Borghans JA, de Boer RJ, Tesselaar K. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*. 2012; 36(2):288-97.

Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, van der Spek P, Koster EE, Reinders MJ, van Dongen JJ, Langerak AW, Staal FJ. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*. 2005; 201(11):1715-23.

Douek DC1, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998; 396(6712):690-5.

Dowling MR, Hodgkin PD. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends Immunol*. 2009; 30(7):295-300.

ENCODE project consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012; 489(7414):57-74.

Farley AM, Morris LX, Vroegindeweij E, Depreter ML, Vaidya H, Stenhouse FH, Tomlinson SR, Anderson RA, Cupedo T, Cornelissen JJ, Blackburn CC.. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development*. 2013; 140(9): 2015-26.

Felli MP1, Maroder M, Mitsiadis TA, Campese AF, Bellavia D, Vacca A, Mann RS, Frati L, Lendahl U, Gulino A, Screpanti I. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol*. 1999; 11(7):1017-25.

Fernández E, Vicente A, Zapata A, Brera B, Lozano JJ, Martínez C, Toribio ML. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood*. 1994; 83(11):3245-54.

Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, Dudakov JA, Velardi E, Grillari J, Kreil DP, Muñoz-Fernandez MÁ, van den Brink MR, Leal M. WNT Signaling Suppression in the Senescent Human Thymus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(3):273-8

Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(8):544-9.

Fiorini E1, Ferrero I, Merck E, Favre S, Pierres M, Luther SA, MacDonald HR. Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J Immunol*. 2008; 181(12):8199-203.

Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 1966;8(3):295-309.



Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007; 5(2):e38.

Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest.* 1999; 104(8):1031-9.

Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM. Exposing the human nude phenotype. *Nature.* 1999; 398(6727):473-4.

French RA1, Broussard SR, Meier WA, Minshall C, Arkins S, Zachary JF, Dantzer R, Kelley KW. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. *Endocrinology.* 2002; 143(2):690-9.

Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, Novobrantseva TI, Kotelianski V, Gorgun CZ, Chudnovskiy A, Yamazaki H, Croce K, Weissleder R, Aster JC, Hotamisligil GS, Yagita H, Aikawa M. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(27):E1868-77.

George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today.* 1996; 17(6):267-72.

Golbert DC, Correa-de-Santana E, Ribeiro-Alves M, de Vasconcelos AT, Savino W. ITGA6 gene silencing by RNA interference modulates the expression of a large number of cell migration-related genes in human thymic epithelial cells. *BMC Genomics.* 2013;14 Suppl 6:S3.

Golbus J, Palella TD, Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol.* 1990; 20(8):1869-72.

Gordon J, Bennett AR, Blackburn CC, Manley NR. *Gcm2* and *Foxn1* mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev.* 2001;103(1-2):141-3.

Gordon J, Wilson VA, Blair NF, Sheridan J, Farley A, Wilson L, Manley NR, Blackburn CC. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol.* 2004; 5(5):546-53

Gotter J, Brors B, Hergenbahn M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med.* 2004; 199(2):155-66.

Gray DH, Chidgey AP, Boyd RL. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2002; 260(1-2):15-28.

Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(Database issue):D1079-85.

Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature.* 1982; 295(5850):620-2.

Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol.* 2007; 19(10):1201-11.

Heinzel K, Benz C, Martins VC, Haidl ID, Bleul CC. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *J Immunol.* 2007; 178(2):858-68.

Heng TS, Chidgey AP, Boyd RL. Getting back at nature: understanding thymic development and overcoming its atrophy. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(4):425-33.

Herasimtschuk AA, Westrop SJ, Moyle GJ, Downey JS, Imami N. Effects of recombinant human growth hormone on HIV-1-specific T-cell responses, thymic output and proviral DNA in patients on HAART: 48-week follow-up. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2008; 6:7.

Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res.* 1997;57(5):837-41.

Hetzer-Egger C, Schorpp M, Haas-Assenbaum A, Balling R, Peters H, Boehm T. Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2002; 32(4): 1175-81.

Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med.* 2008; 205(11):2507-13.

Huang X, Su G, Wang Z, Shangguan S, Cui X, Zhu J, Kang M, Li S, Zhang T, Wu F, Wang L. Hypomethylation of long interspersed nucleotide element-1 in peripheral mononuclear cells of juvenile systemic lupus erythematosus patients in China. *Int J Rheum Dis.* 2014; 17(3):280-90.

Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994;7(4):536-40.

Itoi M, Kawamoto H, Katsura Y, Amagai T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int Immunol.* 2001;13(9):1203-11.

Itoi M, Tsukamoto N, Yoshida H, Amagai T. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. *Int Immunol.* 2007; 19(8):953-64.

Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* 2012; 15(5):483-94.

Kaplan MJ, Lu Q, Wu A, Attwood J, Richardson B. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells. *J Immunol.* 2004; 172(6):3652-61.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002; 12(6):996-1006.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(16):8455-9.

- Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Detels R, Phair J, Jamieson BD. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J Immunol.* 2008; 180(3):1499-507.
- Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-91.
- Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(20):11822-7.
- Klug DB, Carter C, Gimenez-Conti IB, Richie ER. Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol.* 2002; 169(6):2842-5.
- Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging.* 2011; 3(10):1018-27.
- Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med.* 2008; 205(11):2515-23.
- Kont V, Murumägi A, Tykocinski LO, Kinkel SA, Webster KE, Kisand K, Tserel L, Pihlap M, Ströbel P, Scott HS, Marx A, Kyewski B, Peterson P. DNA methylation signatures of the *AIRE* promoter in thymic epithelial cells, thymomas and normal tissues. *Mol Immunol.* 2011; 49(3):518-26.
- Kumaki Y, Oda M, Okano M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Web Server issue):W170-5.
- Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, Anderson G, et al. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *PLoS One.* 2010; 5(5):e10701.
- Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol.* 2006; 7(4):338-43.

- Lagrotta-Cândido JM, Villa-Verde DM, Vanderlei FH, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. *Cell Immunol.* 1996; 170(2):235-44.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):860-921.
- Lannes-Vieira J, Chammas R, Villa-Verde DM, Vannier-dos-Santos MA, Mello-Coelho V, de Souza SJ, Brentani RR, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int Immunol.* 1993; 5(11):1421-30.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23(21):2947-8.
- Laster AJ, Itoh T, Palker TJ, Haynes BF. The human thymic microenvironment: thymic epithelium contains specific keratins associated with early and late stages of epidermal keratinocyte maturation. *Differentiation.* 1986; 31(1):67-77.
- Lepletier A, Chidgey AP, Savino W. Perspectives for Improvement of the Thymic Microenvironment through Manipulation of Thymic Epithelial Cells: A Mini-Review. *Gerontology.* No prelo.
- Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature.* 1993; 366(6453):362-5.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992; 69(6):915-26.
- Li J, Liu Z, Xiao S, Manley NR. Transdifferentiation of parathyroid cells into cervical thymi promotes atypical T-cell development. *Nat Commun.* 2013; 4:2959.
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002; 18(11):1427-31.

Linhares-Lacerda L, Ribeiro-Alves M, Nogueira AC, Mendes-da-Cruz DA, Magalhães DA, Dardenne M, Passos GA, Savino W. RNA interference-mediated knockdown of CD49e ( $\alpha 5$  integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics*. 2010; 11 Suppl 5:S2.

Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunology*. 2003; 4(4):350-4.

Liu J, Wang Y, Pan Q, Su Y, Zhang Z, Han J, Zhu X, Tang C, Hu D. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF- $\beta 1$  induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *J Dermatol Sci*. 2012;65(1):38-49.

Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2002; 84(2):324-34.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153(6):1194-217.

Louis I, Heinonen KM, Chagraoui J, Vainio S, Sauvageau G, Perreault C. The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling. *Immunity*. 2008; 29(1):57-67.

Lu Q, Kaplan M, Ray D, Zacharek S, Gutsch D, Richardson B. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(5):1282-91.

Ma D, Wei Y, Liu F. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Dev Comp Immunol*. 2013; 39(1-2): 91-102.

Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res*. 2010; 20(3):332-40.

Mandinova A1, Kolev V, Neel V, Hu B, Stonely W, Lieb J, Wu X, Colli C, Han R, Pazin MJ, Ostano P, Dummer R, Brissette JL, Dotto GP. A positive FGFR3/FOXN1

feedback loop underlies benign skin keratosis versus squamous cell carcinoma formation in humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(10):3127-37.

Manley NR, Condie BG. Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010; 92:103-20.

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG.. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 2004; 427(6972):355-60.

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature.* 2010; 466(7303):253-7.

Miller JF. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(7):489-95.

Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways. *Aging Cell.* 2004; 3: 379-89.

Mohtashami M, Zúñiga-Pflücker JC. Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol.* 2006; 176(2):730-4.

Mori K, Itoi M, Tsukamoto N, Amagai T. Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage. *Cell Immunol.* 2010; 260(2):66-9.

Na YK, Hong HS, Lee DH, Lee WK, Kim DS. Effect of body mass index on global DNA methylation in healthy Korean women. *Mol Cells.* 2014; 37(6):467-72.

Napolitano LA, Schmidt D, Gotway MB, Ameli N, Filbert EL, Ng MM, et al. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest.* 2008; 118(3):1085-98.

National Center for Biotechnology (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), Gene section. FOXN1 forkhead box N1 [Homo sapiens (human)]; [acesso em 25 jan 2013]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8456>.

Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*. 1994; 372(6501):103-7.

Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol*. 2008; 99:59-94.

Nowell CS, Bredenkamp N, Tetélin S, Jin X, Tischner C, Vaidya H, Sheridan JM, Stenhouse FH, Heussen R, Smith AJ, Blackburn CC. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet*. 2011; 7(11):e1002348.

Ohi T, Uehara Y, Takatsu M, Watanabe M, Ono T. Hypermethylation of CpGs in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. *J Dent Res*. 2006; 85(3):245-50.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99(3):247-57.

Organização Mundial de Saúde (OMS) [Internet]. Antimicrobial resistance. Fact Sheet nº194. 2014; [acesso em 15 fev 2015]; Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.

Ortman CL, Dittmar KA, Witte PL, Le PT. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol*. 2002; 14(7):813-22.

Osada M, Jardine L, Misir R, Andl T, Millar SE, Pezzano M. DKK1 mediated inhibition of Wnt signaling in postnatal mice leads to loss of TEC progenitors and thymic degeneration. *PLoS One*. 2010; 5(2):e9062.

Paraguassú-Braga FH, Alves AP, Santos IM, Bonamino M, Bonomo A. An ectopic stromal implant model for hematopoietic reconstitution and in vivo evaluation of bone marrow niches. *Cell Transplant*. 2012; 21(12):2677-88.

Park SY, Seo AN, Jung HY, Gwak JM, Jung N, Cho NY, Kang GH. Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100429.



Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol.* 2006; 34(5):504-14.

Pignata C, Fiore M, Guzzetta V, Castaldo A, Sebastio G, Porta F, Guarino A. Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet.* 1996; 65(2):167-70.

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell.* 2004; 3(4):161-7.

Pogribny IP, Vanyushin BF. Age-Related Genomic Hypomethylation. Tollefsbol TO (ed.). *Epigenetics of Aging.* New York: Springer-Verlag. 2010; 11-27.

Polansky JK1, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008; 38(6):1654-63.

Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol.* 2003; 33(7):1949-56.

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

Poznansky MC, Evans RH, Foxall RB, Olszak IT, Piascik AH, Hartman KE, Brander C, Meyer TH, Pykett MJ, Chabner KT, Kalams SA, Rosenzweig M, Scadden DT. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nature Biotechnology.* 2000; 18(7):729-34.

Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of  $\gamma\delta$  T cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43(8):1988-94.

Ramond C, Berthault C, Burlen-Defranoux O, de Sousa AP, Guy-Grand D, Vieira P, Pereira P, Cumano A. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat Immunol.* 2014; 15(1):27-35.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;293(5532):1089-93.

Revest JM, Suniara RK, Kerr K, Owen JJ, Dickson C. Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol.* 2001; 167(4):1954-61.

Romanov GA, Vanyushin BF. Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 653(2):204-18.

Rossi SW, Chidgey AP, Parnell SM, Jenkinson WE, Scott HS, Boyd RL, et al. Redefining epithelial progenitor potential in the developing thymus. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2411-8.

Rossi SW, Chidgey AP, Parnell SM, Jenkinson WE, Scott HS, Boyd RL, Jenkinson EJ, Anderson G. Adult thymus contains FoxN1(-) epithelial stem cells that are bipotent for medullary and cortical thymic epithelial lineages. *Immunity.* 2014; 41(2):257-69.

Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, Jenkinson EJ. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature.* 2006;441(7096):988-91.

Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O, Villa-Verde DM.. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(8):1015-25.

Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev.* 2000; 21(4):412-43.

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* 2002; 23(6):305-13.

Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(6):951-61.

Savino W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol.* 2007; 92(5):813-7.

Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med.* 2004; 200(4):469-79.

Schorpp M, Hofmann M, Dear TN, Boehm T. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics.* 1997; 46(6):509-15.

Schüddekopf K, Schorpp M, Boehm T. The whn transcription factor encoded by the nude locus contains an evolutionarily conserved and functionally indispensable activation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(18):9661-4.

Seach N, Wong K, Hammett M, Boyd RL, Chidgey AP. Purified enzymes improve isolation and characterization of the adult thymic epithelium. *J Immunol Methods.* 2012; 385(1-2):23-34.

Sidler C, Wóycicki R, Ilnytsky Y, Metz G, Kovalchuk I, Kovalchuk O. Immunosenescence is associated with altered gene expression and epigenetic regulation in primary and secondary immune organs. *Front Genet.* 2013; 4:211.

Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, Savino W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology.* 2005; 146(7):3005-17.

Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Carvalho-Pinto CE, Araujo LM, Dardenne M, Savino W. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain Behav Immun.* 2010; 24(3):451-61.

So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, et al. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci.* 2006; 97(11):1155-8.

Staal FJ, Luis TC. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem.* 2010;109(5):844-9.

Staal FJ, Weerkamp F, Baert MR, van den Burg CM, van Noort M, de Haas EF, van Dongen JJ.. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+

thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J Immunol.* 2004; 172(2):1099-108.

Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol.* 1985; 22(5):563-75.

Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB.. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(16):6062-7.

Su D, Ellis S, Napier A, Lee K, Manley NR. *Hoxa3* and *pax1* regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Dev Biol.* 2001; 236(2): 316-29.

Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of *Foxn1* required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003; 4(11):1128-35.

Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012; 11(3):201-6.

Sun L, Brown R, Chen S, Zhuge Q, Su DM. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus. *Aging.* 2012; 4(9):606-19.

Sun L, Guo J, Brown R, Amagai T, Zhao Y, Su DM. Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell.* 2010; 9(3):347-57.

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

Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. *Mech Ageing Dev.* 1999; 110(1-2):37-48.

Taub DD, Murphy WJ, Longo DL. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(4):408-24.

The human gene compendium (GeneCards®). Rehovot: Weizmann Institute of Science. 1996. FOXP1 Gene; [acesso em 10 dez 2014]; Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXP1>.

The Universal Protein Resource (UniProt) [Internet]. Consócio UniProt. 2002. FOXP1 - Forkhead box protein N1 - Homo sapiens (Human) [acesso em 25 jan 2013]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/O15353>.

Tseng YH, Kessler MA, Schuler LA. Regulation of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, and IL-6 expression by growth hormone and prolactin in bovine thymic stromal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 128(1-2):117-27.

Tserel L, Limbach M, Saare M, Kisand K, Metspalu A, Milani L, et al. CpG sites associated with NRP1, NRXN2 and miR-29b-2 are hypomethylated in monocytes during ageing. *Immunity & Ageing.* 2014; 11(1):1.

Van de Walle I, De Smet G, Gärtner M, De Smedt M, Waegemans E, Vandekerckhove B, Leclercq G, Plum J, Aster JC, Bernstein ID, Guidos CJ, Kyewski B, Taghon T. Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions. *Blood.* 2011; 117(17):4449-59.

van Roon EH, Boot A, Dihal AA, Ernst RF, van Wezel T, Morreau H, Boer JM. BRAF mutation-specific promoter methylation of FOX genes in colorectal cancer. *Clin Epigenetics.* 2013; 5(1):2.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.

Varecza Z1, Kvell K, Talabér G, Miskei G, Csongei V, Bartis D, Anderson G, Jenkinson EJ, Pongracz JE. Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence. *Mech Ageing Dev.* 2011; 132(5):249-56.

Venkatesh D, Fredette N, Rostama B, Tang Y, Vary CP, Liaw L, Urs S. RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(4):876-82.

Ventevogel MS, Sempowski GD. Thymic rejuvenation and aging. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25(4):516-22.

Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene.* 2003; 22(26):4128-33.

Wang Y, Shu Y, Xiao Y, Wang Q, Kanekura T, Li Y, Wang J, Zhao M, Lu Q, Xiao R. Hypomethylation and overexpression of ITGAL (CD11a) in CD4(+) T cells in systemic sclerosis. *Clin Epigenetics.* 2014a; 6(1):25.

Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, Huang JH, Li YP, Wang JC, Zhao M, Lu QJ, Xiao R. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 2014b; 171(1):39-47.

Weerkamp F1, Baert MR, Brugman MH, Dik WA, de Haas EF, Visser TP, de Groot CJ, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood.* 2006; 107(8):3131-7.

Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell.* 1989; 57(4):645-58.

Wekerle H, Ketelsen UP, Ernst M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med.* 1980;151(4):925-44.

Wilson CB, Makar KW, Shnyreva M, Fitzpatrick DR. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin Immunol.* 2005;17(2):105-19.

Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem.* 1987; 262(21):9948-51.

Wong NA, Britton MP, Choi GS, Stanton TK, Bicknell DC, Wilding JL, Bodmer WF. Loss of CDX1 expression in colorectal carcinoma: promoter methylation, mutation, and loss of heterozygosity analyses of 37 cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(2):574-9.

Yan J, Zierath JR, Barrès R. Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Exp Cell Res*. 2011; 317(18):2555-61.

Yang H, Youm YH, Dixit VD. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol*. 2009; 183(5):3040-52.

Yang H, Youm YH, Sun Y, Rim JS, Galbán CJ, Vandanmagsar B, Dixit VD. Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling. *J Leukoc Biol*. 2009; 85(6):928-38.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:134.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*. 1997; 13(8):335-40.

Yu L, Chibnik LB, Srivastava GP, Pochet N, Yang J, Xu J, Kozubek J, Obholzer N, Leurgans SE, Schneider JA, Meissner A, De Jager PL, Bennett DA. Association of Brain DNA Methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 With Pathological Diagnosis of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2015; 72(1):15-24.

Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science*. 2010; 328(5982):1129-35

Zhang Z, Deng C, Lu Q, Richardson B. Age-dependent DNA methylation changes in the ITGAL (CD11a) promoter. *Mech Ageing Dev*. 2002; 123(9):1257-68.

Zook EC, Krishack PA, Zhang S, Zeleznik-Le NJ, Firulli AB, Witte PL, Le PT. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood*. 2011; 118(22):5723-31.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1: Comit  de  tica

Eg szs gügyi Tudományos Tan cs  
Tudományos  s Kutat setikai Bizotts g (ETT TUKEB)  
Eg szs gügyi Tudományos Tan cs Titk rs g  
Budapest 1051 Arany J nos u. 6-8.

 gyiratsz m: 11739- /2014/EKU (107/2014.)  
 gyint z  neve: Dr. Kardon Tamás  
ETT TUKEB Titkárság vezetője  
Elérhetősége: tukeb@emmi.gov.hu  
Telefon: (06-1) 795-1197  
Melléklet: 1 db

**Tárgy:** BioDiagnostica Kft.  
(Budapest, 1124 Csörsz u. 41.)  
beavatkozással nem járó vizsgálat  
engedélyezésének k relez se  
tárgyában hozott határozat

### HATÁROZAT

Dr. Csánky Eszter részére „A tüdőrák diagnózisa és a korai tüdőrák sz r s re alkalmazható diagnosztikum kipróbálása” című vizsgálat engedélyezése tárgyában benyújtott kérelmét, mint szakhatóság (2014. február 25-i  l s en) az alábbiak szerint bíráltam el.

A benyújtott beavatkozással nem járó vizsgálatra a kutatási tervhez küldött kiegészítések áttanulmányozása alapján

#### **a szakmai- tikai engedélyt megadom**

a csatolt, 23/2002.(V.9.)EÜM „Az emberen végzett orvostudományi kutatásokról” szóló rendelet 2. számú mellékletében felsorolt vizsg l helyekre.

A vizsgálat feltételei teljesültek.

Döntésem ellen a k zle st követő 15 munkanapon belül van helye fellebbezésnek a közigazgatási hatósági eljárás  s szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004.  vi CXL. törvény 99.  -ának (1) bekezdése alapján, az emberen végzett orvostudományi kutatások, az emberi felhasználásra kerülő vizsgálati készítmények klinikai vizsgálata, valamint az emberen történő alkalmazásra szolgáló, klinikai vizsgálatra szánt orvostechnikai eszközök klinikai vizsgálata engedélyezési eljárásának szabályairól szóló 235/2009. (X. 20.) Korm. rendelet (a továbbiakban: Korm. rendelet) 17.  -ának (3) bekezdése szerint.

A fellebbezési eljárás díja az emberen végzett orvostudományi kutatásokról szóló 23/2002. (V. 9.) EÜM rendelet (a továbbiakban: EÜM rendelet) 20/R.  -ának (3) bekezdése szerinti igazgatási szolgáltatási díj. A fellebbezést a hatóságomhoz kell benyújtani.



## A klinikai vizsgálat tervezett helyei

A klinikai protokollban megjelölt 1200 mkinta begyűjtését a következő 4 centrumban tervezzük megvalósítani:

1. Miskolci Semmelweis Ignác Egészségügy Központ Tüdőgyógyászati Osztály  
3529 Miskolc Csabai kapu 9-11.

Vizsgálatvezető: Dr. Csánky Eszter

2. Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum, Tüdőgyógyászati Klinika  
4012, Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Vizsgálatvezető: Dr. Szilasi Mária

3. Semmelweis Egyetem ÁOK, Pulmonológiai Klinika  
1125 Budapest, XII. Diós árok u. 1/C.

Vizsgálatvezető: Dr. Szondy Klára

4. SZTE ÁOK, Tüdőgyógyászati Tanszék  
6772 Deszk, Alkotmány u. 36.

Vizsgálatvezető: Prof. Dr. Somfay Attila

## ANEXO 2: Manuscrito submetido a publicação

### Decline of *FOXNI* gene expression in human thymus correlates with age: possible epigenetic regulation<sup>1</sup>

Maria Danielma dos Santos Reis<sup>\*†</sup>, Krisztian Csomos<sup>‡</sup>, Luciene Paschoal Braga Dias<sup>\*</sup>, Zsolt Prodan<sup>§</sup>, Tamas Szerafin<sup>¶</sup>, Wilson Savino<sup>\*</sup> and Laszlo Takacs<sup>†12</sup>

<sup>\*</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>†</sup>Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>‡</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>§</sup>Gottsegen György Hungarian Institute of Cardiology, Budapest, Hungary, <sup>¶</sup>Department of Cardiac Surgery, Clinical Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>1</sup>Biosystems International Kft, Debrecen, Hungary

**Running title:** Human thymic *FOXNI* expression decreases with age

#### Corresponding author:

Laszlo Takacs

Department of Human Genetics

University of Debrecen

Nagyerdei krt. 98, H-4032 Debrecen, Hungary

Phone:

Fax:

Email: [TakacsL@med.unideb.hu](mailto:TakacsL@med.unideb.hu)

## Abstract

Thymic involution is thought to be an important factor of age related immunodeficiency. Understanding the molecular mechanisms of human thymic senescence may lead to the discovery of novel therapeutic approaches aimed at the re-establishment of central and peripheral T cell repertoire. As an initial approach here we report that decline of human thymic *FOXN1* transcription correlates with age, while other genes, *DLL1*, *DLL4* and *WNT4*, essential for thymopoiesis are constitutively transcribed. Using a human thymic epithelial cell line, we show that FOXN1 expression is refractory to signals that induce *FOXN1* transcription in primary 3D culture conditions and by stimulation of the canonical WNT signaling pathway. We propose here that development/senescence related CpG methylation of transcriptional regulatory region(s) of the *FOXN1* gene may be responsible for the suppression of *FOXN1* transcription both in cultured human thymic epithelial cells and in the aging thymus.

