

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NÁVYLLA CANDEIA DE MEDEIROS

**INFLUÊNCIA DA PROLACTINA NOS COMPARTIMENTOS LINFOIDE E  
ESTROMAL DO MICROAMBIENTE TÍMICO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Salete Smaniotto

MACEIÓ-AL  
2020

NÁVYLLA CANDEIA DE MEDEIROS

**INFLUÊNCIA DA PROLACTINA NOS COMPARTIMENTOS LINFOIDE E  
ESTROMAL DO MICROAMBIENTE TÍMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Salete Smaniotto

MACEIÓ- AL

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos - CRB-4 - 2062

M488i Medeiros, Návylla Candeia de.  
Influência da prolactina nos compartimentos linfóide e estromal do  
microambiente tímico / Návylla Candeia de Medeiros. - 2020.  
90 f. : il. : figs. ; tabs. color.

Orientadora: Salete Smaniotto.  
Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas.  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 81-89.  
Anexo: f. 90.

1.Prolactina.2.Sistema imunológico. 3. Timo. I. Título.

CDU: 577.17: 612.438



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppccs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Návylla Candeia de Medeiros

Influência da prolactina nos compartimentos linfóide e estromal do  
microambiente tímico

Tese submetida ao corpo docente do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Alagoas e aprovada em 18  
de Fevereiro de 2020.

## Banca Examinadora

*Marvin Paulo Lins*

Prof. Dr. Marvin paulo Lins - (UNINASSAU)

*Lázaro Wender O. de Jesus*

Prof. Dr. Lázaro Wender Oliveira de Jesus - (UFAL)

*Klayza Moreira Ramos*

Prof.ª Dr.ª Klayza Moreira Ramos (UNCISAL)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (LBC/ICBS/UFAL), sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Salete Smaniotto.

Durante o trabalho contamos com o apoio financeiro dos órgãos: CNPq, CAPES e FAPEAL.

Dedico esta conquista a meus pais,  
Eustáquio (*in memoriam*) e Rúbia, que  
sempre serão minha maior força e inspiração  
para toda a vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos dessa árdua e edificante trajetória. Agradeço cada dia por toda fé, força, foco, perseverança e paciência que sempre estiveram comigo. Por isso, a Ti toda honra e glória.

À minha família, em especial a meus pais, Eustáquio (in memoriam) e Rúbia, que são grandes fortalezas em minha vida, pois estiveram sempre ao meu lado, em todos os momentos, fossem eles fáceis ou difíceis. Vocês são os grandes responsáveis por todas as vitórias e conquistas da minha vida, dando-me apoio, carinho e compreensão sempre que precisei, fazendo-me uma pessoa mais forte e determinada.

Gratidão a meu pai Eustáquio, por ter me apoiado até o último momento de sua vida, o senhor quase conseguiu está comigo até o final desse nosso sonho, mas tenho certeza que o senhor não saiu do meu lado um só segundo, desde que se foi. Consigo sentir sua presença comigo e sua felicidade em meus sonhos por esta conquista. Gratidão a minha mãe Rúbia, que sempre foi meu espelho de força e perseverança e que sempre se fez presente em minha vida, em todos os aspectos, me ensinando a ler e escrever (como grande professora que é), antes mesmo de eu ter entrado na escola e até hoje me estimulando a concluir esse sonho que não é só meu, é nosso. Gratidão também a minha irmã Thays, que sempre acreditou na minha força de vontade e dedicação, me estimulando a conseguir finalizar esta etapa da minha formação. A vocês, todo o meu amor e gratidão para sempre. Grata por existirem. Amo vocês!

A minha orientadora, prof. Salete Smaniotto, pela competência na qual exerce seu trabalho, pela oportunidade que me deu de realizar uma das etapas mais importantes da minha vida profissional, por todos os ensinamentos e paciência comigo ao longo de todos esses anos. A senhora minha gratidão, consideração e admiração por toda a vida.

Aos meus tios, em especial, José e Marinalda, por toda ajuda, força e carinho desde meu primeiro dia de aula na escola até hoje. Também as tias Rosélia, Verônica e Maria pela torcida de sempre em todos os momentos da minha vida. E a meus primos que são meus grandes amigos e incentivadores, em especial: Catarinne, Taciana e Aninha. A vocês todo o meu amor.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde que colaboraram intensamente para a realização desse grande sonho. Em especial aos que tenho carinho e admiração profunda: Emiliano, Alexandre Danielma e Janylle, que além de abrirem as portas do Laboratório de Biologia Celular (LBC) para mim ainda em 2012, contribuíram imensamente no meu processo de aprendizagem.

À família LBC, grandes amigos, que foram e são minha família alagoana desde que sai de Patos-PB e cheguei a Maceió-AL. São pessoas que sempre se preocuparam com meu bem-estar, seja aconselhando-me ou ajudando em cada experimento. Foi muito gratificante poder contar com cada um de vocês e dividirmos várias histórias ao longo dessa jornada: Fernanda, Clarice, Marvin, Larissa, Rebeqa, Tales, Janylle, Lilian, Julianderson, Fagner, Felipe, Polliane, Jordana, Juliane, Carol, Karen, Jennifer, Elisa, Keyla, Camila, Jaqueline, Thayana, Liliane, Rayane, Noé, Rafael, Paulinho, Dandara, Mirelle, Jennifer Lorrane, Everlaine, Beatriz, Ruan, Virgílio e Euler. A vocês toda minha gratidão.

Em especial a meus grandes amigos. Fernanda Lima e Tales que estiveram comigo em todos os momentos como verdadeiros irmãos e me presentearam também com suas lindas famílias que me dão tanto amor. Larissa e Rebeqa, por todos os conselhos e amizade incondicional que levarei por toda a vida. A Janylle por toda amizade e ensinamentos ao longo desses anos. A Patrícia, Raquel, Ingrid e Vânia, por todo apoio e palavras de incentivo. Aos demais amigos que a UFAL me trouxe: Igor, Ana Luiza, Fernanda, Yngrid, Mykaella e Evelin. A vocês, meus amigos, todo meu amor, amizade e gratidão para sempre. Grata por existirem. Amo vocês!

E aos demais amigos com quem levo um laço de amizade para toda a vida: Priscila Vasconcelos, Thiago Hanney, Larissa Karine, Gisele Braz, Aurélio Couto, Andreza e Valéria, também dedico essa vitória. Grata pela torcida, amizade e compreensão de uma vida que temos juntos. Obrigada por terem se feito tão presentes mesmo estando longe fisicamente. A vocês todo meu amor.

A Universidade Federal de Alagoas, por seu apoio institucional.

Aos órgãos de fomento, CNPq, Capes e FAPEAL, pelo apoio financeiro que proporcionaram a concretização desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse sonho, a vocês dedico os meus sinceros agradecimentos.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.

Mahatma Gandhi

## RESUMO

Várias evidências mostram que a prolactina (PRL) além dos seus efeitos clássicos no desenvolvimento mamário e lactação, possui ações sobre o sistema imune, incluindo efeitos pleiotrópicos sobre o timo. Neste sentido, objetivou-se avaliar a influência da PRL nos compartimentos linfóide e estromal do microambiente tímico. Para o estudo foram utilizadas cultura primária de células estromais tímicas de camundongos (CETc), células epiteliais tímicas (TECs)/linhagem 2BH4 e camundongos fêmeas lactantes. Inicialmente, por imunofluorescência, foi observada a presença de células epiteliais medular e cortical na cultura primária de CETc. Sobre a viabilidade de timócitos e TECs (linhagem 2BH4), observou-se que a PRL, em todas as concentrações testadas (10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL) manteve a viabilidade das TECs e aumentou a viabilidade dos timócitos, sendo então escolhida a concentração de 10 ng/mL para o desenvolvimento do estudo. Por imunofluorescência, foi constatado que o tratamento com PRL aumentou a deposição de laminina em CETc e TECs, porém não foi capaz de alterar a deposição de fibronectina. Ainda, a PRL aumentou a expressão da quimiocina CXCL12 em CETc e em TECs. Em relação ao citoesqueleto, o tratamento com PRL foi capaz de alterar a polimerização da F-actina em CETc, enquanto as TECs passaram a apresentar complexos de adesão focal. Por citometria de fluxo, foi observado que a PRL não interferiu na expressão das integrina VLA-5 e VLA-6 em timócitos. Entretanto, aumentou a expressão do receptor para quimiocina, o CXCR4, em timócitos totais, duplo positivo e CD4<sup>+</sup>. Na adesão celular, quando as CETc foram pré-tratadas com PRL, ocorreu um aumento no número de timócitos totais e, das subpopulações duplo positivo e CD8<sup>+</sup> aderidos em sua superfície. Entretanto, a adesão não foi alterada quando as TECs foram pré-tratadas com PRL. No ensaio de migração de timócitos em câmaras de *transwell* frente as CETc e TECs pré-tratadas com PRL e na presença de CXCL12 como fator quimioatraente, evidenciou-se que a PRL potencializou o efeito quimiotático da CXCL12 na migração de timócitos totais e das subpopulações duplo positivo e CD8<sup>+</sup>. Por fim, foram avaliados timos de fêmeas lactantes e foi observado um aumento na expressão da CXCL12 no microambiente tímico das lactantes. Porém, a expressão de CXCR4 na superfície dos timócitos não foi alterada. Na migração celular, foi constatado que timócitos de fêmeas lactantes apresentaram aumento na capacidade migratória quando comparado ao controle e a migração foi potencializada frente a CXCL12. Por citometria de fluxo, verificou-se que este aumento no número de células migrantes, ocorreu principalmente nos timócitos duplo positivo e CD8<sup>+</sup>. Em conjunto, os dados obtidos no estudo demonstram o efeito da PRL sobre as células estromais tímicas e timócitos, em especial nos processos de adesão e migração celular, colocando este hormônio como um potencial regulador da fisiologia tímica.

**Palavras-chaves:** Prolactina, timo, CXCL12, migração.

## **Prolactin influence on stromal and lymphoid compartments of thymic microenvironment**

Prolactin (PRL), besides its classic effects on breast development and lactation, several shreds of evidence show its actions on the immune system, including pleiotropic effects on the thymus. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of PRL in the lymphoid and stromal compartments of the thymic microenvironment. For the study, we used the primary culture of mouse thymic stromal cells (TSC), thymic epithelial cell line (TECs) and lactating female mice. Initially, the effect of prolactin on the thymocytes viability and thymic epithelial cells was demonstrated, it was observed that PRL at all concentrations tested (10, 50, 100, 500 and 1000 ng/mL) was not capable to decrease cell viability, based on this data the concentration of 10 ng/mL was chosen for the development of the study. The immunofluorescence showed the presence of medullary and cortical epithelial cells in the primary culture of TSC. The PRL treatment was able to increase laminin, on the other hand, did not alter fibronectin deposition in TSCs, this increase was also observed in laminin deposition in TECs. Besides, PRL also increased CXCL12 chemokine expression in TSC and TECs. Also, PRL treatment was able to alter F-actin polymerization in TSCs as the TEC began to present filopod. By flow cytometry, it was observed that PRL did not interfere in the expression of the integrins VLA-5 and VLA-6 in thymocytes. However, the treatment increased the expression of the chemokine receptor CXCR4, in total, double-positive and CD4<sup>+</sup> thymocytes. In the cell adhesion, when TSCs were pretreated with PRL, there was an increase in the number of total thymocytes and the double-positive and CD8<sup>+</sup> subpopulations that adhered to their surface. However, adherence was not altered when TECs were pretreated with PRL. In the transwell chamber, the thymocyte migration assay against PRL-pretreated TSC and in the presence of CXCL12 as a chemoattractant factor, it was found that PRL and chemokine CXCL12 alone or in combination increased the migration of total and the subpopulation of double-positive and CD8<sup>+</sup> thymocytes. Finally, lactating female thymus was evaluated and was observed an increase in CXCL12 expression in the lactating thymic microenvironment. However, CXCR4 expression on the thymocyte surface was not altered. In cell migration, it was found that thymocytes of lactating females showed an increase in migratory capacity when compared to control and migration was potentiated against CXCL12. By flow cytometry, it was found that this increase occurred mainly in double-positive and CD8<sup>+</sup> thymocytes. Together, the data obtained in the study demonstrate the effect of PRL on thymic stromal cells and thymocytes, especially in the adhesion and cell migration processes, placing this hormone as a potential regulator of thymic physiology.

**Keywords:** prolactin, thymus, CXCL12, migration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos morfológicos do timo.....	22
Figura 2	Representação esquemática da migração intratímica de linfócitos T e do microambiente tímico.....	23
Figura 3	Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos e do microambiente tímico.....	29
Figura 4	Interações imuno-neuro-endócrinas no timo.....	32
Figura 5	Vias endócrina, parácrina e autócrina relacionadas aos efeitos da PRL nas células tímicas. ....	35
Figura 6	Células estromais tímicas.....	38
Figura 7	Caracterização das células estromais tímicas.....	39
Figura 8	Caracterização das células epiteliais tímicas presentes nas CETc.....	46
Figura 9	Viabilidade de timócitos e de células epiteliais tímicas após tratamento com prolactina.....	47
Figura 10	A prolactina não altera a deposição de fibronectina por células estromais tímicas. ....	49
Figura 11	A prolactina não altera a deposição de fibronectina por células epiteliais tímicas.....	50
Figura 12	A prolactina aumenta a deposição de laminina por células estromais tímicas.....	51
Figura 13	A prolactina não altera a deposição de laminina por células epiteliais tímicas.....	52
Figura 14	A prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células estromais tímicas.....	54
Figura 15	A prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células epiteliais tímicas.....	55
Figura 16	Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células estromais tímicas.....	56
Figura 17	Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células epiteliais tímicas.....	57
Figura 18	Efeito da prolactina na expressão da integrina VLA-5 na	

	superfície de timócitos totais e suas subpopulações.....	58
Figura 19	Efeito da prolactina na expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos totais e suas subpopulações.....	59
Figura 20	Efeito da prolactina na expressão do CXCR4 em timócitos.....	60
Figura 21	A prolactina estimula a adesão de timócitos às células estromais tímicas.....	61
Figura 22	A prolactina não altera a adesão de timócitos às células epiteliais tímicas.....	62
Figura 23	Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente as células estromais tímicas.....	65
Figura 24	Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente as células epiteliais tímicas.....	66
Figura 25	Expressão da quimiocina CXCL12 no microambiente tímico de camundongos fêmeas lactantes.....	68
Figura 26	Expressão da quimiocina CXCR4 em timócitos de camundongos fêmeas lactantes.....	69
Figura 27	Efeito da lactação na migração de timócitos frente a quimiocina CXCL12.....	71
Figura 28	Representação esquemática dos resultados.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados e seus respectivos fluorocromos	41
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2BH4- linhagem murina de células epiteliais tímicas
- APC- alofococianina (*allophycocyanin*)
- BSA- albumina sérica bovina (*bovine serum albumine*)
- C57BL/6- linhagem de camundongos, Black C57
- CCL- quimiocina do tipo C-C (C-C chemokine receptor)
- CCR- receptor de quimiocina do tipo C-C (C-C chemokine receptor)
- CD- marcadores de superfície celular (*clusters of differentiation*)
- CD4SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>)- tímócito simples-positivo para a molécula CD4
- CD8SP (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)- tímócito simples-positivo para a molécula CD8
- CEUA- comissão de ética no uso de animais
- CETc- Célula estromal tímica de camundongo
- cTEC- célula epitelial tímica cortical (*cortical thymic epithelial cells*)
- CTR- grupo controle
- CXCL- quimiocina do tipo C-X-C (C-X-C motif chemokine)
- DC- células dendríticas (*dendritic cells*)
- DMSO- dimetilsulfóxido
- DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)- tímócito duplo-negativo para as moléculas CD4 e CD8
- DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)- tímócito duplo-positivo para as moléculas CD4 e CD8
- EDTA- etilenodiamino tetra-acético
- EpCAM- molécula de adesão de célula epitelial (*epithelial cell adhesion molecule*)
- EPM- erro padrão da média
- FITC- isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FN- fibronectina
- GAR- anticorpos de cabra contra coelho (*goat anti rabbit*)
- GH- hormônio do crescimento (*growth hormone*)
- HUVEC: célula endotelial da veia umbilical humana (human umbilical vein endotelial cell)
- Ig- imunoglobulina
- IL- interleucina (*interleukin*)
- JAK- Janus quinase
- LFA-1: antígeno-1 associado a função do linfócito (lymphocyte function-associated antigen 1)

LM- laminina

MEC- matriz extracelular

MHC- complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibility complex)

mTEC- célula epitelial tímica medular (medullary thymic epithelial cells)

MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NK- células natural killer

PBMC: células mononucleadas de sangue periférico humano (peripheral blood mononuclear cell)

PBS- solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline)

PE- ficoeritrina (phycoerythrin)

PerCP- proteína peridinina de clorofila (peridinin-chlorophyll-a-protein)

PRL- prolactina

PRLr- Receptor de prolactina

RPMI- meio de cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute.