## **Introduction**

In human, the thymus-derived naïve T cell repertoire, capable to exert effective protection to foreign antigens, is established during early embryonic life and it reaches maximal size in childhood (1, 2), subsequently, as antigen specific T cells are generated, the naïve T cell pool is gradually depleted. Thus, the limited naïve T-cell repertoire in elderly individuals is a major contributor to age-related immunodeficiency, a frequent cause of death (3, 4). The immune compromised status results in the lack of effective immune response against pathogenic microorganisms and malignant cells. Because age related immunodeficiency is often life limiting as the cause of frequent nosocomial infections of the elderly and because current treatment is insufficient, moreover it represents a significant medico-economic burden (5), there is a strong interest to develop effective and economically sound therapies. One possible strategy is the restoration of the naïve T cell repertoire via therapeutic regeneration of thymic activity.

Bone marrow derived stem cells migrate to the thymus where they proliferate and differentiate to TCR expressing T cells while their progeny centripetally migrate in, and eventually exit the organ. Accordingly, the recent emigrant naïve T cells permanently contribute to the peripheral T cell to maintain TCR repertoire diversity, and, at least in part, age related immunodeficiency is the result of the decline of naïve emigrant T cell production (6). Intrathymic T cell development is orchestrated by the microenvironment, a meshwork composed of stromal cells, such as dendritic cells, fibroblasts, macrophages and thymic epithelial cells (TEC), as well as by the extracellular matrix (ECM) molecules, which provide a unique three-dimensional environment (7). The thymic stromal cells are distributed within the thymic epithelial space, which is divided into two main compartments, cortex and medulla (8, 9). In the cortical and medullary microenvironments TEC interact with developing thymocytes via cell surface receptors, the production of ECM molecules, cytokines,

chemokines and growth factors (10). Thymic epithelial cells express (i) notch ligands which direct and restrict the bone marrow precursors to the T cell differentiation program (11) and (ii) self-antigen filled major histocompatibility complex molecules (MHC) which serve as substrates for TCR repertoire selection (12).

In humans, as the thymus ages, thymic epithelial mesh is gradually replaced by adipose tissue. The process is thought to start at the first year of life and continues during aging (8, 13), being accompanied by a decreasing export of naive T cells (14). The underlying molecular mechanisms responsible for the impairment of thymopoiesis in the aging thymus remains unclear. One possibility is that intrinsic mechanisms related to TEC physiology are impaired in old individuals, since bone marrow precursors from old animals are able to colonize the thymus (15). In fact, some studies showed that TEC proliferation is lower in old animals and it was also demonstrated that aging mice have higher percentage of apoptotic and senescent TECs (15, 16).

Studies in rodent models pointed out that the transcriptional factor forkhead box protein N1 (FOXN1) is both necessary and seemingly sufficient to induce differentiation of functional TEC (17, 18). FOXN1 is a key factor; it appears on day 11 during mouse embryonic development, and it turns on the thymic organogenesis program (2, 19). In a model with inducible Cre mediated deletion of an SV40 driven transgenic hypomorphic *Foxn1* allele, it has been demonstrated, that FOXN1 in TEC induces the expression of MHC II, CD40, PAX1, cathepsin-L, the chemokine CCL25 and the NOTCH ligand Delta-like 4 (DLL4), thus highlighting its orchestrating role in T cell maturation (20). The lack of FOXN1 in mice and rats results in the absence or the incomplete development of TEC and the thymic epithelial mesh, combined with severe immunodeficiency known as the *nude* phenotype (21). Nude mice carry a single base pair deletion at exon 3 of the *Foxn1* gene, which results in aberrant protein production, lacking the DNA-binding and the transcription activation domains, necessary for FOXN1 protein function (22, 23). Similar phenotype was found in

human carrying a rare non-sense mutation at the residue 255 of the FOXN1 protein, resulting from a single base substitution in exon 5 of the *FOXN1* gene (24). Recently, Bredenkamp and co-workers showed that mouse embryonic fibroblasts transfected with inducible *Foxn1* transdifferentiate to functional TECs upon induction (18). These *Foxn1* induced TECs support T cell development *in vitro* and *in vivo*. These data clearly demonstrate the central role of FOXN1 in thymic epithelial function and organogenesis. Murine models showed a decrease on *Foxn1* expression in aged thymus (25, 26). Others found that the decline of *Foxn1* expression results in a decrease of thymus cellularity and function, compared to normal aged murine thymus (27, 28). In contrast, thymus from aged mice, with high transgenic *Foxn1* levels, presented morphology and T cell maturation similar to the thymus of young mice (29). In addition, it was demonstrated that induction on *Foxn1* expression in a murine aging model was able to restore thymic architecture and T cell export, similar to pre-involuting thymus (30). Despite the overwhelming genetic evidence (31) and the recent molecular data, little is known on the human FOXN1 function and its regulation.

As an initial approach, from consented, young and aging donors, thymic biopsy specimens and a human postnatal TEC line (hTEC) (32) were studied here. We tested the expression of genes that have been reported to be essential for T cell development, particularly the inducibility of the *FOXN1* gene expression. Subsequently, we tested the methylation status of predicted transcriptional regulatory regions of the human *FOXN1* gene in young and old thymic samples, and in the cultured hTEC.

## **Materials and Methods:**

### *Cell culture*

The human TEC line was obtained from an infant thymus by primary explant culture and limiting dilution cloning (32). It has been kindly provided by Dr. Maria Luiza Toribio



(*Universidad Autonoma de Madrid*, Madrid, Spain). These cells were shown to express cytokeratins and several surface proteins, such as CD71, CD40, MHC I (HLA-ABC), MHC II (HLA-DR)<sup>low</sup>, ICAM-1, LFA-3, CD44, integrin-type ECM receptors including VLA-4, VLA-5 and VLA-6 (32, 33). Cells were cultured in 10% fetal calf serum (Cultilab, São Paulo, Brazil) supplemented RPMI 1640 medium (Mediatech, Virginia, USA) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Alternatively, these cells were cultured in three-dimensional cell culture system using macroporous cellulose microcarriers (Cytopore™, Asahi Kasei Medical Co., GE Healthcare, Japan) as described previously (34) with some modifications. Briefly, 100 µL of phosphate-buffered saline (PBS)-hydrated macroporous cellulose microcarriers were colonized with cells in a volume of the 2x10<sup>5</sup> cells under nitrocellulose membrane from Transwell™ inserts (Costar, Corning Incorporated, USA) and cultured for 4 days with complete medium at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Under these conditions, the cells were allowed to grow in 3D environment.

#### *Sample collection and histology*

Thymus samples were obtained from consented paediatric and adult patients undergoing cardiac surgery at the György Gottsegen National Institute for Cardiology, (Semmelweis University, Budapest, Hungary) and from the Department of Cardiac Surgery of the Clinical Center, University of Debrecen (Debrecen, Hungary) under a protocol approved by the Hungarian Ethics Committee for Science and Research (11739-/2014/EKU 107/2014.) and the local institutional review boards. Fresh thymus fragments were cleaned, washed in PBS and fixed in neutral buffered formalin for routine histological examination. Additional 3x3x3 mm fragments were snap frozen and kept at -80°C until use.

#### *Lithium chloride treatment*

hTEC line were cultured under standard conditions with complete medium for two days, and then treated with 20mM of lithium chloride (LiCl) for 6 and 18 hours as previously described to induce the WNT signaling pathway (35, 36). Non-treated cells and NaCl-treated cells were used as negative controls. After treatment, cells were used for RNA isolation or fixed with 100% methanol for immunofluorescence staining.

### *Immunofluorescence*

Immunofluorescence assays were used to evaluate FOXN1, cytokeratin and  $\beta$ -catenin protein expression in thymus samples and hTEC line cultured under various conditions. Briefly, thymic frozen sections fixed in acetone, and hTEC cultures fixed with 100% methanol, were re-hydrated in PBS and incubated for 30 minutes with PBS containing 1% bovine serum albumin to block unspecific binding. Next, the specimens were incubated with primary antibodies specific for human FOXN1 (donkey IgG, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), pan-cytokeratin (rabbit IgG, 1:100; DAKO, Aligent Technologies, Glostrup, Denmark) or human  $\beta$ -catenin (mouse monoclonal antibody, IgG<sub>1</sub>, 1:30; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 1 hour and 30 minutes at room temperature in a humidified chamber. After washings with PBS, the slides were incubated with corresponding fluorochrome-labeled secondary antibody for 45 min at room temperature, in a dark humidified chamber. Secondary reagents were: goat anti-rabbit (1:400; Molecular Probes, Life Technologies), goat anti-mouse (1:400; Molecular Probes, Life Technologies) and donkey anti-goat (1:400; Invitrogen). Next, after washing in PBS, the specimens were mounted for examination in the fluorescence microscope, a Zeiss Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with Axio Vision Release 4.8.2 software (Zeiss). Negative controls in which primary antibodies were replaced by unrelated immunoglobulins or in which the secondary antibody was used alone did not generate significant immunolabeling.

### *RNA isolation, cDNA synthesis and PCR assays*

Total RNA from thymus samples and hTEC line were purified by phenol-chloroform and used as templates for first strand cDNA synthesis followed by gene expression analysis via RT-PCR and quantitative PCR assays as follows. Small fragments of frozen thymi were homogenised with tissue homogenizer (T10 Basic, IKA®) in 1 ml of Trizol (TriReagent®, Molecular Research Center, Ohio, USA) whereas hTEC cultured in conventional monolayers or in 3D scaffolds were released from the substrate with trypsin/EDTA treatment for 10 minutes, centrifuged, washed in PBS and homogenized with 1mL of Trizol (TriReagent®, Molecular Research Center, Ohio, USA). After homogenization, RNA was purified according manufacturer's instructions. Total RNA concentration and purity were determined by the ratio of absorbance readings at 260 vs. 280 nm on NanoDrop ND 2000 spectrometer (Thermo Scientific, Delaware, USA). Up to 2 µg of total RNA were used to synthesize cDNA using high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, California, USA) following manufacturer's protocol. Quantitative PCR and RT-PCR reactions were performed using oligonucleotides previously described in the literature or specifically designed based on the target gene sequences reported in NCBI GenBank using the Primer3 software from the NCBI/BLAST platform (37). Specific sequences are shown in Table I. For RT-PCR reactions, eight microliters of diluted cDNA (1:5) were mixed with nuclease-free water, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq polimerase buffer, 0.025mM dNTPs, 0.05 U/µl Taq polimerase and 0.5µM of each primer in a 50 µL total volume (all from Applied Biosystems, California, USA except the nuclease-free water and primers). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles with denaturation 94°C for 30 s, annealing at 60 °C for 30s, and elongation at 72 °C for 30 s using the A&B thermocycler 2720 (Applied Biosystems, California, USA). Ten µL from each PCR reaction were run on 2% agarose gels at 90 V. The PCR products were visualized under UV light using ethidium bromide staining. The quantitative PCR reactions were performed using five microliters from 5-fold diluted

cDNA sample mixed with Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, California USA) containing specific oligonucleotides (0.3  $\mu$ M; Table I) in microwells of optical 384-well plates according to manufacturer's protocol. All samples were run in triplicates. The reactions were run in the ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT sequence analyser instrument (Applied Biosystems, California, USA) with Sequence Detector System 2.2 Software following three-step cycling protocol with 95°C for 10 min for initial denaturation; 95°C for 15s to denaturation; 60° C of 30s to elongation and 30s of 72°C to extension. After amplification, the Ct values were used to obtain normalized expression values as previously described (38).

#### *DNA Isolation and bisulfite treatment*

Genomic DNA samples were isolated from frozen thymus and hTEC line using the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. After isolation, DNA concentration and purity were determined by the ratio of absorbance readings at 260 and 280 nm on NanoDrop ND 2000 spectrometer (Thermo Scientific, Delaware, USA). Two micrograms of DNA were used to perform bisulfite treatment using EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the supplier's instructions. After reaction, the converted DNA was purified using silica columns (EpiTect spin columns, Qiagen, Hilden, Germany), eluted in RNase and DNase free water and keep in -20 freezer until use.

#### *DNA Methylation analysis*

Candidate regulatory sequences for CpG methylation were selected from the *FOXN1* gene using features of the University of California Santa Cruz (UCSC) genome browser [UCSC ID: uc010crm.3; (39)]. For selection, in addition to known features relevant to probable CpG methylation, we used experimental data reported in UCSC genome browser,

namely the DNA methylation, by reduced representation bisulfite sequencing performed by the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) consortium (40). Selected regions were exploited as targets to design bisulfite-treated DNA specific oligonucleotides using the MethylPrimer Express v 1.0 software (Applied Biosystems) and the web-based software MethPrimer (41). Both programs have algorithms for primer design specific for bisulfite-treated DNA, according the criteria described by Li and Dahiya (2002) (41).

For bisulfite sequencing, isolated DNA from thymus samples and hTEC line were converted with sodium bisulfite using Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described above. The selected candidate sequences (Fig. 4 and Suppl. Fig. 2) were amplified with specific primers for FOXN1/DB2 region (F: TTGTTGGTATTGTTTGAGAGGA; R: CCTCCATACAAATAAACCAACC) and FOXN1/C20 region (F: GTTTAGGGTGAGTTAGGTAGGGATAG; R: AAAAACAATTTCTAACTCTAAAATAAAT). The PCR products were cloned in pGEM-T plasmid (pGEM®-T Easy Vector System I; Promega, Wisconsin, USA) and the inserts were sequenced using BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, USA) using forward or reverse PCR primers. The reactions were performed in ABI3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, California, USA) at the Fiocruz DNA sequencing platform (Rio de Janeiro, Brazil). Traces were analysed with BioEdit: Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 (Ibis Biosciences, California, USA), aligned with ClustalW v1.83 (42) and submitted to CpG quantification using BiQ analyzer v2.00 (43). Percent methylation, with respect to each individual CpG, and the global average percentage methylation per each candidate sequences were displayed. For methylation call we used >90% conversion threshold. Lollipop diagrams were made per samples using Quantification Tool for Methylation Analysis (QUMA) web software (44).

### *Statistical analyses*

To test the probability of significant differences among the different study groups, the data obtained were analyzed GraphPad Prism software version 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.) using the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. The values were represented by the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## Results

### *1. Expression of DLL1, DLL4, FOXP1 and WNT-4 genes in human thymic samples*

Thymic samples were divided into three different groups according the donor's age: the "Postnatal" group comprises samples from 5 days-old to 1 year-old (a total of four samples); the "Child/adolescent" group contains samples whose donors are 7, 10, 14 and 17 years-old (a total of four samples); the "Adult" group included samples from donors, 49, 57, 59, 66, 75 and 78 years-old (seven samples total). As represented in Figures 1A and 1B, respectively, the genes *DLL1* and *DLL4* presented low relative levels in the younger groups, showing a significant elevation in the "Adult" group, while *FOXP1* expression was significantly decreasing from "Postnatal" through "Child/adolescent" to the "Adult" group (Fig. 1C). *WNT-4* expression seemed constitutive, not showing remarkable differences over time (Fig. 1D).

### *2. Histology, thymic epithelial organization and FOXP1 protein expression*

The "Postnatal" thymic samples, from 5 days-old to 1 year-old, showed typical morphology, with the surrounding connective capsule, trabeculae, cortical and medullary regions. With the exception of occasional individual fat cells in the interlobular areas, we did not detect thymic adipose tissue in these samples (Fig. 2 A1). Cytokeratin labelling pattern revealed the typical thin mesh distributed throughout the thymic cortex, and with more dense

medullary TEC (Fig. 2 B1). In the “Child/adolescent” group we detected considerable amount of organized adipose tissue embedded in interlobular areas. It is important to note that the cortex to medulla ratio is lower, thus the thymic lobes seem to possess relatively larger medullary areas and overall, smaller lobes (not shown). Anti-cytokeratin staining revealed a less organized, and thinner cortical epithelial structure and dominating medullary epithelium (not shown). In the “Adult” group intrathymic adipose tissue dominates, and no well-defined cortical and medullary regions could be distinguished (Fig. 2 A2). The cytokeratin organization is severely altered, and this becomes more profound with increasing age (Fig. 2 B2).

Since with qPCR we found significantly lower *FOXN1* gene expression in the “Adult” group compared to the younger groups of thymic samples, we tested and compared the expression of FOXN1 protein in samples from the “Postnatal” and “Adult” groups by immunofluorescence. We observed typical nuclear FOXN1 staining in the “Postnatal” group. FOXN1 positive cells were distributed in the cortex, although the majority of epithelial cells were negative, suggesting heterogeneity of thymic epithelium, with respect to FOXN1 expression (Fig. 2 C1). Surprisingly, no FOXN1 protein expression was detectable in samples from the “Adult” group, even though the thymic epithelium was clearly detectable (Fig. 2 C2).

### 3. *hTEC cell line, a model of aging thymic epithelium*

Recent reports indicate that thymocyte development is induced and supported by *Foxn1* transduced mouse fibroblast cells that trans-differentiate to functional thymic epithelium (18). Thymus derived epithelial cell lines and primary monolayers of TEC cultures do not induce full scale T cell development (45, 46), and this may be related to a decrease of FOXN1 expression (36, 47). A human TEC line, which express membrane proteins specific

for human TEC, is able to adhere to T cell precursors, immature and mature naïve T cells (32). We chose these TEC line for further investigations. In preliminary experiments, we found no *FOXN1* mRNA expression in these cells. Nevertheless, other tested thymic epithelium genes that are necessary for T cell development were present (not shown). Due to the lacking *FOXN1* expression, the striking gene expression pattern similarity with the aging human thymus, the hTEC line served as a model of the aging thymic epithelium here. Using this model we tested conditions that have been reported to induce FOXN1 expression (36, 47). First, we prepared three-dimensional (3D) cultures of hTEC and found that both conventional monolayer and 3D hTEC cultures expressed and maintained epithelial characteristics as ascertained by cytokeratin expression (Fig. 3A and 3B, respectively). However, neither conventional nor 3D cultures expressed detectable *FOXN1* transcripts, despite the fact that the 3D culture system based on microspherical substrate did function, since *DLL4* and *DLL1* transcripts were detectable and showed remarkable induction by the 3D culture conditions (Fig. 3C).

In thymus-derived primary epithelial cultures, LiCl, a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, beta-catenin stabilizer and canonical WNT4 signalling pathway inducer (48) did induce *Foxn1* transcription, which was accompanied by beta-catenin translocation to the nucleus (36). Here, we tested whether LiCl induced *FOXN1* transcription in TEC line. Upon exposure of hTEC cultures to LiCl treatment for 0 hrs, 6 hrs and for 18 hrs, characteristic morphological changes were observed, namely intensive cell spreading at 6 hrs and overgrowth, apoptotic aggregation of cell clusters at 18 hrs, with accompanied beta-catenin re-organization (Figs. 3E, 3G, 3I), which included detectable beta-catenin nuclear translocation at in the 6rh culture (Supplementary Fig. 1). As LiCl induced the expected biological response in hTEC, we tested FOXN1 expression using immunostaining and RT-PCR. The *FOXN1* gene remained silent, with no detectable FOXN1 protein in the cell



cultures (Fig. 3D, 3F, 3H), and no detectable transcripts produced in the control or in LiCl treated cultures (Fig. 3J).

#### 4. *FOXN1* genomic context of candidate CpG methylation substrate, C20

As the hTEC line was refractive to *FOXN1* transcriptional induction, we thought to investigate DNA methylation, a possible epigenetic silencing mechanism, in both hTEC line and human thymic stromal tissue. Based on reported DNA methylation data from ENCODE, we first identified several CpG methylation sites, potentially involved in transcriptional regulation of the *FOXN1* gene. In the ENCODE data set, there are 139 candidate residues for CpG methylation within the *FOXN1* gene. The candidate CpG residues are distributed in the promoter region, in exons 1, 2, 3, 7, 8, 9 and in introns 1, 2, 3, 6, 7 e 8. We chose two candidate regions to test differential methylation: (i) because of overlap with *FOXN1* regulatory regions, (ii) the high GC% context, (iii) the presence of a predicted CpG island and (iv) the abundant transcription factor binding consensus sequences (Fig. 4 and Supplementary Fig. 2). One selected region, a 259 bp-sequence located at the first *FOXN1* intron, was termed C20 (Fig 4. A), C20 is close to the predicted *FOXN1* promoter and it satisfies criteria for being “CpG methylation target” for gene expression regulation, such as high GC content and being within a CpG island. Specifically, the C20 sequence contains a simple repeat  $(CCCG)_{n=3}$  of 27 bp inside a CpG island of 100 bp-s. Experimental data from ENCODE demonstrated that C20 is located within regulatory regions defined by histone modifications and it is a part of the DNA-binding site cluster for RNA polymerase and the zinc-finger protein CTCF (*CCCTC-binding factor*, Fig. 4A). There are 13 potential CpG methylation sites in this genomic sequence (Fig. 4C). Remarkably, as deduced from the ENCODE database (40), 8 of the 13 CpG cytosine residues show differential methylation pattern with respect to *FOXN1* expressing human skin (24, 49) and *FOXN1* non-expressing human leukocytes (50) (Fig. 4E).

### 5. *FOXNI/C20* region CpG methylation status

We tested CpG methylation status of the 13 cytosine nucleotides of the C20 sequence by bisulfite conversion, followed by PCR fragment cloning and sequencing of 5-6 clones for each DNA samples from thymic stroma of a 5-day old thymic donor, a 59-yrs old thymic donor, and from hTEC line (Fig. 5). We observed an overall decrease in average of methylated CpG residues over time (Fig. 5D-E), with hTEC resembling the “old” thymic sample. Important to note that similar age dependent decrease of average CpG demethylation was observed in another region, we named DB2 (Fig. 3; supplementary material). Interpretation of methylation status of the *FOXNI* gene with respect to thymic epithelial cells is not possible due to cellular heterogeneity of the sample (because of the abundant thymocyte content the sample represents thymocytes, rather than stromal cells). However, we noted that the “old” thymic sample contained essentially two types of sequences, with low/medium level of methylation (4 sequences) or completely methylated (3 sequences) (Fig. 5B).