SBF- soro bovino fetal

SDF-1- fator-1 derivado de célula estromal

STAT- proteína transdutora de sinais e ativadora de transcrição (Signaling Transducer and Activator of Transcription)

TCR- receptor de células T (T cell receptor)

TECs- células epiteliais tímicas (thymic epithelial cells)

TNC- célula nurse tímica (thymic nurse cell)

VLA- antígeno de aparecimento tardio (very late antigen)

VLA-4-  $\alpha 4\beta 1$  ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina

VLA-5-  $\alpha 5\beta 1$  ou CD49e/CD29, receptor de fibronectina

VLA-6-  $\alpha 6\beta 1$  ou CD49f/CD29, receptor de laminina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
3.1	Timo.....	21
3.1.1	Aspectos gerais.....	21
3.1.2	Microambiente tímico.....	23
3.1.3	Diferenciação intratímica de linfócitos $T\alpha\beta$ .....	28
3.2	Controle neuroendócrino do timo.....	30
3.3	Prolactina.....	33
3.3.1	Prolactina e sistema imune.....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	Animais.....	37
4.2	Cultura primária das Células Estromais Tímicas (CET).....	37
4.3	Cultura de células epiteliais tímicas (TECs).....	39
4.4	Obtenção dos timócitos .....	39
4.5	Tratamento com Prolactina (PRL) .....	40
4.6	Ensaio de Viabilidade Celular.....	40
4.7	Ensaio de citometria de fluxo.....	41
4.8	Ensaio de imunofluorescência.....	42
4.8.1	Imunocitoquímica.....	42
4.8.2	Imunohistoquímica.....	43
4.9	Marcação direta para citoesqueleto de F-actina.....	43
4.10	Ensaio de adesão celular.....	44
4.11	Ensaio de migração celular.....	44
4.11.1	Migração frente as células estromais tímicas.....	44
4.11.2	Migração frente à quimiocina.....	45
4.12	Análise estatística.....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>

5.1	Identificação de células epiteliais no estroma tímico.....	46
5.2	Efeito da prolactina sobre a viabilidade de timócitos e células epiteliais tímicas.....	47
5.3	A prolactina modula a deposição de moléculas de matriz extracelular por células estromais (CETc) e células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4.....	48
5.4	A Prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células estromais e células epiteliais tímicas.....	52
5.5	Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células estromais e células epiteliais tímicas.....	56
5.6	Efeito da prolactina sobre a expressão da integrina VLA-5 e VLA-6 em timócitos.....	57
5.7	Efeito da prolactina na expressão do CXCR4 em timócitos.....	60
5.8	Efeito da prolactina sobre a adesão de timócitos às células estromais e células epiteliais tímicas.....	61
5.9	Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente as células estromais e epiteliais tímicas.....	63
5.10	Expressão da quimiocina CXCL12 no microambiente tímico de camundongos fêmeas lactantes.....	67
5.11	Expressão de CXCR4 em timócitos de camundongos fêmeas lactantes.....	68
5.12	Efeito da lactação na migração de timócitos frente a quimiocina CXCL12.....	70
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
9.1	Anexo 1: Comissão de Ética no Uso de Animais- projeto nº 14/2015.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

O timo é um órgão linfóide primário, que fornece um microambiente especializado para o desenvolvimento de linfócitos T. No timo, precursores derivados da medula óssea passam por um complexo processo de diferenciação, que envolve a expressão sequencial de várias proteínas de membrana e o rearranjo dos genes que codificam o receptor de célula T (TCR). O produto final interage com as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) junto a peptídeos, expressos pelas células do microambiente tímico (MILLER, 1961; CIOFANI; ZUNIGA-PFLUCKER, 2007; ZDROJEWICZ ; PACHURA; PACHURA, 2016).

O microambiente tímico é constituído por uma rede tridimensional de células estromais formado por células epiteliais tímicas (TECs), macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos; por componentes solúveis tais como citocinas, quimiocinas e hormônios; e ainda, por moléculas de matriz extracelular (MEC). Este microambiente fornece os sinais necessários para a migração, proliferação, sobrevivência e apoptose de timócitos durante todo o processo de diferenciação de linfócitos T (SAVINO et al., 2004; PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; NITTA; SUZUKI, 2016).

Várias evidências mostram que a fisiologia do timo e a diferenciação de linfócitos T está sob um complexo controle neuroendócrino. Sabe-se por exemplo, que prolactina (PRL), hormônio do crescimento (GH), glicocorticoides e hormônios tireoidianos estimulam a secreção de timulina e a expressão de moléculas MEC, como fibronectina, laminina e colágeno IV, por células estromais tímicas (LANNES-VIEIRA; DARDENNE; SAVINO, 1991; VILLA-VERDE et al., 1995; SMANIOTTO et al., 2005). Além disso, o hormônio tireoideano aumenta a migração de timócitos (RIBEIRO-CARVALHO et al., 2007) e a PRL aumenta a proliferação de TECs de camundongos (DARDENNE et al., 1989). Ainda, a PRL induz a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos progenitores linfóides (CARREÑO et al., 2005).

A PRL é um hormônio lactogênico que funciona como um importante mediador da resposta imunoneuroendócrina, sendo sintetizado e secretado pelas células da glândula hipófise anterior (KELLEY et al., 2007). O receptor da PRL (PRLR) é membro da maior classe de receptores, conhecidos como a

superfamília de receptores de citocinas de classe 1, que corresponde a mais de 20 membros diferentes (GOFFIN et al., 1998).

Além da hipófise anterior, a PRL também é produzida em locais extra-hipofisários, incluindo neurônios e as células do sistema imune, principalmente os linfócitos (BEN-JONATHAN et al., 1996; BOLE-FEYSOT et al., 1998; MONTGOMERY, 2001) e portanto, pode atuar tanto como um hormônio, através da via clássica endócrina; e ainda como um fator de crescimento, neurotransmissor ou imunorregulador, de forma autócrino-parácrina (MÉNDEZ et al., 2005).

A análise crítica dos dados publicados na literatura sobre os efeitos da prolactina no microambiente tímico, mostra que questões relevantes para o entendimento da fisiologia tímica ainda não foram respondidas. Interessados em contribuir para o estudo do controle neuroendócrino sobre o timo, para um melhor delineamento de estratégias terapêuticas baseadas em prolactina, que poderão ser utilizadas em condições de imunodeficiência, investigamos a influência desse hormônio em compartimentos linfóide e estromal do microambiente tímico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência da prolactina nos compartimentos linfóide e estromal do microambiente tímico.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Analisar o efeito da prolactina na viabilidade celular;
2. Analisar a expressão de moléculas de matriz extracelular e da quimiocina CXCL12 em células estromais tímicas após tratamento com prolactina;
3. Analisar receptores de matriz extracelular e da quimiocina CXCL12 em timócitos após o tratamento com prolactina;
4. Analisar a organização do citoesqueleto nas células estromais tímicas após o tratamento com prolactina;
5. Verificar o efeito da prolactina sobre a adesão de timócitos às células estromais tímicas;
6. Analisar a migração de timócitos frente a células estromais tímicas tratadas com prolactina e na presença de quimiocina CXCL12.
7. Verificar a expressão da quimiocina CXCL12 no timo de fêmeas lactantes;
8. Analisar receptor de quimiocina CXCR4 em timócitos obtidos de fêmeas lactantes;
9. Analisar a migração de timócitos obtidos de fêmeas lactantes na presença de quimiocina CXCL12.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Timo

##### 3.1.1 Aspectos gerais

O timo é um órgão de extrema importância para o sistema imunológico, pois atua no mecanismo de defesa do corpo, fornecendo vigilância e proteção contra diversos patógenos, tumores, antígenos e mediadores de danos teciduais (THAPA; FARBER, 2019). Constitui o primeiro dos órgãos linfoides a ser formado em roedores, durante a embriogênese e cresce consideravelmente após o nascimento, em resposta à estimulação pós-natal de antígenos e à demanda por um grande número de células T maduras (PEARSE, 2006).

Com sua origem endodérmica, o timo se desenvolve a partir do terceiro e quarto pares de bolsas faríngeas, que tem como período mais crítico de seu crescimento, entre 7 e 14 semanas da gestação (KUPER et al., 2016). Em humanos, este órgão linfóide cresce a partir do nascimento, atingindo seu peso máximo (30-40 g) aos 2-3 anos de idade e posteriormente, na puberdade, começa a envolver em resposta a variação dos hormônios sexuais, chegando a pesar cerca de 6 g em pessoas idosas com mais de 70 anos (CSABA, 2016).

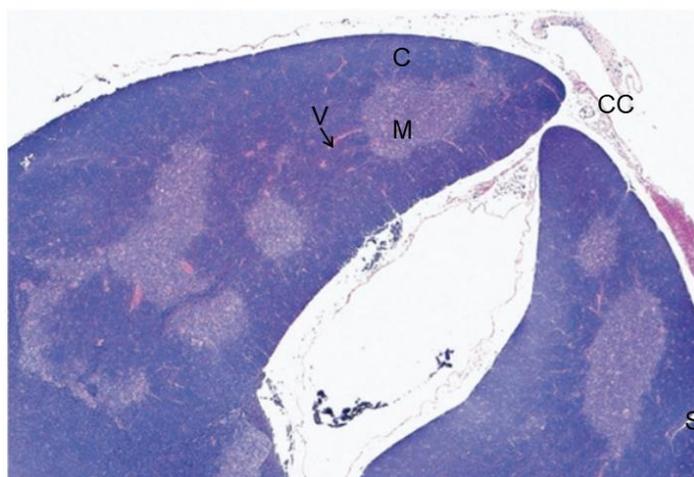
Nos mamíferos, o timo está localizado no mediastino ântero-superior na altura dos grandes vasos do coração, com extensão variável de um ou ambos os lobos para a região cervical no rato. Dos vários tecidos linfoides, o timo é histologicamente o mais consistente entre as espécies, tornando-o exclusivo entre os órgãos linfoides por ser um órgão linfo-epitelial (HALEY, 2003).

O timo consiste em dois lobos distintos conectados por um istmo de tecido conjuntivo; uma cápsula fina de tecido conjuntivo envolve cada lobo e, na maioria das espécies, dá origem a septos, que subdividem parcialmente o timo em lóbulos interconectados, com tamanho e orientação variáveis (HALEY, 2003). O parênquima tímico é dividido em um córtex e medula morfológicamente distintos, separados por uma zona córticomédular vascular (PEARSE, 2006).

O córtex é uma região localizada na porção mais externa do lóbulo, na qual histologicamente apresenta-se intensamente corada, devido a grande

densidade de precursores linfoides imaturos presentes; além destes estão presentes em menores quantidades, células epiteliais corticais (cTEC) e macrófagos. A medula é uma região localizada na porção mais interna do lóbulo, apresenta-se menos corada, devido a uma menor densidade celular, quando comparada ao córtex. Esta região contém precursores linfoides mais maduros, células epiteliais medulares (mTEC), corpúsculos de Hassall, macrófagos e células dendríticas. A junção córtico-medular, extremamente vascularizada, é o local de entrada dos precursores de linfócitos T e de saída das células T maduras (Figura 1) (PEARSE, 2006).

**Figura 1.** Aspectos morfológicos do timo.



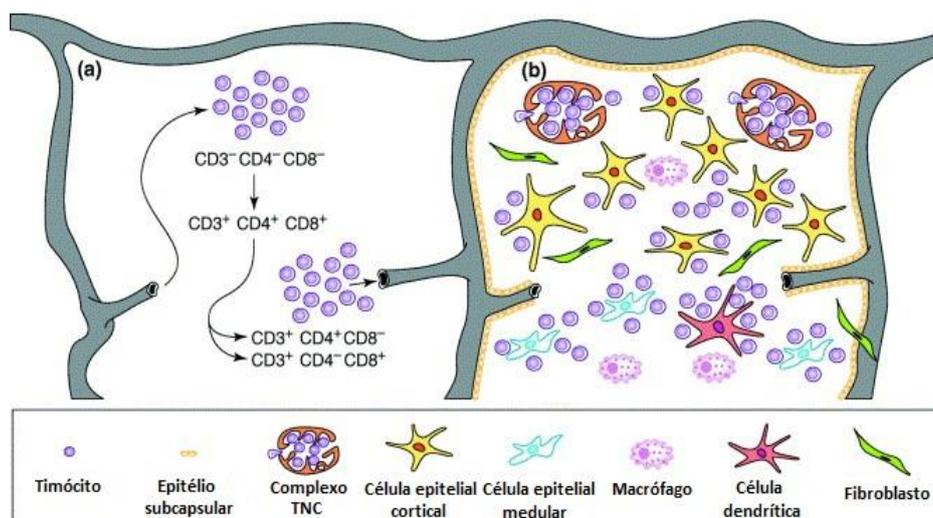
Fotomicrografia de timo de camundongo, em que pode-se observar claramente as regiões cortical (C), bastante densa em timócitos, e medular (M), menos densa em timócitos. V= vaso sanguíneo; S= septo; e CC= cápsula de tecido conjuntivo. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento: 100x. (PEARSE, 2006).

O desenvolvimento adequado do tecido tímico, requer a geração de regiões cortical e medular estruturalmente e funcionalmente distintas, sendo estas orquestradas por cTEC e mTEC, respectivamente (BLEUL et al., 2006). Sendo assim, o papel do timo no desenvolvimento e função das células T é um processo altamente regulado dentro do microambiente tímico, que é essencial para a maturação e diferenciação de timócitos (PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; THAPA; FARBER, 2019).

### 3.1.2 Microambiente tímico

O microambiente tímico está organizado em uma rede tridimensional formada de TECs, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos e da matriz extracelular, que é importante na manutenção do contato entre as células estromais e os precursores de células T oriundos da medula óssea (Figura 2). Tais precursores, ao entrarem no timo, estabelecem contato com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, e ainda por liberação de fatores solúveis. Estas interações celulares influenciam na migração e diferenciação de timócitos (SAVINO et al., 2002, PETRIE; ZUNIGA-PFLUCKER, 2007, ANDERSON; TAKAHAMA, 2012). A diferenciação de timócitos também é influenciada por polipeptídeos solúveis secretados pelas células do microambiente tímico. Estes componentes solúveis vão desde citocinas, como interleucina-1 (IL-1), IL-3, IL-6, IL-7, IL-8; quimiocinas, como CXCL12 e CXCL10, CCL25; interferon (IFN); e hormônios tímicos, incluindo timulina, timopietina e timosina (SAVINO; DARDENNE, 2000; ANNUNZIATO et al., 2001).

**Figura 2.** Representação esquemática da migração intratímica de linfócitos T e do microambiente tímico.



a) Células progenitoras entram no timo através da junção córticomedular e migram no interior do lóbulo tímico durante o processo de diferenciação. b) Durante esse processo, os timócitos entram em contato com diferentes tipos celulares do microambiente tímico que estão presentes em cada região do lóbulo. TNC: célula nurse tímica (adaptado de SAVINO et al., 2002).

Entre os diferentes tipos de células do microambiente tímico, as TECs correspondem ao principal componente e formam um tecido heterogêneo em termos de morfologia, fenótipo e função (ANDERSON; TAKAHAMA, 2012). Estas encontram-se em todo o lóbulo tímico, tanto na região do córtex (cTECs) como na região da medula (mTECs), no qual formam sub-regiões específicas. As cTECs e mTECs expressam ainda no timo pós-natal, a molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), além de distintas citoqueratinas (TAKAHAMA et al., 2017). Na sua maioria as mTECs expressam citoqueratina 5, enquanto que as cTECs expressam a citoqueratina 8 (ALEXANDROPOULOS; DANZL, 2012). As TECs estão envolvidas no desenvolvimento e maturação dos timócitos, que secretam fatores necessários para o desenvolvimento do compartimento linfo/epitelial de forma dinâmica. cTECs e mTECs possuem papéis distintos nos processos de seleção positiva e negativa no timo, exibindo conjuntos exclusivos de auto-antígenos em suas superfícies via moléculas de MHC. Assim, cTECs e mTECs dão origem a células T diversas e imunocompetentes, com um repertório de células efetoras e escasso em células T auto-reativas (ALEXANDROPOULOS; DANZL, 2012).

No córtex, desde a região subcapsular até a junção corticomedular, dos lóbulos tímicos encontram-se complexos linfoepiteliais multicelulares denominados de células *nurses* tímicas (TNCs), nos quais uma única célula epitelial pode abrigar em torno de 20-200 timócitos imaturos em seu citoplasma (SAVINO et al., 2004; TAKAHAMA et al., 2017). As TNCs fornecem um microambiente favorável no timo, para restrição de MHC e seleção de repertório de células T. Um subconjunto dos timócitos internalizados é liberado enquanto as células que permanecem internalizadas sofrem apoptose e são degradados por lisossomos dentro do complexo TNC (GUYDEN; PEZZANO, 2002). Além de timócitos, macrófagos circulantes periféricos também são encontrados no complexo TNC e pode apresentar antígenos aos timócitos em desenvolvimento. Estes macrófagos circulantes poderiam fornecer uma fonte de auto-antígenos usados para garantir uma auto-tolerância ao repertório de células T maduras (EZAKI; MATSUNO; KOTANI, 1991; SAMMS, et al., 2001).

As células dendríticas (DCs) tímicas estão localizadas principalmente na medula tímica e desempenham um papel importante na indução da

tolerância central no timo, atuando em conjunto com as mTECs, que apresenta os auto-antígenos. As células dendríticas podem atuar desta forma, eliminando timócitos auto-reativos, no caso da seleção negativa ou direcioná-los para a geração de células T reguladoras (MANLEY, et al., 2011). Outro componente tímico, são os macrófagos intratímicos que juntamente com as DCs, constituem as células apresentadoras de antígeno para os timócitos em diferenciação, e sabidamente são responsáveis pela remoção dos timócitos apoptóticos no microambiente tímico (LOPES et al., 2018; MIKUŠOVÁ et al., 2017).

Os fibroblastos são um grupo de células multifuncionais heterogêneas de origem mesenquimal, que produzem muitos moduladores imunológicos e desempenham um importante papel no microambiente tímico no que se refere ao desenvolvimento inicial dos timócitos e, desenvolvimento, proliferação e regeneração de TECs. Os fibroblastos estão presentes principalmente na zona subcapsular, septos e próximo aos vasos sanguíneos do timo (SUN et al., 2015). Um último componente tímico são as células endoteliais tímicas presentes nos vasos sanguíneos, participam na entrada dos precursores celulares que chegam no timo e dos linfócitos maduros que saem do órgão (SHI et al., 2016).

No microambiente tímico, as quimiocinas contribuem para a localização dos timócitos e as interações com células estromais. Os sinais resultantes das interações direcionam a migração e a diferenciação das células T (LANCASTER et al., 2018). Uma série de estudos vem demonstrando que várias quimiocinas são produzidas por diferentes células do microambiente tímico e que timócitos, nos diferentes estágios de maturação, expressam receptores para quimiocinas (ANDERSON et al., 2000; SAVINO et al., 2002; LANCASTER et al., 2018).

Quimiocinas são membros de uma família de pequenas proteínas com peso molecular em torno de 10kD. Elas estão agrupadas em 4 subfamílias (CXC, CC, C e CX3C) dependendo do número de cisteínas e o espaço entre as duas primeiras cisteínas e se ligam a receptores acoplados a proteína-G com domínios transmembranares (KIM et al., 1998). As quimiocinas e seus receptores desenvolvem um papel chave nas diferentes fases de maturação e migração de timócitos, desde a chegada de precursores imaturos até a

migração para a periferia de células maduras que tenham passado pelos processos de seleção positiva e negativa (ANNUNZIATO et al., 2001; LANCASTER et al., 2018).

Dentre os diferentes tipos de quimiocina, podemos destacar a CXCL12/SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) que é altamente expressa no timo, sendo produzida por TECs nas regiões cortical e medular, atraindo preferencialmente timócitos imaturos DN e DP. Seu receptor correspondente, CXCR4, é expresso nos timócitos (KIM et al., 1998) em seus diferentes estágios de desenvolvimento, guiando estes da região subcapsular, córtex e medula tímica, ou seja, sendo responsáveis pela localização destes progenitores (SUZUKI, et al., 1999). Estudos posteriores também demonstraram que ao se utilizar a quimiocina CXCL12 em pequenas concentrações, os timócitos aumentam sua migração e este efeito no aumento da migração é potencializado ao se adicionar moléculas de MEC como fibronectina ou laminina ao meio (YANAGAWA et al., 2001; POZNANSKY, et al., 2002).

Na homeostase, o microambiente tímico é composto de diferentes proteínas, que seguem um padrão específico conservado em mamíferos, essa estrutura é denominada de MEC. A MEC tímica é uma rede estrutural constituída por moléculas que apresentam grande atividade de ligação entre si e com receptores expressos na superfície celular. Tais moléculas correspondem a proteínas fibrosas como colágeno e elastina, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanas (SAVINO et al. 2002; MAQUART; MONBOISSE, 2014).

Glicoproteínas da MEC, tais como fibronectina (FN) e laminina (LM), estão distribuídas de forma heterogênea no parênquima tímico, sendo produzidas por distintas células, como: TECs, TNCs, fibroblastos e células fagocíticas do microambiente, promovendo diretamente a adesão, migração, diferenciação, contração e mobilidade das células (SAVINO et al. 2002, MAQUART; MONBOISSE, 2014; IORIO; TROUGHTON; HAMILL, 2015; LENSELINK, 2015). As glicoproteínas FN e LM não são de localização restrita na membrana basal típica. No lóbulo tímico, estas formam uma rede na região medular enquanto fibras mais finas da MEC são encontradas na região cortical (SAVINO et al., 2000).

A fibronectina é uma glicoproteína que pode ser encontrada em superfícies celulares, no plasma, ou na matriz extracelular. Ela pode se apresentar em 2 isoformas: uma clássica localizada no parênquima tímico, que se liga a seu receptor, a integrina VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ /CD49e - receptor clássico da fibronectina), e outra forma localizada na região medular, que se liga a integrina VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ /CD49d), o que define a junção cortico-medular dos lóbulos tímicos (SAVINO et al., 2004). Entre as atividades biológicas da fibronectina estão seu envolvimento na adesão, migração, e diferenciação celular (HYNES; YAMADA, 1982).

Outro importante componente de MEC é a laminina, uma glicoproteína de adesão celular que, estruturalmente se apresenta como um heterotrímero formado por três cadeias peptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , cada uma codificada por um gene específico. Atualmente, já foram caracterizadas 18 isoformas de laminina que se expressam de acordo com cada tecido (SAVINO et al., 2015). Entre as atividades biológicas da laminina estão envolvimento na adesão, sinalização, migração, e diferenciação celular (PEDRAZA et al., 2000).

Os efeitos biológicos dos componentes da MEC sobre as células tímicas ocorrem através da interação com receptores específicos presentes na superfície das células. Muitos destes receptores pertencem à família das integrinas, heterodímeros transmembranares, compostos pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  capazes de fornecer adesão e sinalização intracelular. Os tímócitos em desenvolvimento nas diferentes subpopulações, bem como as células estromais, expressam integrinas, como VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ , CD49d/CD29), VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ , CD49e/CD29) e VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$ , CD49f/CD29) (SAVINO; DALMAU; DE ALMEIDA, 2000).

Algumas integrinas reconhecem seus ligantes através da sequência adesiva formada pelos aminoácidos arginina – glicina – ácido aspártico. Dependendo da integrina, esta pode reconhecer vários ligantes ou ligar-se primariamente a um único ligante (PLOW et al., 2000). Após a ligação das integrinas com seus ligantes ocorre um agrupamento destes receptores em sítios de adesão focal que estão associados externamente à MEC e internamente ao citoesqueleto (GEIGER et al., 2009). Este citoesqueleto é composto por uma rede dinâmica de filamentos proteicos que confere às células a sua morfologia típica, a emissão de protrusões de membrana tais

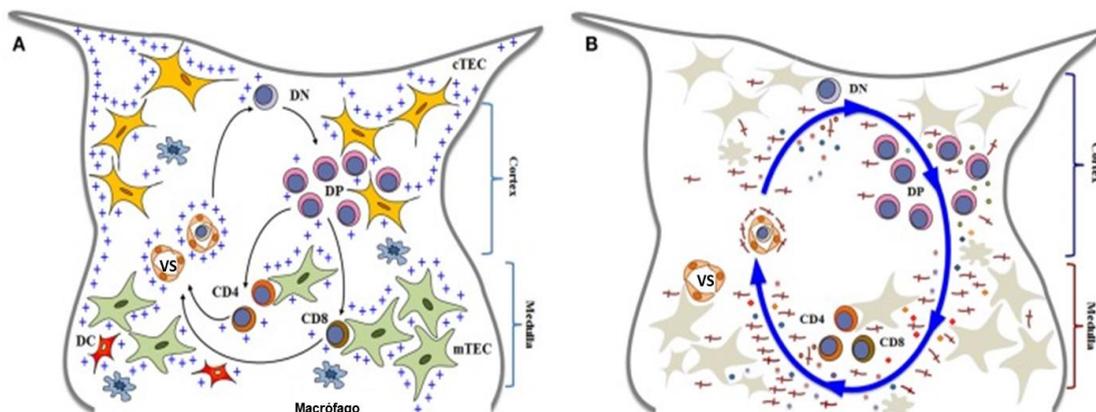
como lamelipódios e filopódios, e a motilidade celular incluindo os eventos de adesão e migração (DUPRÉ et al., 2015).

No timo, a adequada migração de timócitos é decisiva para a seleção do repertório de linfócitos T (HALKIAS et al., 2013). A migração depende da montagem e desmontagem dos complexos de adesão focal associados às integrinas. Estes complexos regulam a migração por promover a adesão, ligando a MEC ao citoesqueleto de actina, e a transdução de sinal, permitindo a expressão de moléculas envolvidas na motilidade celular (CARY et al., 1996; COX et al., 2001). O citoesqueleto de actina fornece suporte mecânico para organização da estrutura celular e sua reorganização gera mudanças dinâmicas inicialmente no formato das células e posteriormente nas interações célula-célula, adesão e migração celular (PHEE et al., 2014).

### **3.1.3 Diferenciação intratímica de linfócitos T $\alpha\beta$**

Precusores linfoides oriundos da medula óssea entram no timo através das vênulas pós-capilares, localizadas próximas à região córtico-medular dos lóbulos tímicos (LIND et al., 2001). Os timócitos expressam ao longo do seu desenvolvimento moléculas que caracterizam os diferentes estágios de desenvolvimento das células T. Estas moléculas são expressas em suas membranas e dentre elas pode-se citar os receptores de células T (TCR), que diante de diferentes recombinações gênicas, garante a diversidade de TCRs; e os correceptores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (SAVINO; DARDENNE, 2010). Durante o processo de diferenciação, os timócitos seguem uma rota migratória no interior do lóbulo tímico. As células DN são encontradas no córtex subcapsular dos lóbulos tímicos, enquanto as células DP são encontradas no córtex interno e os timócitos SP maduros estão localizados na medula (Figura 3) (SAVINO et al., 2015).

**Figura 3.** Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos no microambiente tímico.



A) Células progenitoras entram no timo através de vasos sanguíneos (VS) na junção cortico-medular, os timócitos entram em contato com diferentes células do microambiente tímico presentes em cada região do lóbulo. B) Durante o processo de diferenciação, timócitos migram no interior do órgão, seguindo um padrão multivetorial em todo o lóbulo tímico (adaptado de SAVINO et al., 2015a).

A diferenciação intratímica de células T é considerada um processo fundamental para o desenvolvimento e manutenção de respostas imunes adaptativas. No timo, os precursores passam por uma série complexa de eventos biológicos, de modo que cerca de 95% das células geradas neste órgão, morrem por apoptose. Enquanto isso, uma pequena proporção de células é resgatada da morte celular programada e adquire a capacidade de migrar do timo para órgãos linfoides secundários (SAVINO et al., 2015).

A migração de timócitos dentro do microambiente tímico direciona seu desenvolvimento adequado. Células estromais, incluindo cTEC e mTEC secretam várias quimiocinas que direcionam os timócitos no microambiente tímico. Inicialmente, progenitores linfoides que não expressam os co-receptores CD4 e CD8 ( $\text{TCR}^{\text{hi}}\text{CD4}^{\text{lo}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ ), entram através de vênulas pós-capilares na região córtico-medular do timo, passando a serem denominados timócitos duplo-negativos (DN). As células DN podem ainda ser subdivididas em quatro sub-etapas de desenvolvimento, DN1, DN2, DN3 e DN4, baseadas, principalmente, na expressão de duas moléculas de superfície celular: o CD25 (receptor para IL-2), e o CD44 (receptor para ácido hialurônico e fibronectina) (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

No primeiro estágio são chamados de timócitos DN1, que ao migrarem para a região subcapsular, diferenciam-se nos estágios DN2 e DN3, havendo

reorganização dos genes dos TCRs, com os co-receptores de superfície CD25/CD44. Em seguida ocorre a formação de um complexo pré-TCR (expressa a cadeia  $\beta$  e uma cadeia  $\alpha$  provisória) que inicia a proliferação e diferenciação de DN3 para DN4. Com o progresso da maturação, as células DN4, migram da região subcapsular para o córtex, havendo rearranjo gênico da cadeia que forma o TCR $\alpha$ , onde passam então a expressar o TCR maduro e as moléculas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) sendo denominadas células duplo positivas (DP), as quais constituem cerca de 75-85% da população de timócitos (UENO et al., 2004; KRANGEL, 2009).

A formação de timócitos DP é uma etapa fundamental no desenvolvimento de células T. O próximo evento que ocorre é chamado de seleção positiva, na qual os timócitos DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) interagem fracamente com auto-peptídeos expressos pelo MHC, presentes nas células microambientais como as cTEC, o que leva a um sinal positivo para sobrevivência (via Bcl-2), o que direciona os timócitos a perder um dos correceptores CD4 ou CD8 e migrarem para a região medular, continuando a diferenciação, dando origem aos timócitos simples positivo (SP) (TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (MCKEAN et al., 2001; THAPA; FARBER, 2019).

Essas células SP, migram para a medula se tiverem uma avidéz muito baixa ou muito alta ao interagir com um TCR e com o peptídeo endógeno acoplado ao MHC classe I ou II expresso por mTECs e por células dendríticas (DC) do estroma tímico, sofrerão apoptose. Esse processo é chamado seleção negativa, que estabelece a tolerância central do órgão, no qual as células T auto-reativas são suprimidas. Timócitos SP maduros que sobreviveram ao processo de seleção negativa podem finalmente, emigrar do timo para os órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos, amígdalas, apêndice e mucosas) (GRAHAM et al., 2000; IRLA et al., 2008).

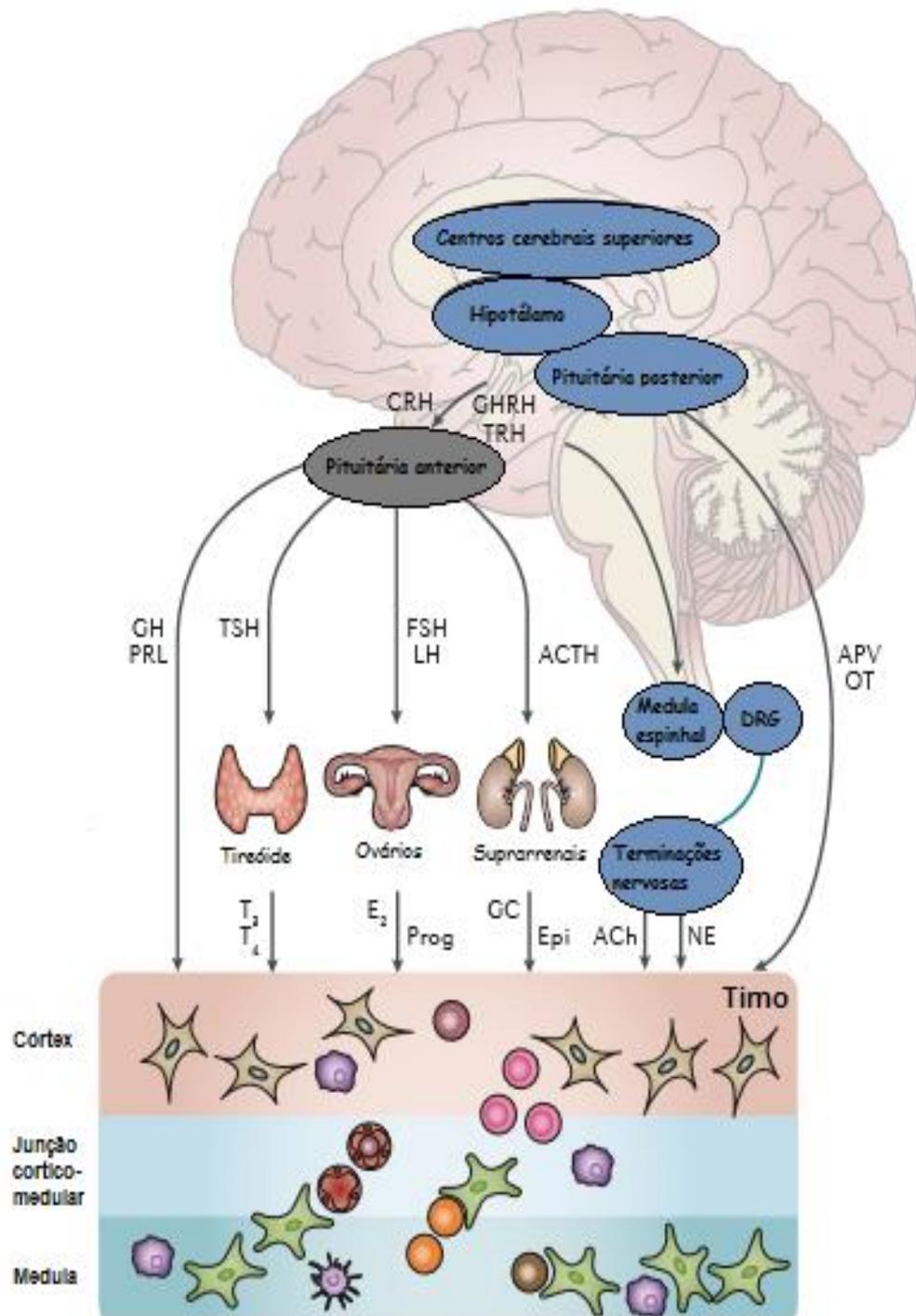
### **3.2 Controle neuroendócrino no timo**

A comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino está bem demonstrada. Estes sistemas usam ligantes e receptores similares para estabelecer uma comunicação fisiológica intra- e inter-sistemas, certamente

relevante na homeostasia. Não só as células do sistema imune produzem hormônios clássicos, mas também as glândulas endócrinas e tecidos nervosos sintetizam e liberam uma série de citocinas (BLALOCK, 1994; SAVINO; DARDENNE, 1995, 2000). Dependendo do tipo de estímulo antigênico, múltiplas interações célula/célula e/ou via fatores solúveis podem ocorrer entre subpopulações linfoides e células do microambiente. Deste modo, pode-se conceber que tais interações resultem na secreção de uma combinação de fatores solúveis que informam o sistema nervoso central sobre o tipo de resposta imune em operação. A existência desta via implica que o sistema imune possa ser considerado como um órgão sensorial para estímulos não reconhecidos pelo sistema nervoso central e periférico, os chamados estímulos cognitivos (BESEDOVSKY; DEL REY, 2001).