The “young” thymic sample did contain a large number of thymic lymphocytes as removal of all thymocytes from this tissue is not possible, while the “old” thymic stroma, as T cell development is largely arrested, contains only few lymphoid cells, thus this tissue sample essentially was composed of fibrotic and epithelial tissue. Residues 4 and 10 are almost completely methylated in the hTEC and in non-expressing leukocyte sample from the UCSC database (Fig. 5C and Fig. 4E, respectively) and this pattern is consistent with that of the lymphocyte dominated thymic stromal DNA sample of the 5 days-old donor.

## **Discussion**

Immunosenescence is a physiological process characterized by the decline of both adaptive and innate immune functions (51). The decreased ability to respond to antigens, at

least in human, is thought to be the result of decreasing naïve T cell export that ultimately limits peripheral T cell repertoire in adults (52). However, maintenance of oligoclonal naïve T cell numbers on periphery is thought to involve homeostatic proliferation (14, 53, 54). Naïve T-cells derive from the thymus; however, histological signs of thymic involution are evident already at the first year of life and, during aging, thymic interstitium and ultimately intrathymic TEC areas are infiltrated by adipose tissue and peripheral lymphoid cells resulting in decreased thymopoiesis, eventually limiting the peripheral naïve T cell pool (8, 16).

Little is known about the molecular mechanisms underlying thymic involution. Current reviews in the literature disagree whether thymic involution is organ autonomous: is it due exclusively to decreasing function of TECs, or in addition, does it involve changes in bone marrow derived stem cell activity and migration (15, 55)?

To address molecular mechanisms involved in human thymic involution during aging, first we tested gene expression levels of candidate genes in thymic biopsy specimen from day 5 to 78 years old (n=15) consented cardiac surgery patients and in a human TEC line (hTEC). We choose *DLL1*, *DLL4*, *FOXN1* and *WNT4* genes for the analysis as these genes have been reported to be necessary for inducing intrathymic T cell development in mouse models (17, 47, 56, 57). Particularly, *FOXN1* was selected because of reports indicating reduced expression in the mouse aged thymus (25) and because recently, Bredenkamp and co-workers (2014) (18) showed that mouse embryonic fibroblasts transfected with inducible mouse *Foxn1* support T cell development *in vitro* and *in vivo*. Moreover, critical pathways for thymic development involve NOTCH ligands and receptors. In mouse models it was demonstrated that *DLL1*, *DLL4*, *Jagged-1* (JAG-1) e *JAG-2* ligands are expressed on TEC with their receptors expressed on thymocytes (58-60). It is well established that *DLL4* produced by TEC is responsible for T cell lineage commitment, being necessary for the maintenance of the three dimensional architecture of the thymic microenvironment (47, 56, 61). Despite the broad range of studies on NOTCH and its ligands, little is known about their participation in thymic

involution, especially in the human thymus. In addition to the NOTCH family of ligands, we also evaluated *WNT4* gene expression. WNT4 glycoprotein is secreted and it is produced both by TEC and thymocytes (62). Moreover, in the mouse model, WNT4 was shown to play important role in organ development, T lymphocyte differentiation, and it was also associated with thymic involution (26, 57, 63, 64). The WNT4 glycoprotein also operates on TEC through induction of *Foxn1* expression in the mouse model (36). The decrease in the expression of FOXN1 has been studied as a hallmark of thymic senescence, although nothing is known on its expression in the human thymus during aging.

Quantitative PCR mediated gene expression experiments indicate that *DLL1* and *DLL4* are continuously expressed in the human thymus, with a significant increase in the “Adult” group of thymus donors. In contrast, studies in experimental mouse models showing a decrease in expression of *Dll4* in cortical TEC from old animals (30). However, it is possible that the observed high expression of *DLL1* and *DLL4* is related to the presence of adipocytes. In fact, *DLL4* expression has been reported in adipose tissue from human and animals subjected to high-fat diet (65). Nevertheless, due to their increasing expression, *DLL1* and *DLL4* are not likely to limit human thymopoiesis. Similarly to the NOTCH ligands, *WNT4* gene is transcriptionally active in the human thymus in all tested groups, with a slight increase in expression in the “Child-adolescent” thymus samples. Although gene expression studies from whole organ are not suitable to address cell type specific expression, we suggest that the soluble factor, WNT4 may be present in the aging thymus, thus WNT4 is not likely either to limit thymopoietic activity.

For the first time, we report here a striking three-fold decrease of *FOXN1* expression over time in the human thymus, comparing the “Postnatal” group with that of the “Adult” group. In fact, the decrease of TEC associated expression levels may be markedly higher, as due to the relatively lower lymphocyte content of the aging thymus, the relative abundance of TEC is increasing. We thus suggest that *FOXN1* expression may limit thymopoiesis and its

reduced expression may be responsible for thymic senescence. This notion is strongly supported by the fact that, although TECs are present in the samples of typical morphologically-defined aging thymus, FOXN1 protein were not detected in epithelial cells. This is also in keeping with recent reports indicating that inducible *Foxn1* expression in mouse embryonic fibroblasts mediates trans-differentiation to functional TEC (18), suggesting that, at least in mice, FOXN1 is necessary and seemingly sufficient to induce thymopoiesis. Key role of *FOXN1* gene in human thymopoiesis is likely as the phenotype of the *FOXN1* null mutant humans (24, 66) is very similar to that of the nude phenotype of homozygous *Foxn1* mutant mice and rats (21, 23). Moreover, thymic histology of *Foxn1* homozygous mutants strongly resembles that of thymic samples from aging individuals (27, 28).

To model age-related changes, we tested a human thymus derived epithelial cell line, for expression of *FOXN1*, *DLL1* and *DLL4* genes. Although the hTEC does bind to early thymocyte subsets, it does not induce or support full scale T cell development (32). We show here that hTEC line does not express *FOXN1*. Based on our findings, although *WNT4*, an inducer of *FOXN1* expression, is present in the aging human TEC, together with NOTCH ligands, human TEC seem to be resistant to FOXN1 induction. In fact, it was previously suggested that reduced *Wnt4* expression in the mouse thymus may be responsible for reduced *Foxn1* expression (26). If this was the case WNT pathway induction would restore FOXN1 expression in hTEC line. As we found no detectable *FOXN1* expression in cultured hTEC (although *DLL1* and *DLL4* gene expression was definitely detected) we tested whether these cells would respond to *stimuli* reported to induce FOXN1 expression. To this end, we used 3D culture conditions shown to induce for FOXN1 expression in TEC cultures (33) and LiCl treatment, which was also reported to induce downstream canonic pathway of WNT signaling, including *Foxn1* expression induction in murine TEC (36, 47). The hTEC line, perhaps similarly to human intrathymic aged TEC, did not respond to the tested specific

stimulatory signals for increasing FOXN1 expression. We therefore suggest that although WNT4 may regulate FOXN1 expression, it is via a regulatory mechanism, which requires *FOXN1* gene to be responsive for inductive signaling by WNT4. Thus, hTEC line and likely aging TEC are seemingly resistant to *FOXN1*-inducing *stimuli*. Among others, such resistance could be the result of transcriptional silencing, mediated by epigenetic mechanisms.

One of the most important epigenetic mechanisms that is often involved in transcriptional regulation during development is CpG methylation (67). As a first approach we tested candidate regions of the *FOXN1* gene by bisulfite conversion followed by DNA sequencing from young and old thymic samples, as well as hTEC line. The C20 candidate region, which is in a classical CpG island, provided inconsistent results with respect to the young thymic sample we tested. This is most likely due to the heterogeneous cellular composition, dominated by lymphocytes in the sample, in which the under-representation of TEC limits the analysis. On the other hand, FOXN1 expressing skin cells (24, 40, 49) show minimal methylation in 8 of the 13 candidate CpGs of the C20 region, while FOXN1 non-expressing leukocyte (40, 50) is highly methylated. The old thymic sample, which harbored minimal if any lymphocytes contained two types of dominating sequences, one hypomethylated and another completely methylated. While hTEC line DNA showed significantly elevated methylation compared to skin DNA from the database. In another region (DB2) and in C20 as well, the overall CpG methylation seemed to decrease with age, thus consistent with the age-dependent demethylation of CpG-s that has been reported (68-70), whereas the hypomethylated sequences in the old thymus may be the result of age-related demethylation of *FOXN1* in nonepithelial cells. Consequently, the fully methylated sequences may represent TEC-derived *FOXN1* gene. Such hypothesis is consistent with generally accepted paradigms of CpG related transcriptional de-regulation and silencing (67, 71). Although, the depth of the experiments and the heterogeneous tissue are severely limiting our conclusions, we suggest that developmentally regulated CpG methylation of *FOXN1* may be a

critical molecular mechanism behind thymic senescence and age related immunodeficiency. While our hypothesis needs further experimentation in more accessible models, with respect to the suggested role of *FOXN1* CpG methylation in thymic aging, the thymopoiesis limiting expression of *FOXN1* in the human thymic tissue is well supported by our data.

Further understanding of molecular mechanisms behind thymic senescence may open avenues for therapeutic modulation via small molecule drugs.

**Acknowledgements:** The authors acknowledge the assistance with immunofluorescence experiments, the stimulating discussions and the review of the manuscript to Istvan Ando (Department of Genetics, Biological Research Center, Szeged Hungary).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest

## References

1. Chinn, I. K., C. C. Blackburn, N. R. Manley, and G. D. Sempowski. 2012. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin. Immunol.* 24: 309-320.
2. Farley, A. M., L. X. Morris, E. Vroegindeweyj, M. L. Depreter, H. Vaidya, F. H. Stenhouse, S. R. Tomlinson, R. A. Anderson, T. Cupedo, J. J. Cornelissen, and C. C. Blackburn. 2013. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development* 140: 2015-2026.
3. Pfister, G., and W. Savino. 2008. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation* 15: 351-364.
4. Haynes, L., and A. C. Maue. 2009. Effects of aging on T cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 414-417.

5. World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance. Fact Sheet n°194. Cited in 02/15/2015. Available in <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
6. Fink, P. J., and D. W. Hendricks. 2011. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat. Rev. Immunol.* 11(8): 544-549.
7. Savino, W., D. A. Mendes-da-Cruz, J. S. Silva, M. Dardenne, and V. Cotta-de-Almeida. 2002. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* 23: 305-313.
8. Steinmann, G. G., B. Klaus, and H. K. Muller-Hermelink. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 22: 563-575.
9. Flores, K. G., J. Li, G. D. Sempowski, B. F. Haynes, and L. P. Hale. 1999. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.* 104: 1031-1039.
10. Savino, W., and M. Dardenne. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* 21: 412-443.
11. Shah, D. K., and J. C. Zuniga-Pflucker. 2014. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J. Immunol.* 192: 4017-4023.
12. Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14: 377-391.
13. Haynes, B. F., M. L. Markert, G. D. Sempowski, D. D. Patel, and L. P. Hale. 2000. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 529-560.
14. Douek, D. C., R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, M. A. Polis, A. T. Haase, M. B. Feinberg, J. L. Sullivan, B. D. Jamieson, J. A. Zack, L. J. Picker, and R. A. Koup. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396: 690-695.