Uma série de evidências mostra que o controle hormonal do timo inclui tanto as vias endócrinas como também parácrinas/autócrinas, que atuam nas células estromais e timócitos do microambiente tímico por meio de receptores hormonais específicos. Hormônios, neurotransmissores e citocinas influenciam as funções de células estromais distintas, incluindo maturação, sobrevivência e apresentação de antígenos (Figura 4) (SAVINO et al., 2015). Além disso, eles afetam a sobrevivência, a migração e a seleção de timócitos, moldando assim o *pool* de células T maduras na periferia (PEREZ et al., 2019). Por exemplo, estudos mostram que hormônios, incluindo hormônio do crescimento (GH), prolactina (PRL), ocitocina e glicocorticóides, estão envolvidos no controle do microambiente tímico (DE MELLO-COELHO et al., 1997; BERKI et al., 2002; SAVINO et al., 2015). Estes hormônios regulam a proliferação e a sobrevivência de precursores linfoides e das demais células deste microambiente, bem como a seleção dos repertórios de células T, que é um mecanismo parcialmente relacionado a modulação da ativação do TCR sobre o complexo peptídeo-MHC (SAVINO; DARDENE, 2000). Ainda, foi demonstrado que o GH aumenta o número de timócitos, a deposição de laminina e seu receptor VLA-6 no microambiente tímico. Os timócitos obtidos de camundongos transgênicos para o GH, apresentaram migração aumentada em câmaras de *transwell* pré-tratadas com laminina e também frente a quimiocina CXCL12 (SMANIOTTO et al., 2005).

**Figura 4.** Interações imuno-neuro-endócrinas no timo



Influência de diferentes tipos de hormônios peptídicos e não peptídicos no timo. Abreviações: ACh, acetilcolina; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; AVP, arginina vasopressina; CRH, hormônio liberador de corticotropina; DRG, gânglio da raiz dorsal; E<sub>2</sub>, estradiol; Epi, epinefrina; GC, glicocorticoide; GH, hormônio do crescimento; GHRH, hormônio liberador de GH; LH, hormônio luteinizante; NE, noradrenalina; OT, ocitocina; PRL, prolactina; Prog, progesterona; TRH, hormônio liberador de tireotropina (Adaptado de SAVINO et al., 2015).

### 3.3 Prolactina

A PRL é um hormônio polipeptídico de 23 kDa, composto por 198 aminoácidos, secretado principalmente pelas células lactotróficas da hipófise anterior (CONSTANZA et al., 2015). Os níveis séricos de prolactina podem ser influenciados pelo ritmo circadiano (pico às 2 horas da manhã), exercício, estresse emocional ou físico, refeições ricas em proteínas, estímulo mamário e condições patológicas como prolactinoma, hipotireoidismo e insuficiência adrenal (SAVINO, 2017). Da mesma forma, as citocinas IL-1, IL-2 e IL-6 estimulam sua secreção, enquanto a endotelina-3 e o interferon- $\gamma$  exerce influência inibitória (CHIKANZA, 1999).

A PRL também é produzida em locais fora da hipófise (PRL extra-hipofisária) como no cérebro, miométrio, glândula lacrimal, timo, baço, linfócitos circulantes, células linfoides de medula óssea, células epiteliais mamárias e tumores, nos fibroblastos da pele, e glândulas sudoríparas (BEN-JONATHAN et al., 1996). Ela pode atuar tanto como um hormônio, através da via clássica endócrina ou ainda, como um fator de crescimento, neurotransmissor ou imunorregulador, de forma autócrino-parácrina (MÉNDEZ et al., 2005).

Os efeitos da PRL são mediados pelo receptor transmembranar da PRL, o PRLr. O PRLr é membro da mesma família do receptor de GH e também fazem parte da maior classe de receptores, conhecidos como a superfamília de receptores de citocinas de classe 1 (GOFFIN et al., 1998).

Após a ligação da PRL ao seu receptor e dimerização do PRLr, o sinal da transdução ocorre através do recrutamento de moléculas citoplasmáticas para o PRLr, incluindo a tirosina-quinase Janus quinase 2 (JAK2) e os membros da família STAT-1, -3 e -5 (LEONARD; O'SHEA, 1998). Desta forma, assim como para a maioria dos membros da superfamília de receptores de citocinas, o PRLr ativa uma cascata de sinalização de membros da família JAK-STAT (BOUCHARD et al., 1999; XU, et al., 2010). A ativação dessas cascatas modula várias funções celulares, como diferenciação, proliferação, sobrevivência e secreção (DARDENNE et al., 1991; DARDENNE et al., 1994).

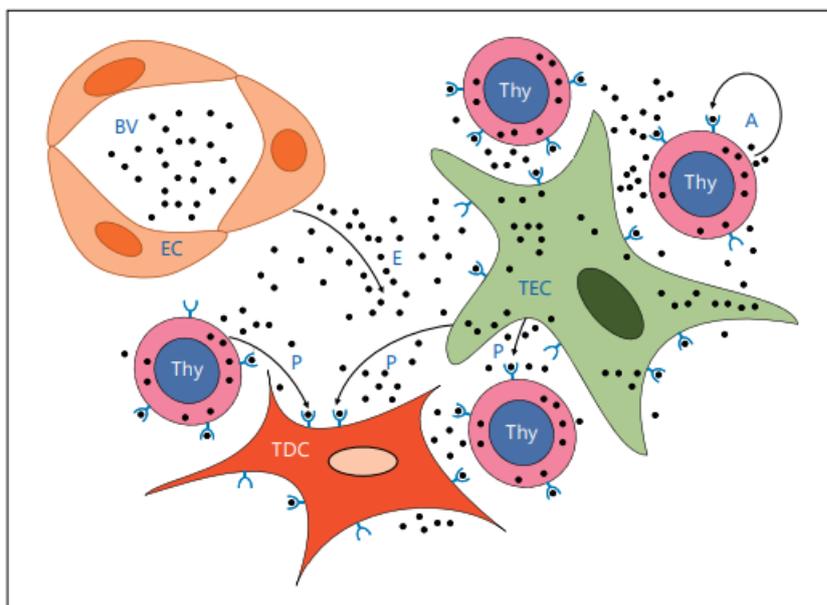
Sabe-se que a prolactina é um hormônio altamente versátil, com múltiplas funções, como: reprodução, gravidez e lactação, crescimento e

desenvolvimento, metabolismo, imunidade, transporte de eletrólitos, comportamento e carcinogênese (MARANO; BEN-JONATHAN, 2014). Nos mamíferos, a PRL classicamente participa da função gonadal, desenvolvimento mamário e lactação. Durante a gravidez, a secreção de PRL materna humana aumenta gradualmente no início da 6<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup> semanas de gestação até o final da gestação e é seguido por altas concentrações séricas do hormônio durante a lactação (BINART, 2016). Em camundongos, o padrão de secreção da PRL é alterado nos diferentes estágios reprodutivos. Em fêmeas virgens, os níveis de PRL são baixos nas fases de estro, metaestro e diestro, ocorrendo um pulso de PRL no proestro tardio. Se ocorrer acasalamento, a estimulação vaginal eleva a secreção da PRL pela hipófise anterior que permanece na primeira metade da prenhez, retornam aos níveis baixos até o aumento imediatamente antes do parto e altos níveis de PRL são secretados durante a lactação (LE TISSIER et al., 2015).

### **3.3.1 Prolactina e Sistema Imune**

A PRL além de sua produção e secreção hipofisária, é produzida pelas células do sistema imunológico, que também expressam receptores para PRL. Assim, pode-se esperar que a PRL atue no sistema imunológico pelas vias endócrino e também pelas vias parácrinas e autócrinas (Figura 5) (SAVINO, 2017). Vários relatos na literatura já mostraram que a PRL atua em órgãos linfoides como o timo, sendo os linfócitos os primeiros tipos celulares identificados como responsáveis pela síntese deste hormônio (HARTMANN et al., 1989; MONTGOMERY et al., 1987). Estes achados foram comprovados posteriormente por análise por hibridização *in situ*, que revelou a expressão do gene ou transcrito de RNA mensageiro (RNAm) de PRL em diferentes órgãos linfoides (WU et al., 1996).

**Figura 5.** Vias endócrina, parácrina e autócrina relacionadas aos efeitos da PRL nas células tímicas.



A PRL hipofisária entra no timo via vasos sanguíneos e pode atuar nos timócitos em desenvolvimento e células do microambiente tímico através de PRLr específicos. Isso caracteriza a via endócrina clássica. Porém timócitos e TECs também produzem PRL, que pode atuar tanto em células próximas, de forma parácrina, como de forma autócrina. • = PRL; Y = PRL-R; BV = vaso sanguíneo; EC = célula endotelial; TCD = célula dendrítica; A = autócrino; E = endócrino; P = parácrina; Thy = timócito (Adaptado de SAVINO, 2017).

Timócitos e células do microambiente tímico como as TECs e células dendríticas, expressam constitutivamente PRLr e respondem ao ligante correspondente (SAVINO et al., 2016). Em relação a timócitos, estudos que utilizaram anticorpos monoclonais anti-PRL ou anti-PRLr bloqueando o desenvolvimento de células T, levando ao acúmulo de células muito imaturas no timo, indicando fortemente que a PRL sustenta sobrevivência e proliferação de precursores precoces de células T no timo (CARRENO, et al., 2005). Em TECs já foi visto que a PRL pode atuar em inúmeros aspectos de sua fisiologia, caracterizando sua ação pleiotrópica nesse epitélio, modulando a expressão de citoqueratinas e proliferação destas células (DARDENNE et al., 1989) além da proliferação de TNCs (DE MELLO-COELHO et al., 1997). Além disso, já foi demonstrado que a PRL aumenta a produção do hormônio tímico, a timulina (DARDENNE et al., 1989); nos linfócitos, ela é conhecida por aumentar as imunidades humoral e celular (BERCZI et al., 1982; NAGY; BERCZI, 1981), regular a diferenciação e a maturação dos linfócitos T e B (YU-LEE et al., 2002;

JABBOUR et al., 1999); induzir a proliferação celular (MURPHY et al., 1993) e inibir a apoptose de linfócitos (LAVOIE; WITORSCH, 1995; FLETCHER-CHIAPPINI et al., 1993).

As interações entre células estromais e linfóides no microambiente tímico, resultam de várias interações moleculares envolvendo ligantes e receptores sob um sistema multivetorial. No entanto, pouco se sabe sobre a ação da PRL nestas interações, conhecimento de evidente relevância principalmente no que se refere ao possível potencial terapêutico deste hormônio em algumas situações clínicas como no tratamento de imunodeficiências relacionadas a células T.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da linhagem C57BL/6, adultos jovens, com idade entre 4 a 8 semanas. Também foram utilizadas fêmeas lactantes e não lactantes, da linhagem C57BL/6 com idade entre 3 a 4 meses. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico com dose letal de tiopental sódico, 120 mg/kg por via intraperitoneal. Todos os procedimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas de biossegurança estabelecida pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL – CEUA nº 14/2015 (Anexo 1).

### **4.2 Cultura primária das células estromais tímicas (CETc)**

As culturas primárias das células estromais tímicas de camundongos (CETc) foram obtidas utilizando-se a técnica do explante a partir de fragmentos do timo de camundongos. Esses procedimentos foram realizados utilizando método previamente padronizado no Laboratório de Biologia Celular por VIEIRA-ARAÚJO, 2017. Na câmara de fluxo laminar, os timos foram extraídos assepticamente e lavados em solução tampão fosfato salina (PBS), em seguida foram cortados em fragmentos de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  e transferidos para frascos de cultura de  $25 \text{ cm}^2$  contendo RPMI 1640 acrescidos de 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 10 M de L-glutamina, 40 mg/ml de gentamicina (1mg/mL) e anfotericina (1mg/mL). As culturas foram incubadas a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e observadas regularmente por microscópio de luz invertido com contraste de fase (Nikon, Tokyo, Japan). O meio foi trocado no 4º dia de cultivo.

No 7º dia após o explante, as CETc foram lavadas com PBS, tratadas com solução de tripsina a 0,1 %, neutralizadas com meio de cultura, centrifugadas e cultivadas em placas de seis poços (Costar, EUA) ou em

lâminas Lab-Tek chamber (Nunc, Dinamarca). Posteriormente, essas células estromais foram utilizadas para a realização dos experimentos (Figura 6).

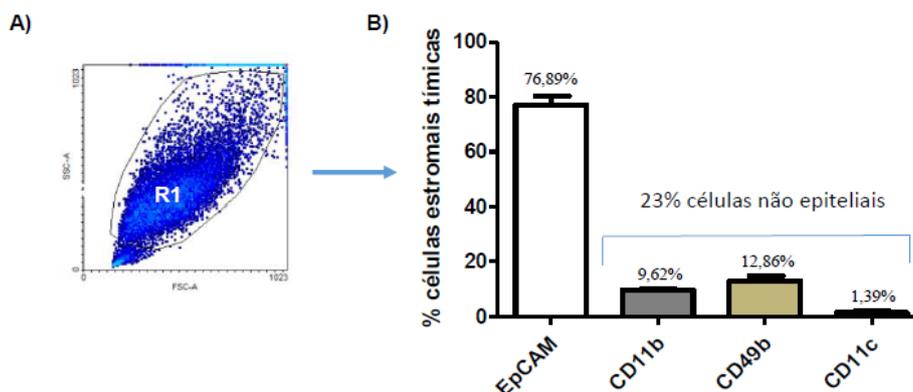
**Figura 6.** Células estromais tímicas



Fotomicrografia de cultura primária de células estromais tímicas de camundongos. Aumento de 400x (VIEIRA-ARAÚJO, 2017).

As CETc foram caracterizadas previamente por Vieira-Araújo, 2017. Foram utilizados marcadores expressos na superfície dessas células estromais e foi verificado que cerca de 76% são células epiteliais tímicas, isto é, expressam em sua superfície a molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM) e cerca de 23% são células não epiteliais, entre essas, sugere-se que: aproximadamente 9% podem ser macrófagos, pois expressam a molécula CD11b ( $\alpha M\beta 2$ ), 12% podem ser fibroblastos por expressar a molécula CD49b (VLA2), 1% podem ser células dendríticas, já que expressam em sua superfície a molécula CD11c ( $\alpha X\beta 2$ ) (Figura 7 ) (VIEIRA-ARAÚJO, 2017).

**Figura 7.** Caracterização das células estromais tímicas



A) Delimitação da população de células estromais tímicas de camundongos no *dot plot* tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). (B) Porcentagem de células estromais tímicas de camundongos que expressam EpCAM, CD11b, CD49b e CD11c. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média, n=16 (VIEIRA-ARAÚJO, 2017).

### 4.3 Cultura de células epiteliais tímicas (TECs)

Para este trabalho foi utilizada a linhagem de células epiteliais tímicas (TECs), denominada 2BH4, derivada de timo de camundongos C57BL/6. Esta linhagem apresenta fenótipo misto, expressando receptores de cTEC e mTEC medular (WERNECK et al., 2000). As células 2BH4 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e gentamicina 40 mg/mL. As células foram mantidas em condições estéreis, em estufa a 37°C, com atmosfera umedecida contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A passagem destas células foi realizada quando estas se encontravam em estado de semi-confluência por meio do tratamento com solução de Tripsina 0,25% - EDTA 0,02% em solução livre de cálcio e magnésio, pH 7,2.

### 4.4 Obtenção dos timócitos

Os animais foram eutanasiados, o timo foi removido cirurgicamente, lavado em PBS e macerado em 1 mL de RPMI-SBF 4 % com o auxílio de peneira e êmbolo estéril. As células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de trypan 0,02% e foram mantidas em meio RPMI 1640 a 4°C até serem utilizados para os experimentos.

#### 4.5 Tratamento com Prolactina (PRL)

Nos ensaios, os tratamentos com PRL (*Recombinant Mouse Prolactin Protein* - R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL, foram realizados em meio RPMI a 2% de SBF. As CETc e TECs 2BH4 foram previamente plaqueadas por 16h para adesão e espraiamento celular (VIANA, et al., 2015), em meio RPMI a 10% de SBF. Após substituição do meio, as células foram tratadas durante 24h (CARRENO, et al., 2005) com PRL. No caso dos timócitos, após a obtenção destas células de maneira estéril a partir da maceração dos timos dos camundongos, os timócitos foram plaqueados em placas de 24 poços e tratados durante 1, 3 ou 6 horas com PRL.

#### 4.6 Ensaio da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pela análise de redução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Neste ensaio observa-se quantitativamente a viabilidade celular através da redução do MTT na mitocôndria de células viáveis. Em uma placa de 24 poços foram cultivados  $2,5 \times 10^5$  timócitos ou  $2 \times 10^5$  células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4) por poço durante 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> e 37°C. Foram utilizados como controles do experimento RPMI suplementado, acrescidos de 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 10 M de L-glutamina, 40 mg/ml de gentamicina (1mg/ml) e tween 3% (controle de morte celular). As células foram tratadas com prolactina por 24 horas nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL. Timócitos ou células epiteliais tímicas não tratadas, submetidos as mesmas condições de umidade e temperatura foram utilizados como controle dos experimentos. Em seguida, uma solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada a cada poço e a placa foi novamente incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por mais 4 horas. Logo após, a placa foi centrifugada por 5 minutos (1500 rpm), o sobrenadante foi desprezado e adicionado a cada poço 150 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) seguido da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.7 Ensaio de citometria de fluxo

Para determinar o fenótipo dos timócitos quanto à expressão das moléculas de superfície celular foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com APC (*Allophycocyanin*) ou FITC (*fluorescein isothiocyanate*), anti-CD8 acoplado a PerCP (*Peridin Chlorophylli Protein*) para identificar o fenótipo CD4/CD8 dos timócitos, anticorpos monoclonais anti-CD49e (VLA-5/cadeia  $\alpha 5$ ) e anti-CD49f (VLA-6/ cadeia  $\alpha 6$ ) marcados com PE (*Phycoerythrin*) para avaliar a expressão de receptores integrinas para moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, respectivamente, anticorpo monoclonal anti-CXCR4 marcado com PE para identificar a expressão do receptor da quimiocinas CXCL12. Os isotipos controles IgG1, IgG2a e IgG2b (conjugados aos seus respectivos fluorocromos) foram utilizados como controles negativos (Tabela 1).

**Tabela 1. Anticorpos e seus respectivos fluorocromos**

<b>Marcadores</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
<b>Subpopulações de timócitos</b>	Anti-CD4	APC FITC	BD eBioscienc
	Anti-CD8	PerCP	eBioscienc
<b>Integrinas</b>	Anti-CD49e	PE	eBioscienc
	Anti-CD49f	PE	eBioscienc
<b>Receptor de quimiocina</b>	Anti-CXCR4	PE	BD
<b>Isotipos controles</b>	IgG2a	APC PE	eBioscienc eBioscienc
	IgG2b	APC FITC PE	eBioscienc/BD eBioscienc eBioscienc/BD

Fonte: autor

Timócitos frescos ou tratados com PRL na concentração de 10 ng/mL foram colocados em placas de 96 poços de fundo “U”, em uma densidade de

$2 \times 10^6$  células/poço. Após serem lavados com PBS e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, as células foram incubadas com anticorpo específico, por 20 minutos, a 4°C, no escuro. Após a devida incubação, as células foram lavadas com PBS/SBF 4%, centrifugadas e posteriormente fixadas com formaldeído 2%. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.8.

## **4.8 Ensaio de Imunofluorescência**

### **4.8.1 Imunocitoquímica**

Após o cultivo de  $2 \times 10^4$  células estromais ou epiteliais tímicas na lâmina tipo labtek por 16 horas, as CETc ou TECs (linhagem 2BH4) foram tratadas com PRL na concentração de 10 ng/mL ou RPMI 2% por 24 horas e em seguida lavadas em PBS, fixadas com metanol por 10 minutos e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta, onde, as CETc ou TECs foram pré-incubadas por 30 minutos com PBS-BSA 1%. Em etapa conseguinte, as células em diferentes lâminas, foram incubadas com os anticorpos primários: anti-fibronectina (Sigma); anti-laminina (Sigma); anti-pan-citoqueratina (eBioscienc), anti-citoqueratina-5 (eBioscienc) ou anti-citoqueratina-8 (eBioscienc) ou anti- CXCL12 (eBioscienc) durante 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas durante 45 minutos com anticorpo secundário produzidos em cabra anti-Ig de coelho (GAR) conjugado ao fluorocromo FITC (Sigma) e diluído em PBS (1:100). Posteriormente, as células foram novamente lavadas em PBS, incubadas com DAPI por 10 minutos e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:3). Depois de cobertas com lamínula de vidro, as lâminas foram avaliadas por microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44.

#### 4.8.2 Imunohistoquímica

O timo de fêmeas lactantes ou do grupo controle, foi incluído em tissuetek (polímero inerte), montado em um criomolde, e congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o timo congelado foi submetido a cortes em criostato a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde finas seções ( $10\text{ }\mu\text{m}$ ) foram obtidas e recolhidas em lâminas de vidro. As amostras foram fixadas com acetona e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta, na qual, as lâminas com os cortes foram pré-incubados por 30 minutos em solução de bloqueio para sítios inespecíficos (PBS contendo 1% de BSA e 20% de soro de camundongo). Terminado o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário específico para CXCL12 (eBioscienc), adequadamente diluídos em PBS (1:50). As lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente, por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados durante 45 minutos com anticorpo secundário GAR-FITC (Sigma), diluídos em PBS na concentração de 1:100. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados com PBS e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:3). Depois de cobertas com lamínula, as lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44.

#### 4.9 Marcação direta para citoesqueleto de F-actina

Após o cultivo de  $2 \times 10^4$  CETc ou TECs (linhagem 2BH4) na lâmina tipo labtek por 16 horas, estas células foram tratadas com PRL 10ng/mL ou RPMI 2% por 24 horas e em seguida lavadas em PBS, fixadas em 4% de paraformaldeído em PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 por 5 minutos. Em seguida, as células foram marcadas para F-actina pela coloração direta com faloidina-FITC (Sigma) durante 1 hora. Posteriormente, as células foram novamente lavadas em PBS, incubadas com DAPI e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:3). Depois de cobertas com lamínula de vidro, as lâminas foram avaliadas por de microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas utilizando câmara Nikon modelo DS-Ri1

(Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p.

#### **4.10 Ensaio de Adesão celular**

Foi utilizado para avaliar o efeito da prolactina na capacidade adesiva dos timócitos em CETc e TECs (linhagem 2BH4). Para a realização deste ensaio,  $2 \times 10^4$  CETc e TECs foram cultivadas em frascos de  $25 \text{ cm}^2$  na presença de meio RPMI-SBF 10%, durante 16 horas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para adesão celular. Posteriormente, em meio RPMI-SBF 2%, foram tratadas ou não (controle) com PRL 10 ng/mL por 24 horas. Após o período de tratamento, foi realizada a co-cultura por 1 hora das CETc e TECs com timócitos frescos (na proporção de 50 timócitos/CETc ou TECs). Em seguida, por meio de lavagens com PBS a temperatura ambiente, os timócitos não-aderentes foram delicadamente removidos. Os timócitos aderidos às CETc ou TECs foram recolhidos, por meio de lavagens com PBS gelado, e quantificados. Posteriormente, com objetivo de determinar o fenótipo dos timócitos aderidos foram marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 para a análise por citômetro de fluxo.

#### **4.11 Ensaio de migração celular**

##### **4.11.1 Migração frente as células estromais tímicas**

Os ensaios de migração de timócitos *in vitro* foram desenvolvidos utilizando-se o sistema “transwell”, empregando insertos com membranas de policarbonato de 6,5 mm de diâmetro e poros de  $5 \mu\text{m}$ , em placas de 24 poços. Inicialmente CETc e CETs (linhagem 2BH4) foram plaqueadas  $10^4$  células/poço na presença ou ausência de prolactina (10 ng/mL) e após 24 horas foram realizados os ensaios de migração propriamente ditos. O meio de cultura destas células não foi substituído para a inserção dos transwells. Para tal, as membranas de *transwell* foram incubadas por 45 minutos em estufa com  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , com solução de PBS-BSA 0,1%. Posteriormente, os transwells foram inseridos aos poços da placa de 24 poços e timócitos frescos ( $2 \times 10^6$ ) foram

adicionados na câmara superior. Na câmara inferior, foi adicionada a quimiocina CXCL12 (200ng/mL) na cultura de células estromais. Após 3 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>, as células migrantes depositadas na câmara inferior foram coletadas e contadas. A fim de determinar as subpopulações dos timócitos migrantes, essas células foram submetidas à análise citofluorimétrica.

#### **4.11.2 Migração frente a quimiocina**

Para analisar a migração de timócitos frescos obtidos de fêmeas lactantes frente a quimiocina CXCL12, foram realizados ensaios utilizando o sistema de “*transwell*” empregando insertos com membranas de policarbonato com 6,5 mm de diâmetro e poros de 5 µm. Os insertos tiveram suas membranas bloqueadas com PBS-BSA 0,1% por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o bloqueio, foi adicionado aos poços inferiores das câmaras meio de cultura (RPMI/BSA 1%) com CXCL12 na concentração 200ng/mL. Os timócitos ( $2 \times 10^6$  em 100 µL de RPMI/BSA 1%) foram colocados na parte superior da câmara. Após 3 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>, as células migrantes depositadas na câmara inferior foram coletadas e contadas. A fim de determinar as subpopulações dos timócitos migrantes, essas células foram submetidas à análise citofluorimétrica.

#### **4.12 Análise Estatística**

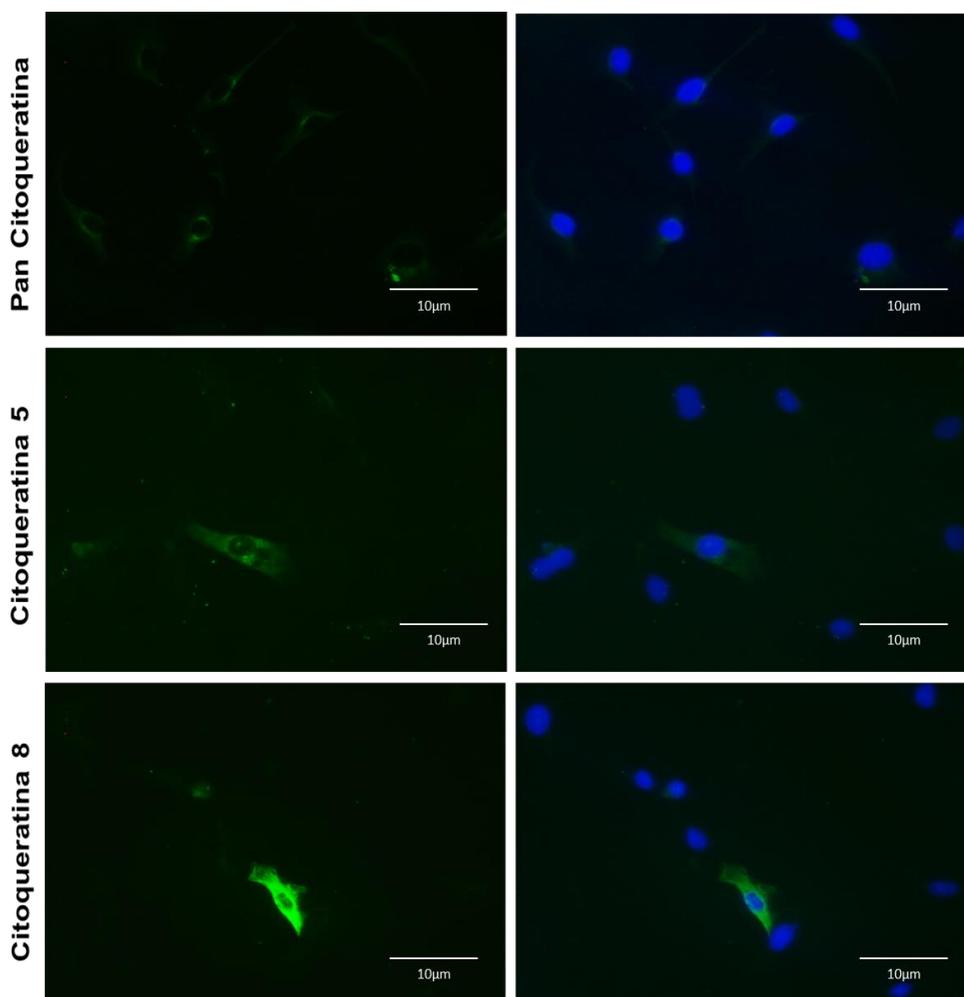
Para as análises estatísticas dos dados obtidos foram utilizados o teste t de Student ou one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os valores foram representados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação de células epiteliais no estroma tímico

Na caracterização das CETc realizada por citometria de fluxo, cerca de 76% são células epiteliais (VIEIRA-ARAÚJO, 2017). Neste estudo, foi realizado uma caracterização por imunocitoquímica para avaliar a expressão das seguintes moléculas: pan-citoqueratina para células epiteliais tímicas (TECs), citoqueratina 5 para célula epitelial tímica medular (mTEC) e citoqueratina 8 para célula epitelial tímica cortical (cTEC) (Figura 8)

**Figura 8.** Caracterização das células epiteliais tímicas presentes nas CETc.



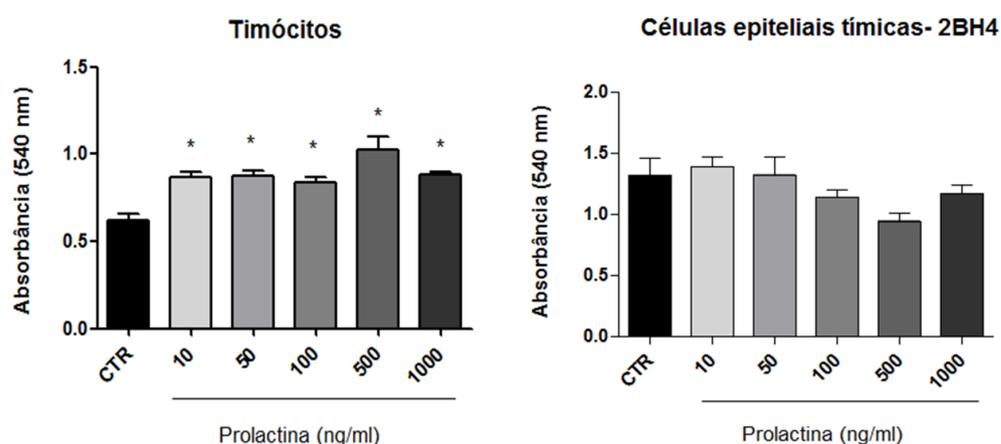
Fotomicrografias representativas mostram a presença de citoqueratina por imunofluorescência. Citoqueratina específicas para todo o epitélio tímico (pan-citoqueratina<sup>+</sup>). Citoqueratina específica para o epitélio tímico medular (citoqueratina 5<sup>+</sup>). Citoqueratina específica para o epitélio tímico cortical (citoqueratina 8<sup>+</sup>). As células positivas apresentam marcação em verde. Os núcleos marcados em azul (DAPI). As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes. Magnitude de 400X.

Foi observado que a maioria das células do estroma foram positivas para pan-citoqueratina. Ainda, foram identificadas células que expressavam a citoqueratina 5 ou a citoqueratina 8, confirmando seu fenótipo medular ou cortical, respectivamente.

## 5.2 Efeito da prolactina sobre a viabilidade de timócitos e de células epiteliais tímicas

Para avaliar o efeito da PRL sobre a viabilidade dos timócitos e das células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4) foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT. Como demonstrado na figura 9, os resultados indicam que o tratamento com a prolactina nas diferentes concentrações (10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL) por 24 horas, aumentou significativamente a viabilidade dos timócitos e não interferiu com a viabilidade das TECs (linhagem 2BH4), sugerindo ausência de efeitos citotóxicos. Considerando que a prolactina na concentração de 10 ng/mL aumentou e não alterou a viabilidade das timócitos e células epiteliais tímicas, respectivamente, esta concentração foi utilizada nos ensaios posteriores.