15. Gui, J., X. Zhu, J. Dohkan, L. Cheng, P. F. Barnes, and D. M. Su. 2007. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int. Immunol.* 19: 1201-1211.
16. Aw, D., A. B. Silva, M. Maddick, T. von Zglinicki, and D. B. Palmer. 2008. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell* 7: 158-167.
17. Su, D. M., S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie, and N. R. Manley. 2003. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat. Immunol.* 4: 1128-1135.
18. Bredenkamp, N., S. Ulyanchenko, K. E. O'Neill, N. R. Manley, H. J. Vaidya, and C. C. Blackburn. 2014. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 16: 902-908.
19. Blackburn, C. C., and N. R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 278-289.
20. Nowell, C. S., N. Bredenkamp, S. Tetélin, X. Jin, C. Tischner, H. Vaidya, J. M. Sheridan, F. H. Stenhouse, R. Heussen, A. J. Smith, and C. C. Blackburn. 2011. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet.* 7: e1002348.
21. Boehm, T. 2008. Thymus development and function. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 178-184.
22. Nehls, M., D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, and T. Boehm. 1994. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372: 103-107.
23. Schüddekopf, K., M. Schorpp, and T. Boehm. 1996. The whn transcription factor encoded by the nude locus contains an evolutionarily conserved and functionally indispensable activation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 9661-9664.

24. Frank, J., C. Pignata, A. A. Panteleyev, D. M. Prowse, H. Baden, L. Weiner, L. Gaetaniello, W. Ahmad, N. Pozzi, P. B. Cserhalmi-Friedman, V. M. Aita, H. Uyttendaele, D. Gordon, J. Ott, J. L. Brissette, and A. M. Christiano. 1999. Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398: 473-474.
25. Ortman, C. L., K. A. Dittmar, P. L. Witte, and P. T. Le. 2002. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* 14: 813-822.
26. Kvell, K., Z. Varecza, D. Bartis, S. Hesse, S. Parnell, G. Anderson, E. J. Jenkinson, and J. E. Pongracz. 2010. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *PLoS One* 5: e10701.
27. Chen, L., S. Xiao, and N. R. Manley. 2009. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* 113: 567-574.
28. Sun, L., J. Guo, R. Brown, T. Amagai, Y. Zhao, and D. M. Su. 2010. Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell* 9: 347-357.
29. Zook, E. C., P. A. Krishack, S. Zhang, N. J. Zeleznik-Le, A. B. Firulli, P. L. Witte, and P. T. Le. 2011. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood* 118: 5723-5731.
30. Bredenkamp, N., C. S. Nowell, and C. C. Blackburn. 2014. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* 141: 1627-1637.
31. Romano, R., L. Palamaro, A. Fusco, L. Iannace, S. Maio, I. Vigliano, G. Giardino, and C. Pignata. 2012. From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clin. Dev. Immunol.* 2012: 467101.

32. Fernández, E., A. Vicente, A. Zapata, B. Brera, J. J. Lozano, C. Martínez, and M. L. Toribio. 1994. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood* 83: 3245-3254.
33. Golbert, D. C., E. Correa-de-Santana, M. Ribeiro-Alves, A. T. de Vasconcelos, and W. Savino. 2013. ITGA6 gene silencing by RNA interference modulates the expression of a large number of cell migration-related genes in human thymic epithelial cells. *BMC Genomics* 14 Suppl 6: S3.
34. Paraguassu-Braga, F. H., A. P. Alves, I. M. Santos, M. Bonamino, and A. Bonomo. 2012. An ectopic stromal implant model for hematopoietic reconstitution and in vivo evaluation of bone marrow niches. *Cell. Transplant.* 21: 2677-2688.
35. Staal, F. J., F. Weerkamp, M. R. Baert, C. M. van den Burg, M. van Noort, E. F. de Haas, and J. J. van Dongen. 2004. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J. Immunol.* 172: 1099-1108.
36. Balciunaite, G., M. P. Keller, E. Balciunaite, L. Piali, S. Zuklys, Y. D. Mathieu, J. Gill, R. Boyd, D. J. Sussman, and G. A. Holländer. 2002. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat. Immunol.* 3: 1102-1108.
37. Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
38. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.

39. Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler, and A. D. Haussler. 2002. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 12(6): 996-1006.
40. ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74.
41. Li, L. C., and R. Dahiya. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18: 1427-1431.
42. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
43. Bock, C., S. Reither, T. Mikeska, M. Paulsen, J. Walter, and T. Lengauer. 2005. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 21: 4067-4068.
44. Kumaki, Y., M. Oda, and M. Okano. 2008. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 36: W170-175.
45. Anderson, K. L., N. C. Moore, D. E. McLoughlin, E. J. Jenkinson, and J. J. Owen. 1998. Studies on thymic epithelial cells in vitro. *Dev. Comp. Immunol.* 22: 367-377.
46. Beaudette-Zlatanova, B. C., K. L. Knight, S. Zhang, P. J. Stiff, J. C. Zúñiga-Pflücker, and P. T. Le. 2011. A human thymic epithelial cell culture system for the promotion of lymphopoiesis from hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 39: 570-579.
47. Mohtashami, M., and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2006. Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J. Immunol.* 176: 730-734.

48. Stambolic, V., L. Ruel, and J. R. Woodgett. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* 6: 1664-1668.
49. Mandinova, A., V. Kolev, V. Neel, B. Hu, W. Stonely, J. Lieb, X. Wu, C. Colli, R. Han, M. J. Pazin, P. Ostano, R. Dummer, J. L. Brissette, and G. P. Dotto. 2009. A positive FGFR3/FOXN1 feedback loop underlies benign skin keratosis versus squamous cell carcinoma formation in humans. *J. Clin. Invest.* 119(10): 3127-3137.
50. Su, A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M. P. Cooke, J. R. Walker, and J. B. Hogenesch. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(16): 6062-6067.
51. Plowden, J., M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman, J. Katz, and S. Sambhara. 2004. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3: 161-167.
52. Fink, P. J. 2013. The biology of recent thymic emigrants. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 31-50.
53. Kilpatrick, R. D., T. Rickabaugh, L. E. Hultin, P. Hultin, M. A. Hausner, R. Detels, J. Phair, and B. D. Jamieson. 2008. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J. Immunol.* 180: 1499-1507.
54. den Braber, I., T. Mugwagwa, N. Vrisekoop, L. Westera, R. Mögling, A. B. de Boer, N. Willems, E. H. Schrijver, G. Spierenburg, K. Gaiser, E. Mul, S. A. Otto, A. F. Ruiters, M. T. Ackermans, F. Miedema, J. A. Borghans, R. J. de Boer, and K. Tesselaar. 2012. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity* 36: 288-297.
55. Boehm, T., and J. B. Swann. 2013. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat. Rev. Immunol.* 13: 831-838.

56. Koch, U., E. Fiorini, R. Benedito, V. Besseyrias, K. Schuster-Gossler, M. Pierres, N. R. Manley, A. Duarte, H. R. Macdonald, and F. Radtke. 2008. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* 205: 2515-2523.
57. Louis, I., K. M. Heinonen, J. Chagraoui, S. Vainio, G. Sauvageau, and C. Perreault. 2008. The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling. *Immunity* 29: 57-67.
58. Felli, M. P., M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino, and I. Screpanti. 1999. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int. Immunol.* 11: 1017-1025.
59. Fiorini, E., I. Ferrero, E. Merck, S. Favre, M. Pierres, S. A. Luther, and H. R. MacDonald. 2008. Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J. Immunol.* 181: 8199-8203.
60. Van de Walle, I., G. De Smet, M. Gartner, M. De Smedt, E. Waegemans, B. Vandekerckhove, G. Leclercq, J. Plum, J. C. Aster, I. D. Bernstein, C. J. Guidos, B. Kyewski, and T. Taghon. 2011. Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions. *Blood* 117: 4449-4459.
61. Hozumi, K., C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Hollander, D. T. Shima, and S. Habu. 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* 205: 2507-2513.
62. Weerkamp, F., M. R. M. Baert, B. A. E. Naber, E. E. L. Koster, E. F. E. de Haas, K. R. Atkuri, J. J. M. van Dongen, L. A. Herzenberg, and F. J. T. Staal. 2006. Wnt

- signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 3322-3326.
63. Pongracz, J., K. Hare, B. Harman, G. Anderson, and E. J. Jenkinson. 2003. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 33: 1949-1956.
  64. Osada, M., L. Jardine, R. Misir, T. Andl, S. E. Millar, and M. Pezzano. 2010. DKK1 mediated inhibition of Wnt signaling in postnatal mice leads to loss of TEC progenitors and thymic degeneration. *PLoS One* 5: e9062.
  65. Fukuda, D., E. Aikawa, F. K. Swirski, T. I. Novobrantseva, V. Kotelianski, C. Z. Gorgun, A. Chudnovskiy, H. Yamazaki, K. Croce, R. Weissleder, J. C. Aster, G. S. Hotamisligil, H. Yagita, and M. Aikawa. 2012. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109: E1868-1877.
  66. Pignata, C., M. Fiore, V. Guzzetta, A. Castaldo, G. Sebastio, F. Porta, and A. Guarino. 1996. Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am. J. Med. Genet.* 65: 167-170.
  67. Schubeler, D. 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517: 321-326.
  68. Romanov, G. A., and B. F. Vanyushin. 1981. Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochim. Biophys. Acta* 653: 204-218.
  69. Wilson, V. L., R. A. Smith, S. Ma, and R. G. Cutler. 1987. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.* 262: 9948-9951.
  70. Pogribny I.P. and Vanyushin B.F. 2010. Age-Related Genomic Hypomethylation. In *Epigenetics of Aging*. T.O. Tollefsbol, ed. Springer-Verlag, New York. p. 11-27.

71. Maegawa, S., G. Hinkal, H. S. Kim, L. Shen, L. Zhang, J. Zhang, N. Zhang, S. Liang, L. A. Donehower, and J. P. Issa. 2010. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* 20: 332-340.
72. Smit, A., R. Hubley, and P. Green. 2013-2015. RepeatMasker Open-4.0. Cited in 12/23/2014. Available in <http://www.repeatmasker.org>.

**Footnotes:**

<sup>1</sup> This work is supported by grants from FIOCRUZ, CAPES and CNPq/Science without Borders Program (Brazil) to Maria Danielma dos Santos Reis (MDS) and Laszlo Takacs (LT) (Grant n°: 240788/2012-5). The VÉD-ELEM: TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 grant (Hungary) supported LT's laboratory. MDS was a visiting research fellow at the Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Debrecen.

<sup>2</sup> Correspondence address: Dr. Laszlo Takacs, Department of Human Genetics, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, H-4032 Debrecen, Hungary. E-mail address: [TakacsL@med.unideb.hu](mailto:TakacsL@med.unideb.hu).



## Table and figure legends:

**Table I – Forward and reverse primer sequences used on the quantitative PCR and RT-PCR assays<sup>a</sup>**

Target	Sequence forward (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')	Amplicon size (pb)	Reference
<i>FOXN1</i> (NM_003593.2)	TCCCTCACTCACTGACTTCG (1628-1647)	GTGGCATCGAAGATGATGTC (1746-1727)	119	(72)
<i>DLL1</i> (NM_005618.3)	TGCAACCAGGACCTGAACTA (1323-1342)	CTCCGTTCTTACAAGGGCTG (1491-1472)	163	*
<i>DLL4</i> (NM_019074.3)	CAGAGTGTCGGATATCAGCG (2288-2307)	CTCCTGCCTTATACCTCCGT (2402-2383)	115	*
<i>WNT-4</i> (NM_030761.4)	CAGCAGAGCCCTCATGAACC (647-666)	GCCAGCACGTCTTTACCTCACA (768-747)	122	(73)
<i>HPRT-1</i> (NM_000194.2)	CCTGGCGTCGTGATTAGTG (183-201)	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC (320-301)	138	*
<i>TRFC</i> (NM_001128148.1)	CTAGTGTTCTTCTGTGTGGCAGTT (115-138)	ACAATGGTTCTCCACCAAACAAG (197-175)	83	*
<i>RPL13A</i> (NM_001270491.1)	CGGACCGTGCAGGTATGCT (244-263)	AGCAGGAACCACCATCCGCT (366-347)	123	*

<sup>a</sup> HPRT-1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), TRFC (transferrin receptor) and RPL13A (ribosomal protein L13a) were used as control housekeeping genes. (\*) Designed using the software, Primer3 available on the NCBI website (37). *FOXN1*: forkhead box N1; *DLL1*: Delta-like 1 (Drosophila); *DLL4*: Delta-like (Drosophila) 4; *WNT-4*: wingless-type MMTV integration site family, member 4.