**Figura 9.** Viabilidade de timócitos e de células epiteliais tímicas após tratamento com prolactina.



As células foram tratadas com prolactina nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL durante 24 horas. Células sem tratamento foram utilizadas como controle. Detergente tween foi utilizado como controle de morte celular e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT. As barras representam média  $\pm$  EPM (n=4). \*  $p < 0,05$ . Valores estatisticamente significativos em relação aos grupos controles. One-way ANOVA, seguido do teste de Tukey.

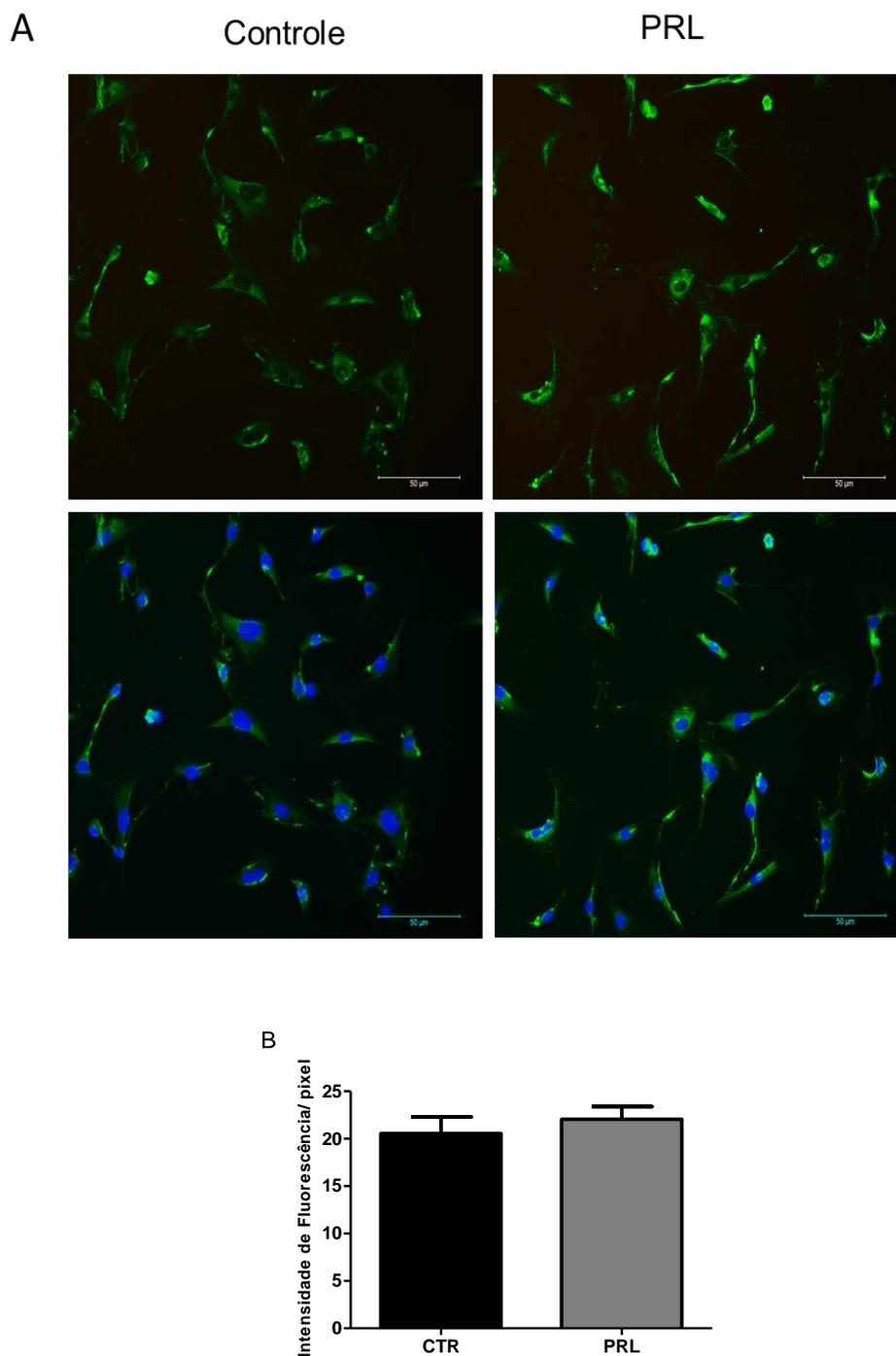
### **5.3 A prolactina modula a deposição de moléculas de matriz extracelular por células estromais (CETc) e células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4)**

Com o propósito de avaliar a influência da PRL (10 ng/mL), na deposição de moléculas da matriz extracelular nas CETc e TECs (linhagem 2BH4), utilizou-se o ensaio de imunofluorescência indireta, com marcadores específicos para fibronectina e laminina. Células não tratadas foram consideradas controles.

Em CETc, no que se refere à deposição de fibronectina, não foi possível observar alteração desta glicoproteína nas células tratadas com PRL, quando comparadas ao grupo controle (Figura 10A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento não altera deposição de fibronectina quando comparado ao grupo controle (Figura 10B).

Em células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4) constatou-se pela análise qualitativa (Figura 11 A) e quantitativa (Figura 11B) que o tratamento com a PRL também não foi capaz de alterar a deposição de fibronectina.

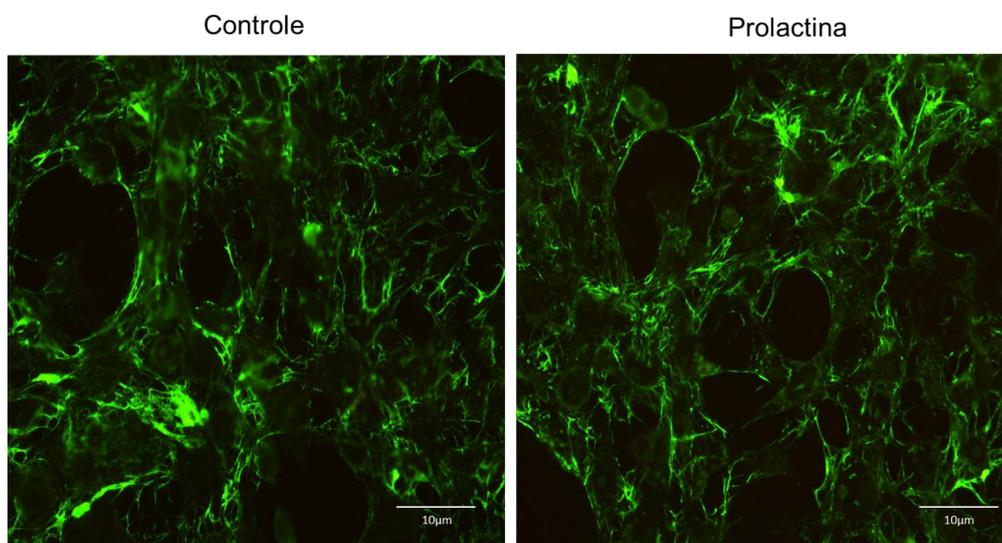
**Figura 10.** A prolactina não altera a deposição de fibronectina por células estromais tímicas.



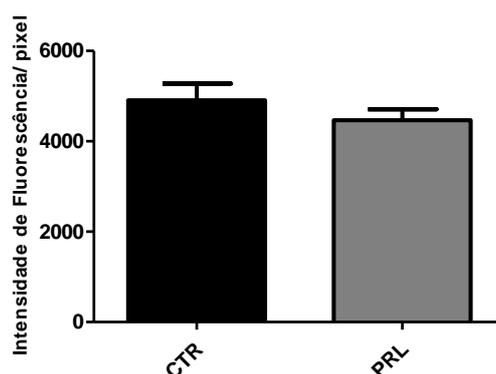
As CETc do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a deposição de fibronectina. Em verde está marcada a fibronectina e em azul, o núcleo. Aumento 200x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 15 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. A análise estatística foi feita com o teste t.

**Figura 11.** A prolactina não altera a deposição de fibronectina por células epiteliais tímica.

A



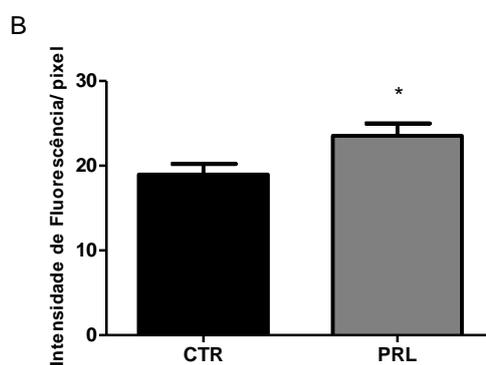
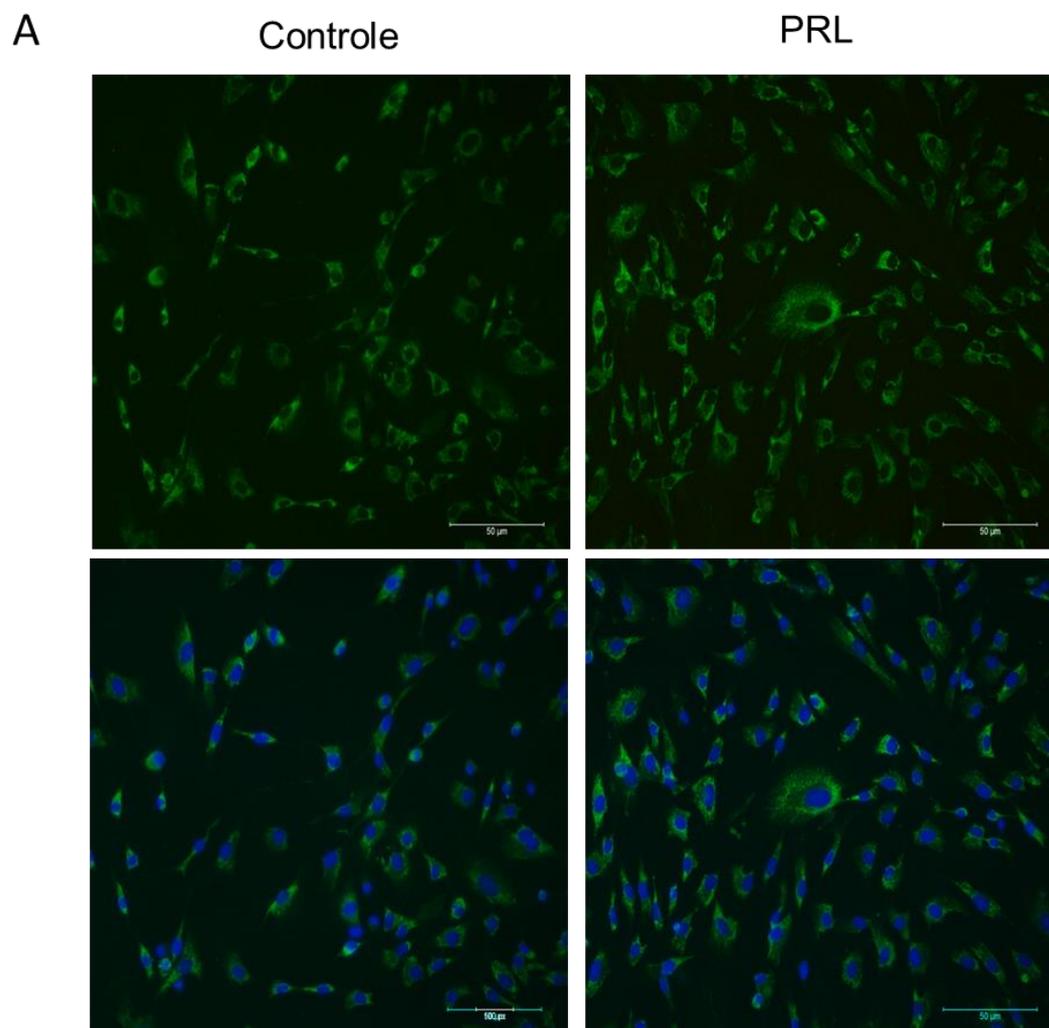
B



As TECs (linhagem 2BH4) do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a deposição de fibronectina. Em verde está marcada a fibronectina. Aumento 400x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 15 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. A análise estatística foi feita com do teste t.

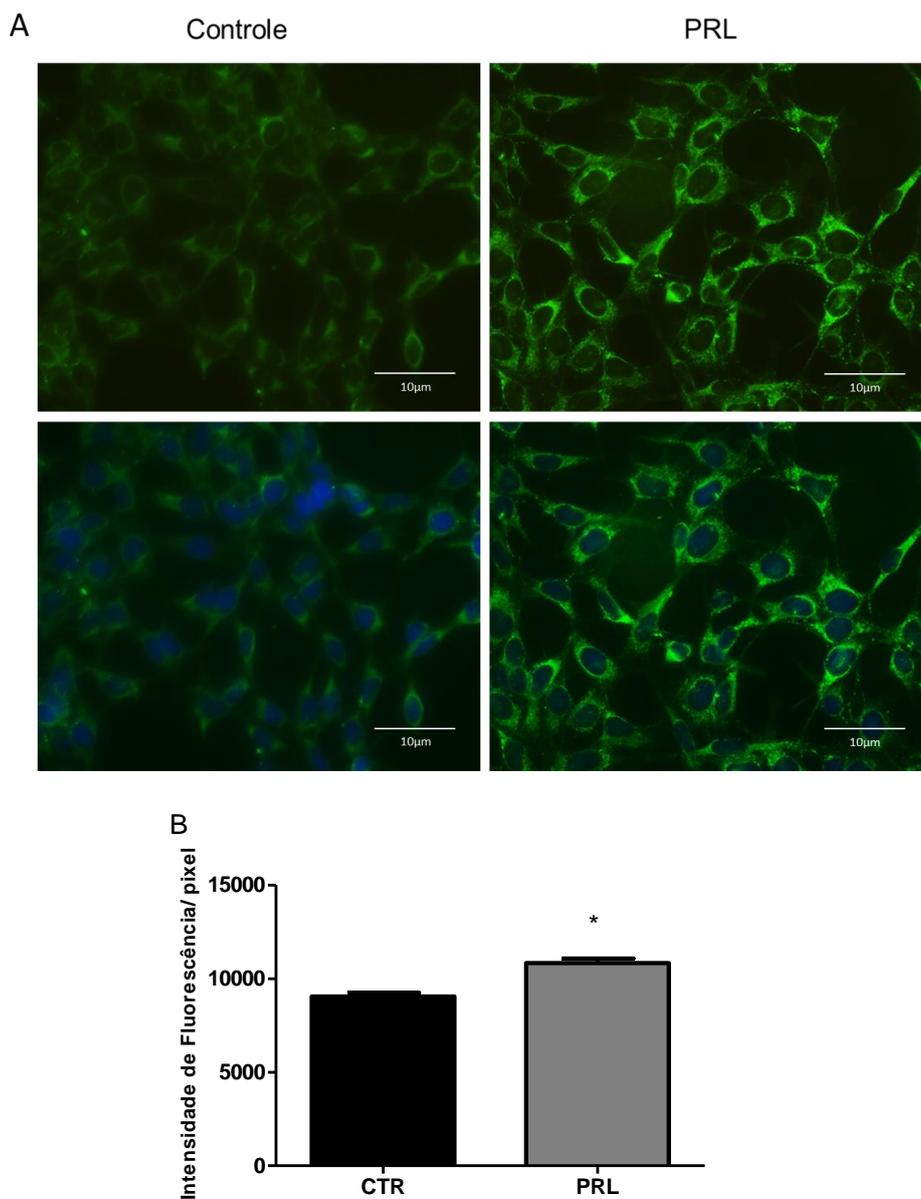
Em relação a laminina em CETc, conforme demonstrado na Figura 12A, foi observado pela análise qualitativa um aumento da deposição desta glicoproteína pelas CETc, quando tratadas com PRL e comparadas ao grupo controle. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento aumenta (12%) a deposição de laminina quando comparado ao grupo controle (Figura 12B). Em TECs (linhagem 2BH4), o mesmo efeito foi observado, no qual constatou-se pela análise qualitativa (Figura 13 A) e quantitativa (Figura 13B) que o tratamento com a PRL foi capaz de aumentar de forma significativa (34%) a deposição de laminina.

**Figura 12.** A prolactina aumenta a deposição de laminina por células estromais tímicas



As CETc do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a deposição de laminina. Em verde está marcada a laminina e em azul, o núcleo. Aumento 200x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 15 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. (\*)  $p < 0,05$  estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita com o teste t.

**Figura 13.** A prolactina aumenta a deposição de laminina por células epiteliais tímica.



As TECs (linhagem 2BH4) do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a produção de laminina. Em verde está marcada a laminina. Aumento 400x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 15 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. (\*)  $p < 0,05$  estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita com o teste t.

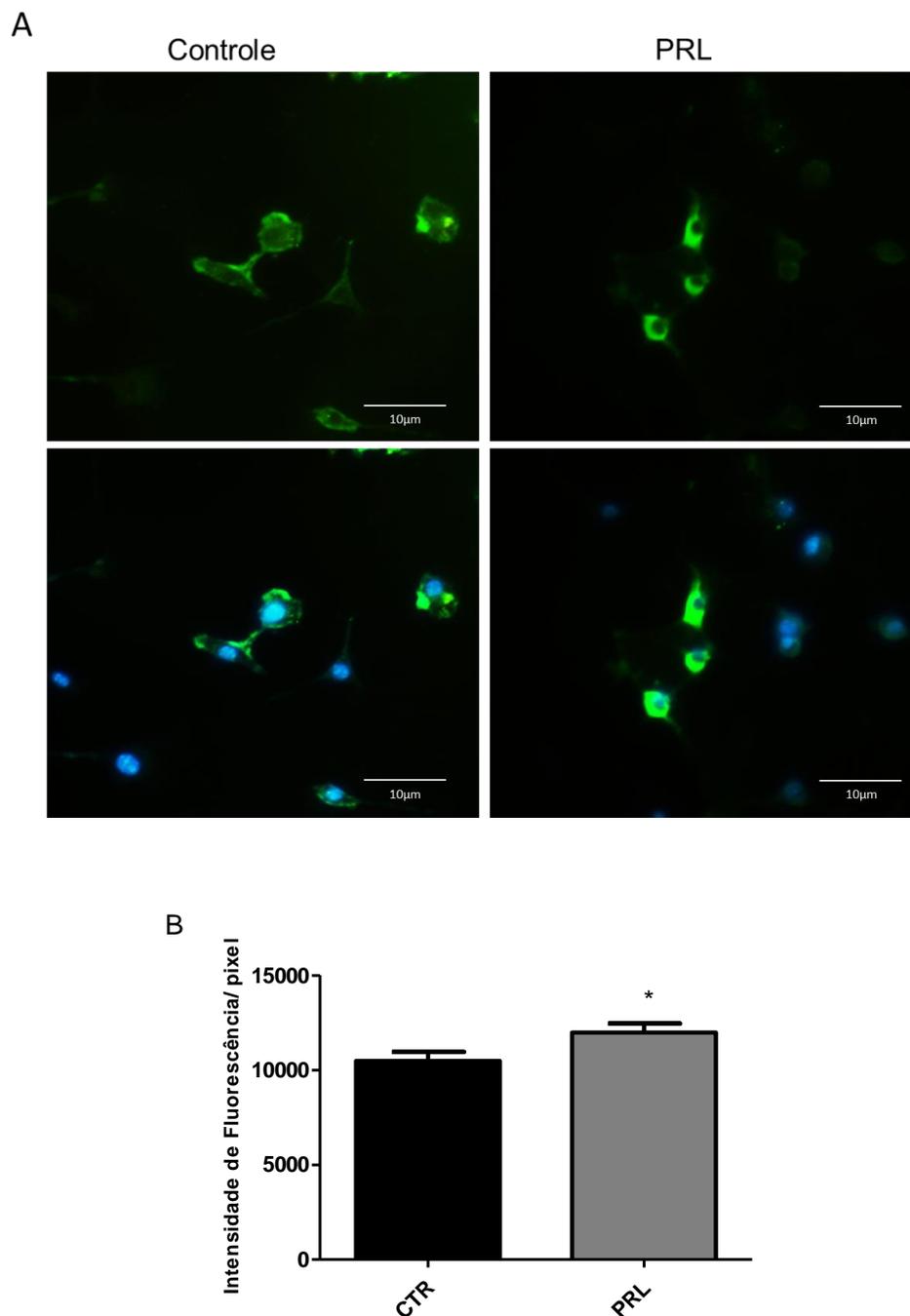
#### 5.4 A Prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células estromais e células epiteliais tímica

Com o objetivo de avaliar a expressão da quimiocina CXCL12 em células estromais e células epiteliais tímica após tratamento com prolactina

(10 ng/mL), CETc e TECs (linhagem 2BH4) foram plaqueadas, tratadas por 24 horas, fixadas e marcadas com anticorpos anti-CXCL12. Células não tratadas foram consideradas controles.

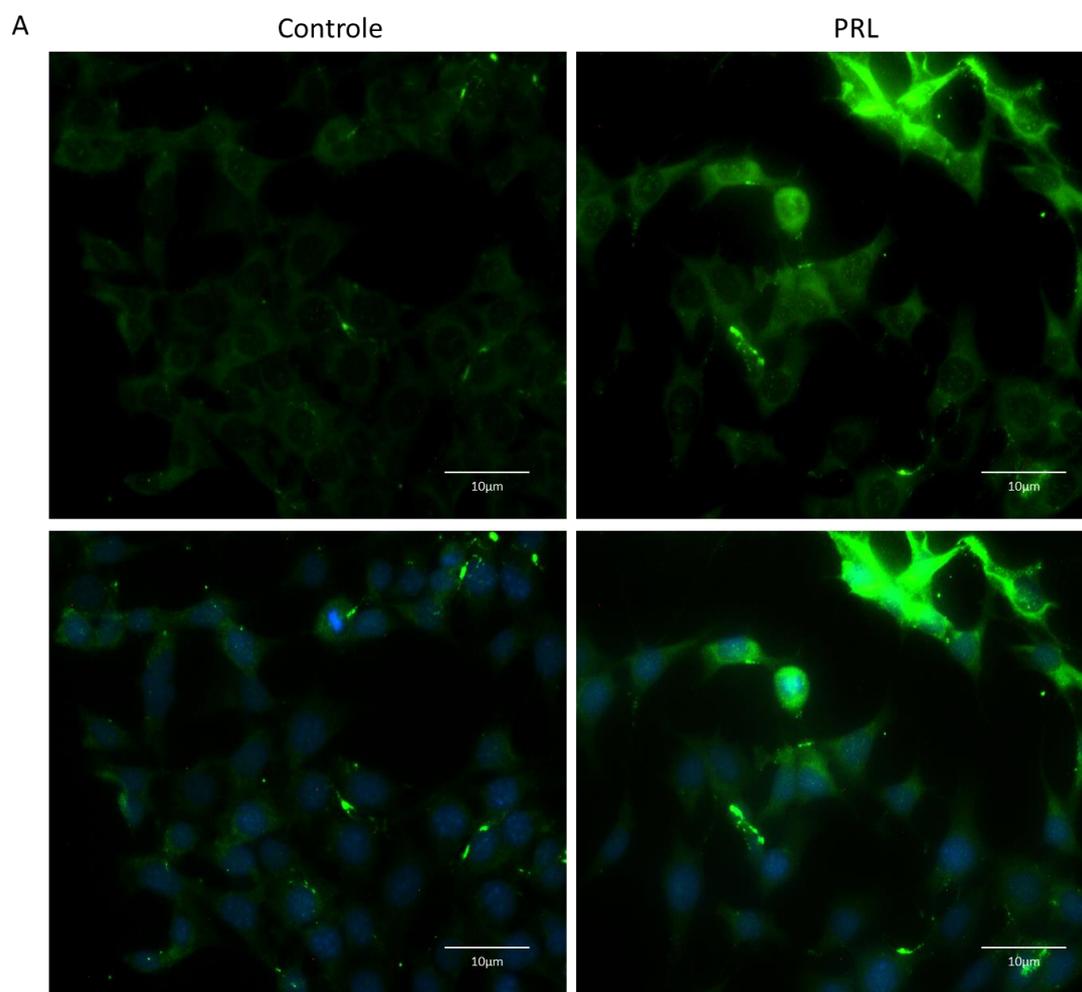
Em relação as CETc, conforme demonstrado na Figura 14A, foi observado pela análise qualitativa um aumento (18%) da marcação da quimiocina CXCL12, quando estas células foram tratadas com PRL e comparadas ao grupo controle. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento estimula de forma significativa a produção desta quimiocina nas CETc quando comparada ao grupo controle (Figura 14B). Resultado semelhante foi constatado na linhagem celular de TECs (Figura 15A,B), na qual foi possível observar pela análise qualitativa e quantitativa um aumento (135%) da marcação da quimiocina CXCL12, quando estas células foram tratadas com PRL e comparadas ao grupo controle.

**Figura 14.** A prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células estromais tímica.

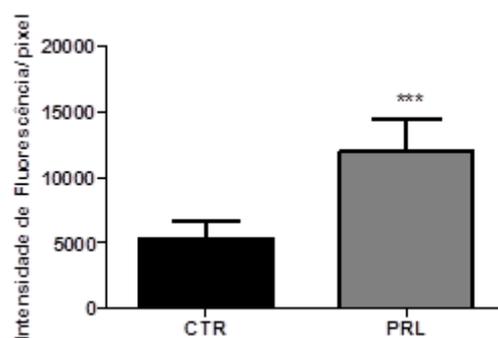


As CETc do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a marcação de CXCL12. Em verde está marcada a CXCL12 e em azul, o núcleo. Aumento 400x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 12 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. \* $p < 0,05$  estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (CTR). A análise estatística foi feita com do teste t.

**Figura 15.** A prolactina aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em células epiteliais tímicas.



B



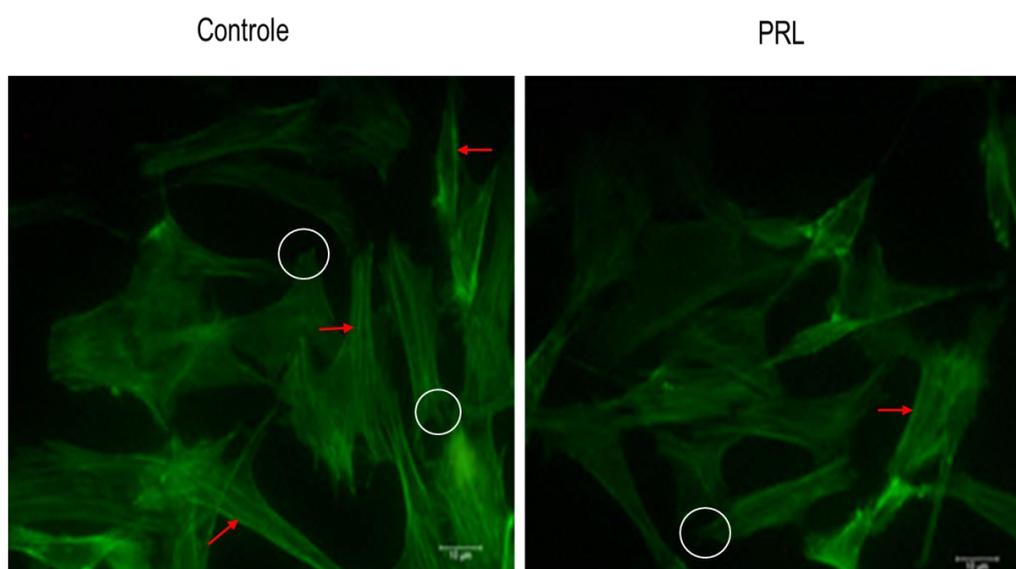
As TECs (linhagem 2BH4) do grupo controle e tratadas com PRL (10 ng/mL) por 24 horas. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram a marcação de CXCL12. Em verde está marcada a CXCL12 e em azul, o núcleo. Aumento 400x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 12 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. \* $p < 0,05$  estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita com o teste t.

### 5.5 Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células estromais e células epiteliais tímica

Com o objetivo de investigar se a PRL está envolvida na polimerização do citoesqueleto de F-actina em CETc e TECs (linhagem 2BH4), foi realizada a marcação direta da F-actina por faloidina. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

Foi constatado que as CETc do grupo controle apresentara-se mais espalhadas, com maior volume citoplasmático, evidenciando lamelipódios largos e fibras de estresse paralelas ao eixo celular. No grupo tratado com PRL, as células mostraram o citoesqueleto de F-actina mais alongado, evidenciando uma morfologia fusiforme, com menos ramificações, citoplasma mais condensado e lamelipódios menos evidentes (Figura 16).

**Figura 16.** Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células estromais tímica

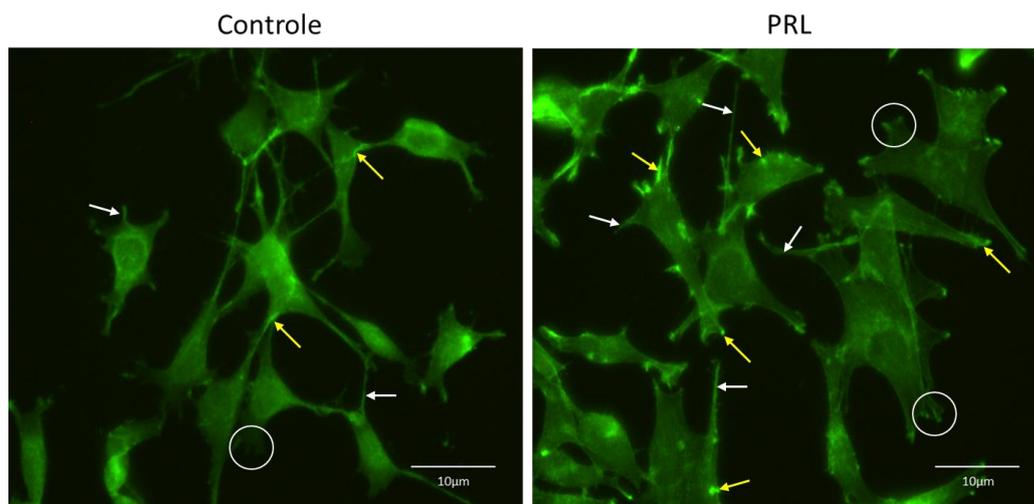


As CETc foram tratadas com prolactina na concentração de 10 ng/mL durante 24h. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Com o uso de faloidina foi possível marcar o citoesqueleto (em verde) e observar as alterações nos lamelipódios (círculos), fibras de estresse (setas vermelhas) e alongamento celular induzidas pelo tratamento por 24 horas com PRL. Barra de escala= 10µm.

Em relação as TECs (linhagem 2BH4) foi constatado no grupo controle que estas apresentaram-se com morfologia arredondada, pouco volume citoplasmático e filopódios evidentes. No grupo tratado com PRL, as células

mostraram o citoesqueleto de F-actina mais alongado, evidenciando uma morfologia fusiforme, citoplasma mais condensado, com evidentes filopódios e lamelipódios, além de complexos de adesão focal bastante evidentes (Figura 17).

**Figura 17.** Efeito da prolactina no citoesqueleto de F-actina em células epiteliais tímicas.



As TECs (linhagem 2BH4) foram tratadas com prolactina na concentração de 10 ng/mL durante 24h. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Com o uso de faloidina foi possível marcar o citoesqueleto (em verde) e observar as alterações nos lamelipódios (círculos), filopódios (seta branca) e complexos de adesão focal (seta amarela) induzidos pelo tratamento por 24 horas com PRL. Barra de escala= 10µm.