**Figure 1: *DLL1*, *DLL4*, *FOXN1* and *WNT-4* gene expression in human thymic samples.**

Gene expression was assessed by real-time quantitative PCR. *DLL1* (A), *DLL4* (B), *FOXN1* (C) and *WNT-4* (D). The graphs show mean±SEM of normalized expression values from each group. Difference between the samples was analyzed through Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple test. (\*) indicates statistical difference ( $p<0.05$ ) between the groups.

**Figure 2: Histology, thymic epithelial organization and FOXN1 protein expression.**

Photomicrographs A1 and A2 show morphological aspects of thymus samples from five days ("Postnatal" group) and 57 years-old donors ("Adult" group), respectively. Paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin stain and analyzed by light microscopic examination. (4x, objective magnification). c= cortical region; m= medullary region; a= Adipose tissue; arrow= connective tissue septum. Panels A3 and A4 show cytokeratin staining of postnatal and adult thymic samples, respectively. Frozen thymus sections were reacted with specific pan anti-cytokeratin polyclonal rabbit antibody followed by Alexa-488 conjugated anti-rabbit Ig antibody (green) before visualization in the fluorescent microscope. (20x, objective magnification). Photomicrographs C1 and C2 show FOXN1 protein expression in thymus cryosections from "Postnatal" and "Adult" donors, respectively. In order to demonstrate thymic epithelium associated Foxn1 expression, the sections were first reacted with anti-human Foxn1 antibody (red) and subsequently double stained with pan anti-cytokeratin antibody (green). (20x, objective magnification).

**Figure 3: hTEC line, a model of aging thymic epithelium.**

Conventional hTEC monolayer culture (A) and hTEC 3D culture maintained for four days in cellulose macroporous scaffolds, immunocytochemical staining for cytokeratin with DAPI nuclear counterstaining. (20x, objective magnification). (B) qPCR detection of *FOXN1*, *DLL4* and *DLL1* transcripts, in

conventional monolayer and 3D cultures. Thymic stroma from 5 days of age donor served as control (“Stroma”), Undetectable level of expression is labelled with “\*”. (C) Conventional hTEC monolayer cultures stained with anti-human FOXN1 (red) (D-F) and anti- $\beta$ -catenin monoclonal antibody (green) with DAPI nuclear counterstain (G-I): non-treated control (D, E), LiCl-treated for 6 hrs (F, G) and 18 hrs (H, I). (40x objective magnification). RT-PCR detection of *FOXN1* transcript after treatment with 20 mM of LiCl for 6 and 18 hours. Non-treated cultures and TEC treated with 20mM of NaCl were used as negative controls. Legend – F: *FOXN1* amplification product; F (-) : reverse transcriptase reaction control without enzyme from *FOXN1* amplification product; H : *HPRT-1* amplification product; H (-) : reverse transcriptase reaction control without enzyme from *HPRT-1* amplification product (J).

**Figure 4: FOXN1 genomic context and potential methylation substrate C20.** Genomic localization of C20 region on *FOXN1* gene (A). Relative GC content, CpG island prediction, repetitive region (simple), histone modifications and transcriptional factor binding sites on C20 region (B, upper panel). Histone modifications and transcriptional factor binding sites were evaluated by ENCODE consortium laboratories using chromatin immunoprecipitation followed by DNA sequencing (40). The CpG island was predicted using MethPrimer web-based software (41) and the repetitive region was obtained in the *RepeatMasker* database (72). The C20 sequence (B, lower panel). In red, we show CpG residues. The arrows (> and <) indicate the forward and reverse specific bisulfate primers used for sequencing. The CpG island is underlined in black and yellow label marks the repetitive region. Methylation status of C20 region CpGs was obtained for FOXN1 expressing skin (C) and FOXN1 non-expressing leukocytes (D) from the ENCODE database on DNA Methylation by Reduced Representation Bisulfite Sequencing data provided by ENCODE/HudsonAlpha laboratory.

*FOXN1* gene graphic representation was copied from UCSC genome browser from the human genome assembly hg19 using “ENCODE regulation” track features (39, 40).

**Figure 5: FOXN1/C20 region CpG methylation status.** Percentage of CpG methylation, for each residue, in neonatal thymus (5 days-old) (**A**), old thymus (59 years-old) (**B**), and in hTEC cell line (**C**) clone sequences. Lower panels (**A-C**) show the 13 CpG-s presented as lollipop diagrams, where the methylated residue is shown in black, while the non-methylated residue is an open circle. Panel (**D**) represents the percent mean  $\pm$  SEM of CpG methylation per clone sequence for each sample and (**E**) shows the percent mean per each residue per sample expressed as small pie-charts in the lollipop diagrams. The black label represents the percent mean of methylated CpG and white label is marked for percent mean of unmethylated CpG. Percent values were obtained after multiple sequence alignment using ClustalW algorithm followed for methylated CpG quantification using *BiQ analyzer* software. Difference between the samples was analyzed through Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn’s multiple test.

**Figure 1:**

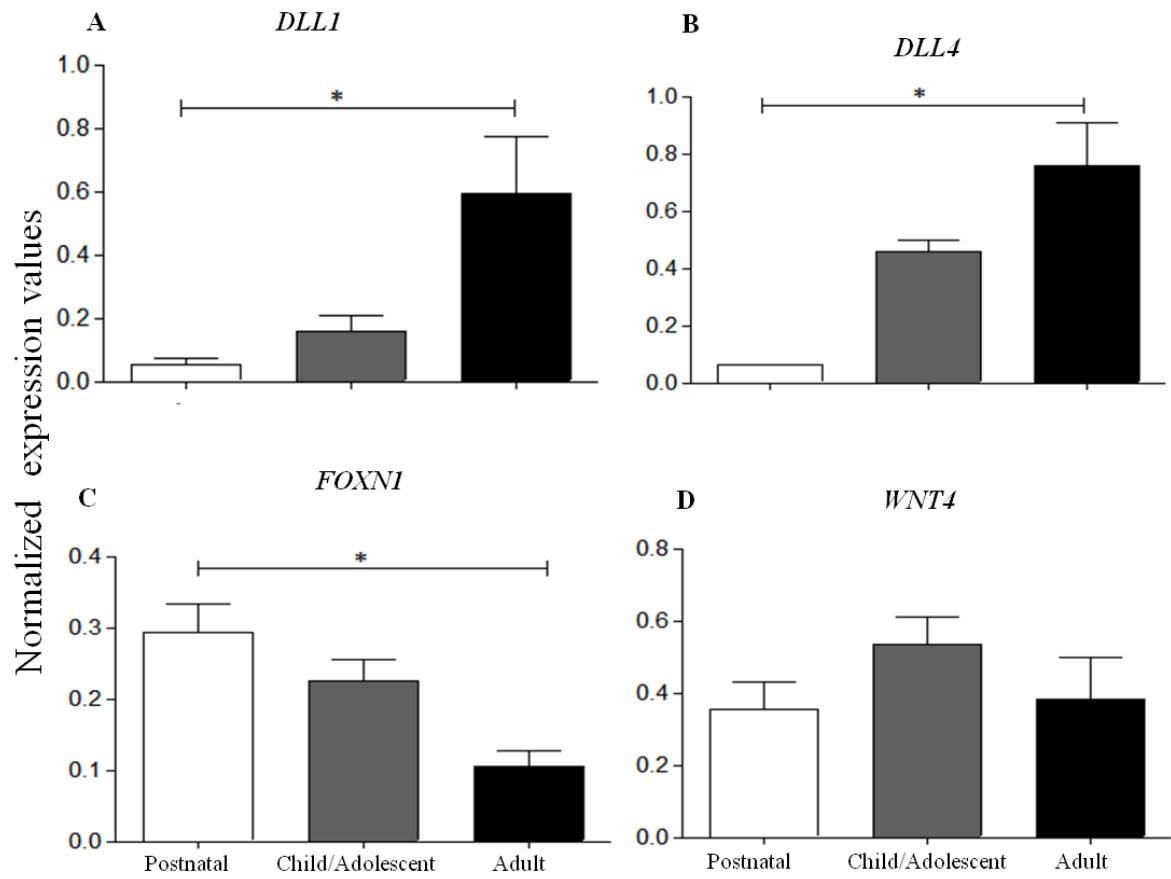
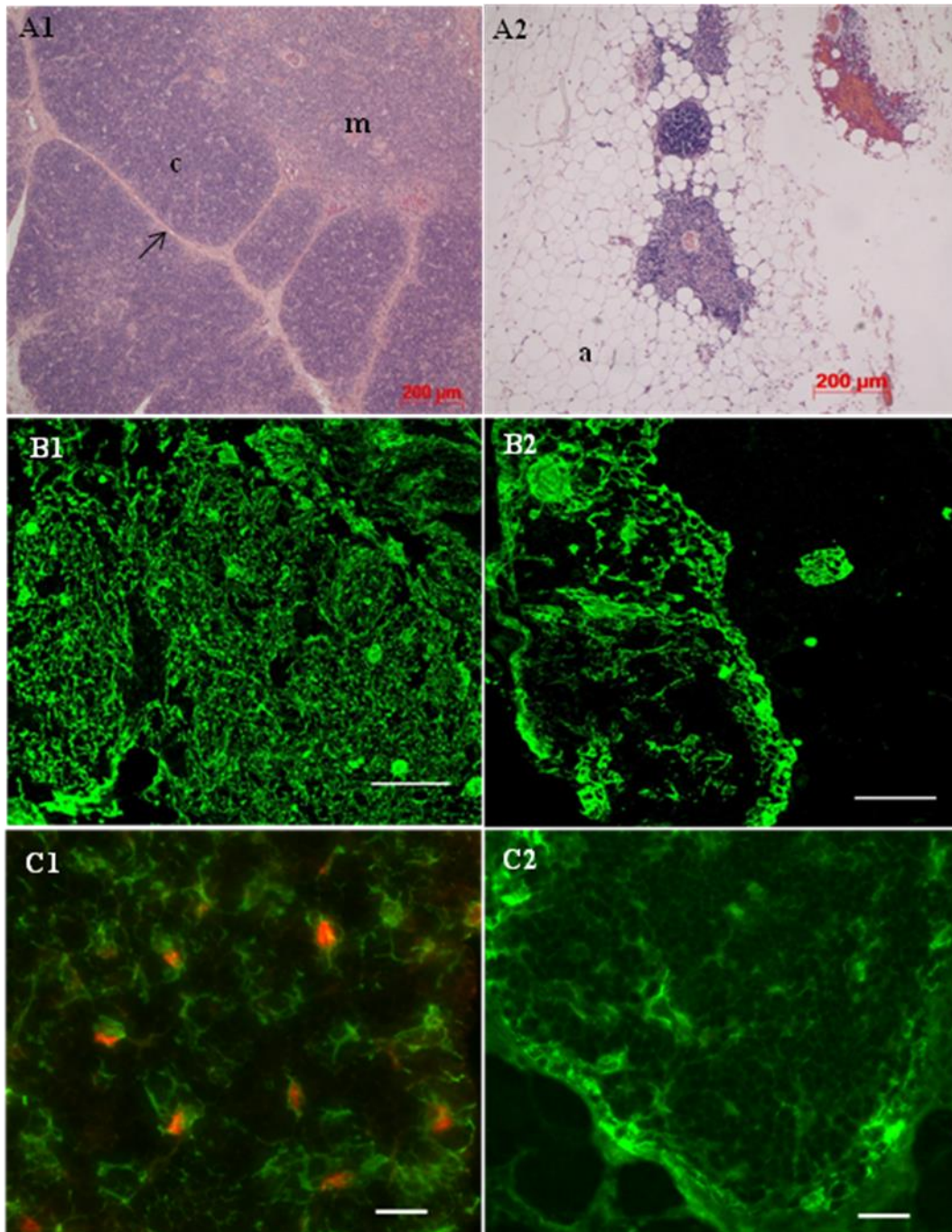
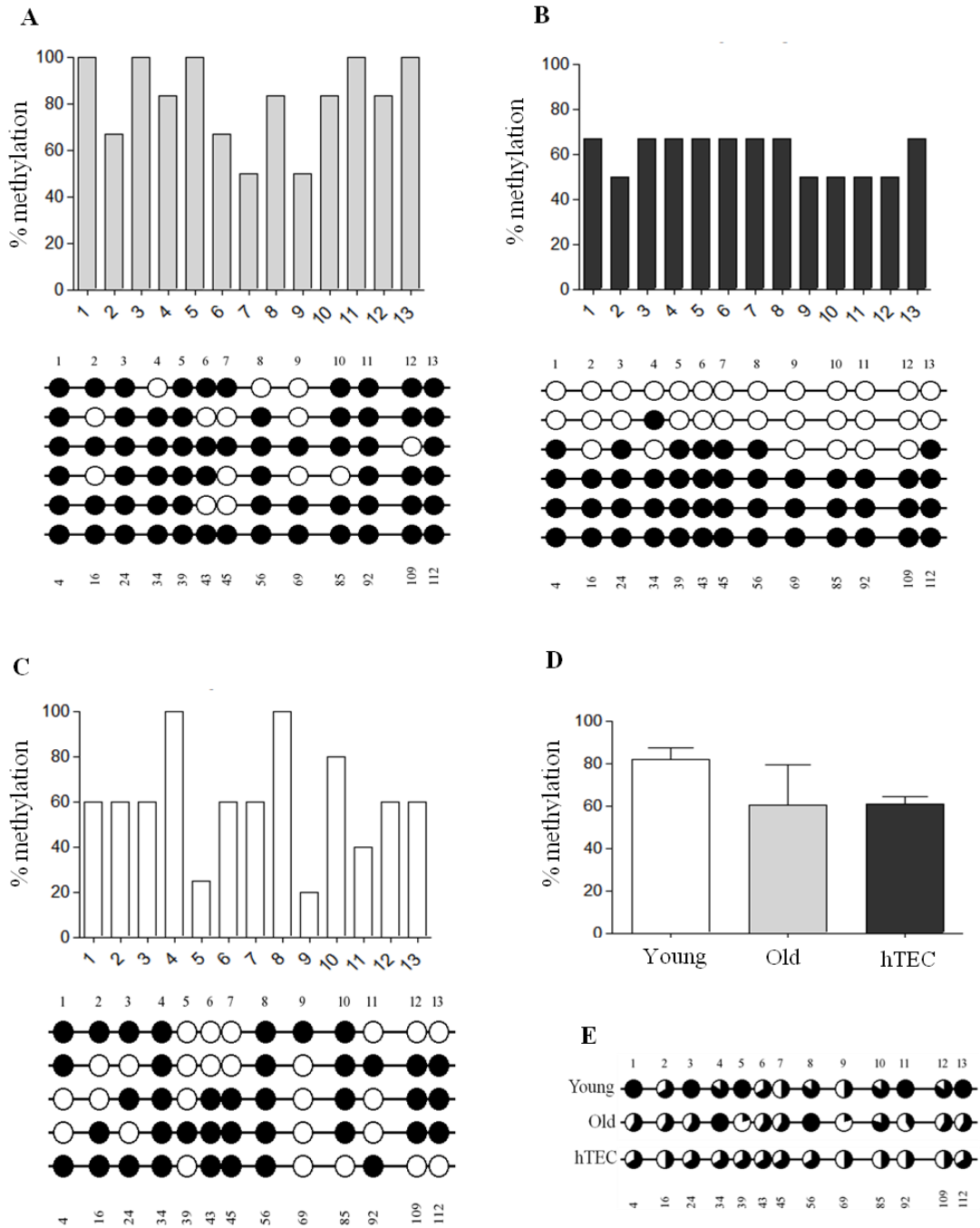


Figure 2:



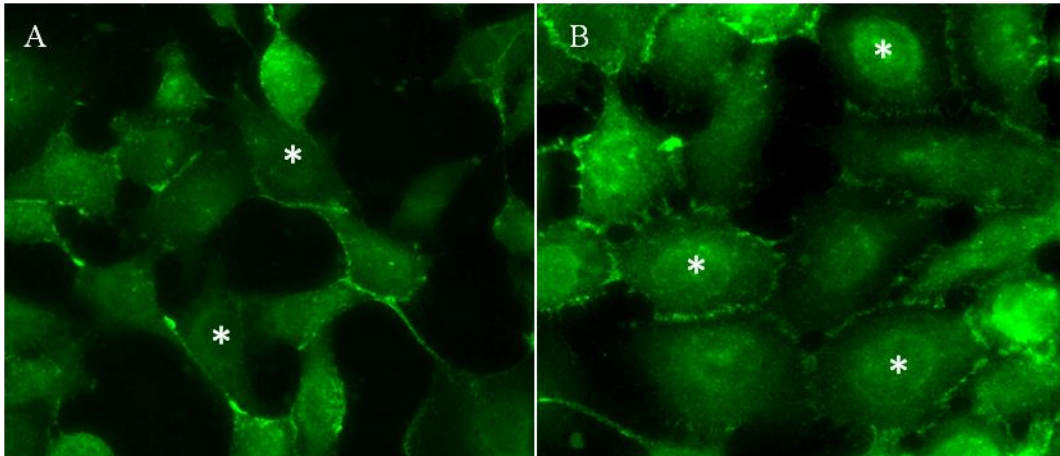


**Figure 5:**



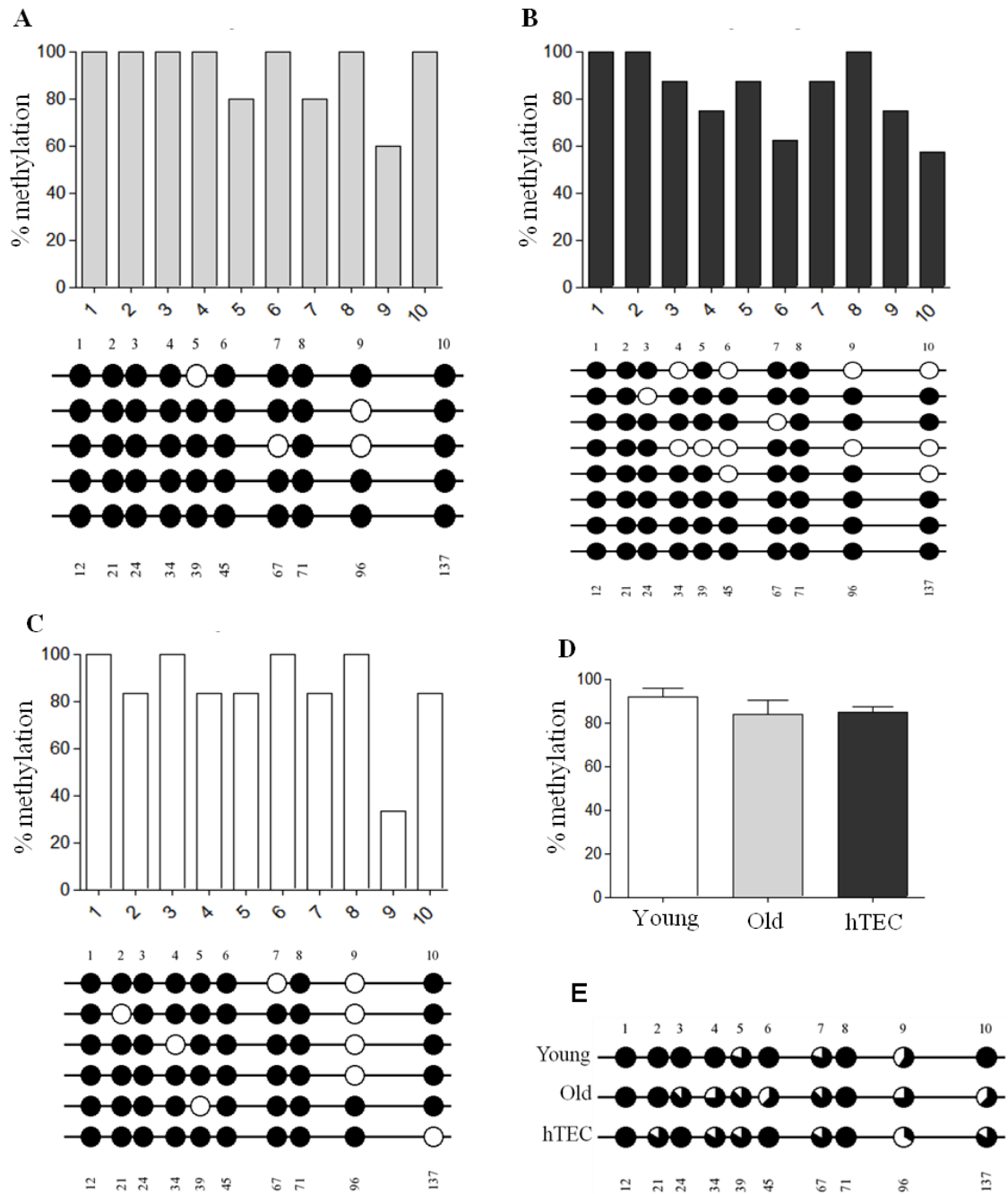


## Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1. Beta-catenin nuclear translocation in THPN after treatment with LiCl for 6h.** Non-treated TEC monolayer (A) and LiCl-treated cells (B) were incubated with a monoclonal anti- $\beta$ -catenin antibody followed by secondary reaction with Alexa 488 conjugated anti-mouse Ig antibody. (\*) beta-catenin staining in THPN nucleus. 40x primary magnification.





**Supplementary Figure 3: FOXN1/DB2 region CpG methylation status.** Percentage of CpG methylation, for each residue, in young thymus (5 days-old) (A) old thymus (59 years-old) (B) and THPN that of the cell line (C) clone sequences. Lower panels (A-C) show the 10 CpG-s presented as lollipop diagrams, where the methylated residue is shown in black, while the non-methylated residue is an open circle. (D) Represents the percent mean  $\pm$  SEM of CpG methylation per clone sequence for each sample and (E) shows the percent mean per each residue per sample expressed as small pie charts in lollipop diagrams. The black label

represents the percent mean of methylated CpG and white label is marked for percent mean of unmethylated CpG. Percent values were obtained after multiple sequence alignment using ClustalW algorithm followed for methylated CpG quantification using *BiQ analyzer* software. Difference between the samples was analyzed through Dunn's multiple test and Kruskal-Wallis non parametric test.