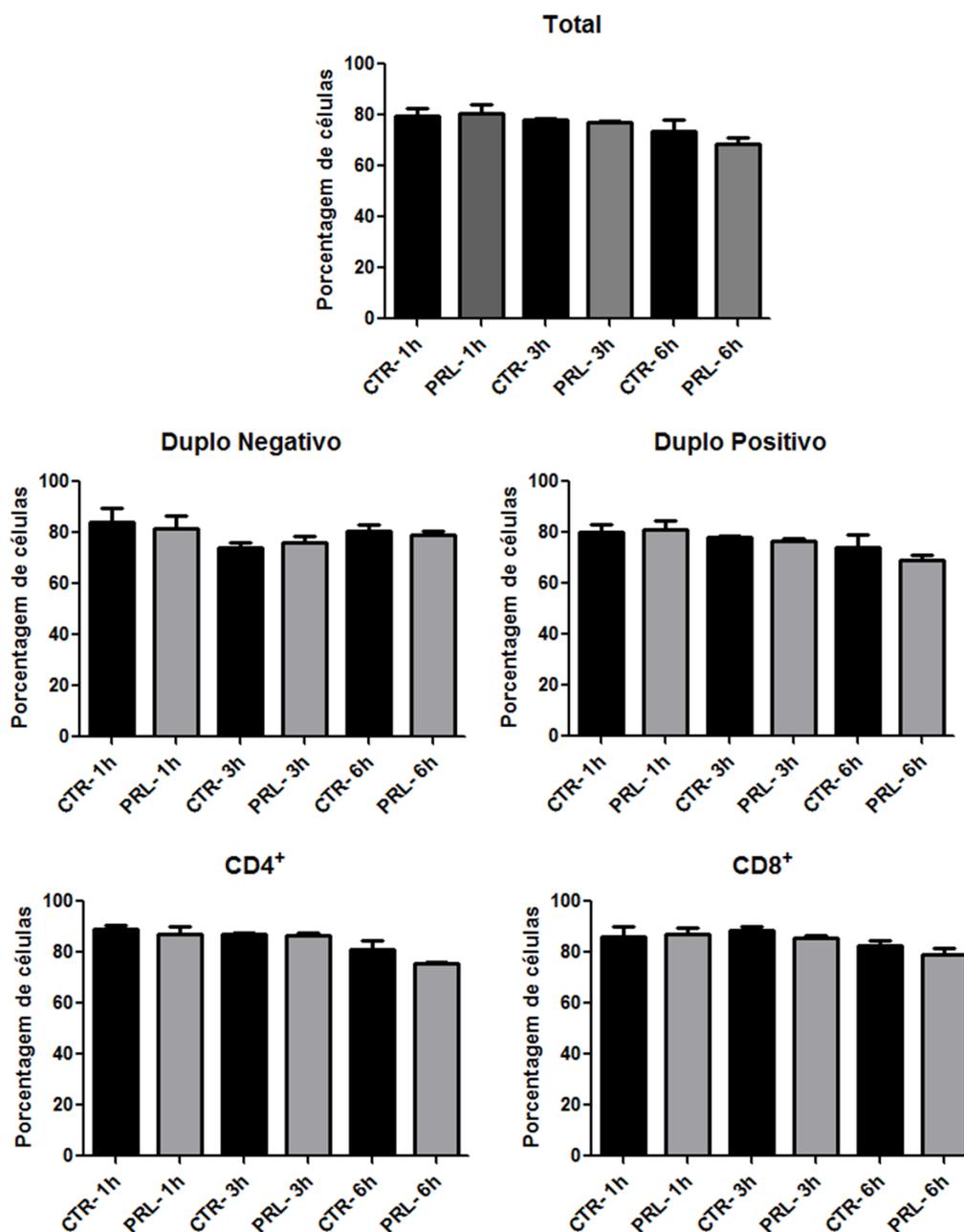
### 5.6 Efeito da prolactina sobre a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 em timócitos

A interação de moléculas de matriz extracelular com os timócitos ocorre por meio da ligação de receptores da superfície celular com os ligantes da matriz. Assim, despertou-se o interesse em avaliar a expressão de receptor para a fibronectina, o CD49e (cadeia alfa da integrina  $\alpha 5\beta 1$ /VLA5) e de receptor para a laminina, o CD49f (cadeia alfa da integrina  $\alpha 6\beta 1$ /VLA6), na superfície dos timócitos por citometria de fluxo.

Foi constatado que um alto percentual de timócitos totais e nas diferentes subpopulações expressaram em sua superfície VLA5 e VLA6 conforme mostrado nas figuras 18 e 19, respectivamente. O tratamento com prolactina na concentração de 10 ng/mL, não alterou o percentual de células

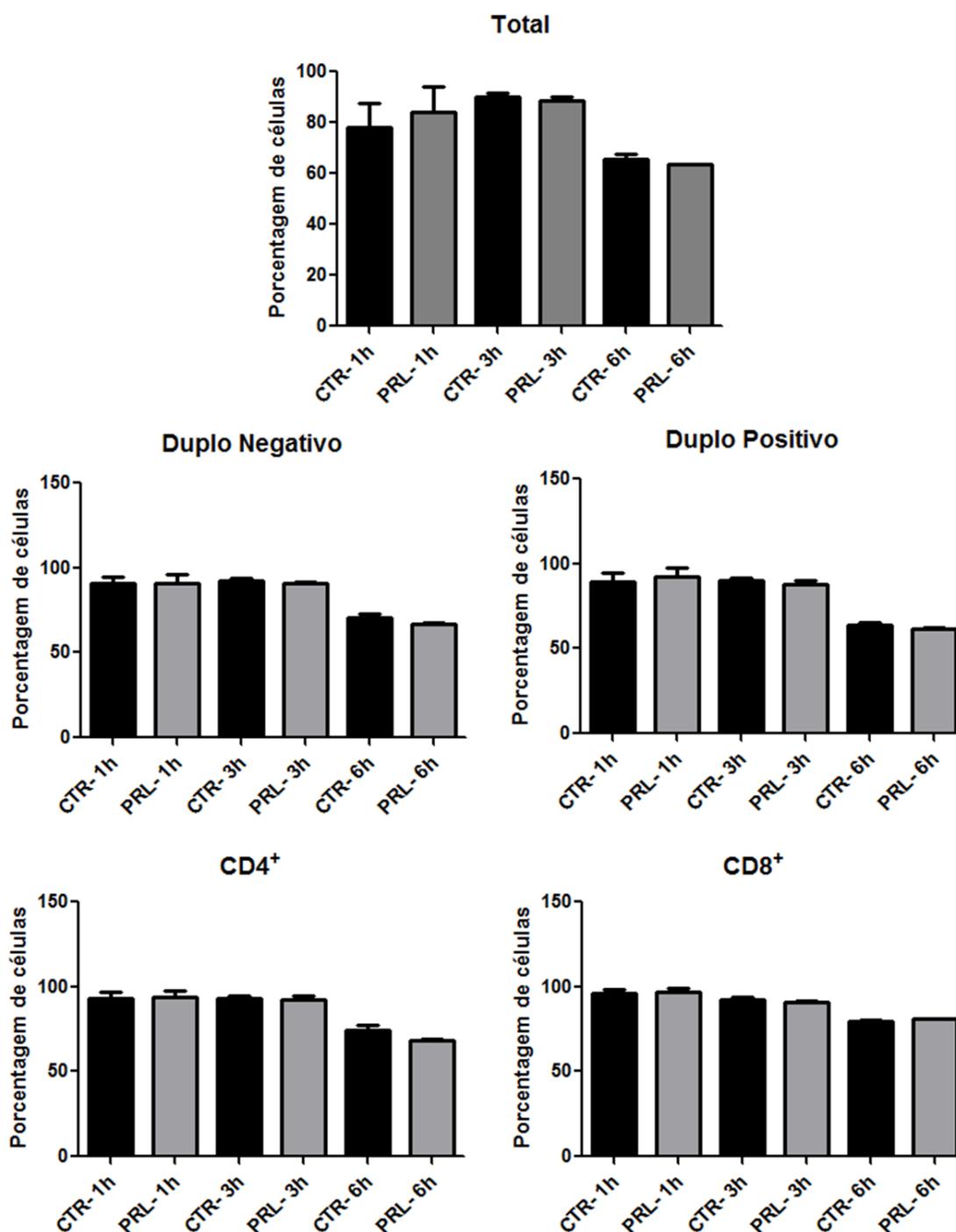
que expressam VLA-5 (Figura 18) e VLA-6 (Figura 19) em nenhum dos tempos testados (1h, 3h, 6h) quando comparado ao controle.

**Figura 18.** Efeito da prolactina na expressão da integrina VLA-5 na superfície de timócitos totais e suas subpopulações.



Timócitos foram tratados ou não com prolactina (10 ng/mL) por 1, 3 ou 6 horas e analisados por citometria de fluxo. As barras representam média  $\pm$  EPM do percentual de timócitos totais e suas subpopulações que expressam a integrina VLA-5.  $n=5$  por grupo. A análise estatística foi realizada com one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey.

**Figura 19.** Efeito da prolactina na expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos totais e suas subpopulações.



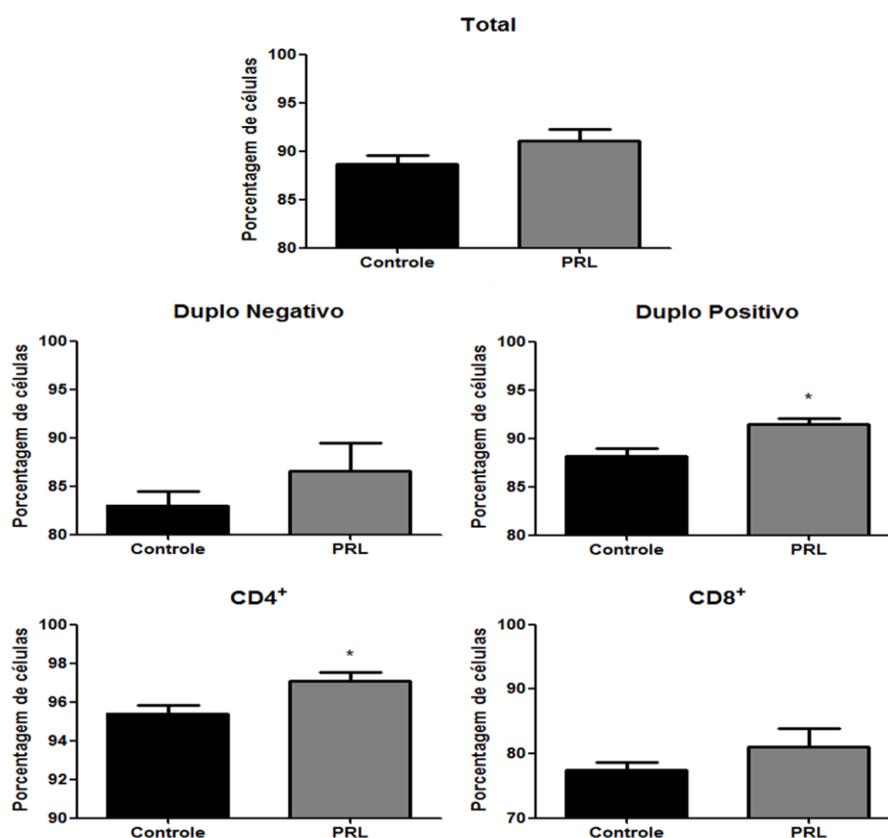
Timócitos foram tratados ou não com prolactina (10 ng/mL) por 1, 3 ou 6 horas e analisados por citometria de fluxo. As barras representam média  $\pm$  EPM do percentual de timócitos totais e suas subpopulações que expressam a integrina VLA-6.  $n=5$  por grupo. A análise estatística foi realizada com one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey.

## 5.7 Efeito da prolactina na expressão do CXCR4 em timócitos

Para avaliar a expressão do receptor da quimiocina CXCL12 em timócitos após o tratamento com PRL por 1 hora, as células foram marcadas com anticorpo anti-CXCR4, e posteriormente a análise foi realizada por citometria de fluxo. Timócitos não tratados foram utilizados como controle.

Foi possível observar um aumento da expressão do CXCR4 no percentual de timócitos totais quando comparado ao grupo controle. Quando foi avaliada a expressão do CXCR4 nas diferentes subpopulações de timócitos, observou-se que há um aumento no percentual de timócitos duplo positivo e simples positivo CD4<sup>+</sup> quando comparados ao grupo controle. Não houve alteração na expressão deste receptor nos timócitos duplo negativo e simples positivo CD8<sup>+</sup> (Figura 20).

**Figura 20.** Efeito da prolactina na expressão do CXCR4 em timócitos



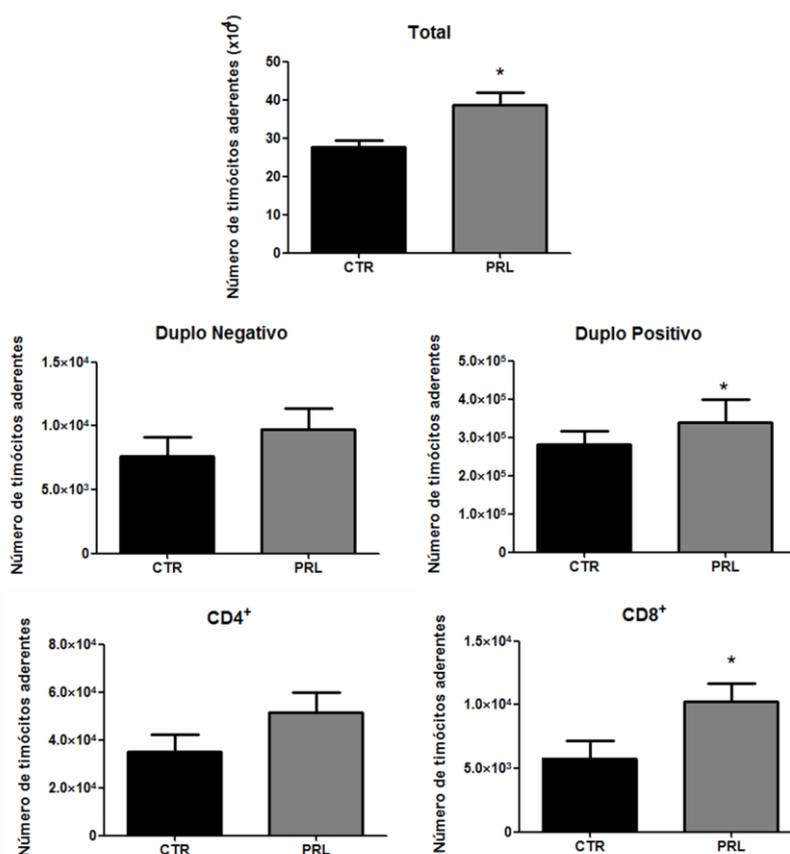
Timócitos tratados ou não com prolactina (10 ng/mL) por 1 hora. Os gráficos mostram a expressão do CXCR4 na superfície de timócitos totais e nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, analisadas por citometria de fluxo, em termos de porcentagem de células que expressam o receptor. Os resultados estão representados sob a forma de média  $\pm$  EPM. A análise estatística foi realizada com teste t. \* P < 0,05 vs CTR. n=6 por grupo.

## 5.8 Efeito da prolactina sobre a adesão de timócitos às células estromais e células epiteliais tímicas

As CETc e as CETs (linhagem 2BH4) foram pré-tratadas com PRL (10 ng/mL) para avaliar o efeito sobre estas células no processo de adesão com os timócitos.

Em relação as CETc, após uma hora de adesão, os timócitos aderentes foram contados e foi observado que a PRL estimulou de forma significativa um aumento no número de timócitos totais aderidos ao estroma. Este resultado também foi observado nas subpopulações duplo positivo ( $CD4^+CD8^+$ ) e simples positivo ( $CD8^+$ ) (Figura 21).

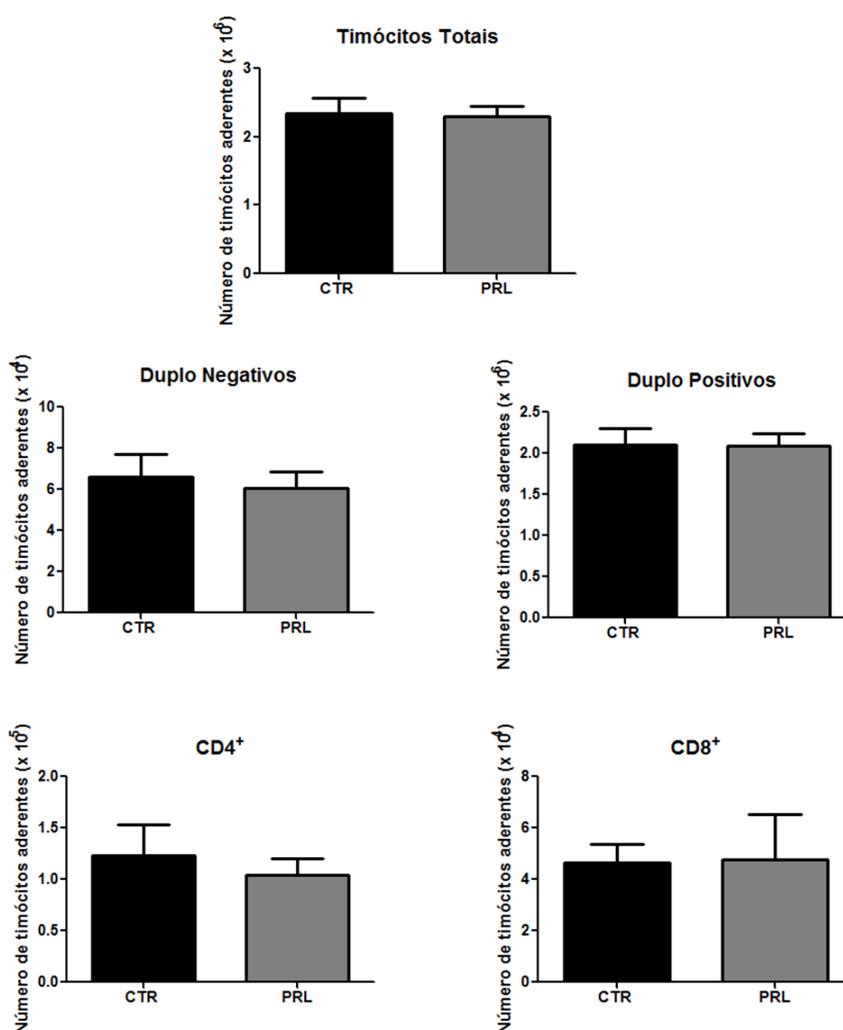
**Figura 21.** A prolactina estimula a adesão de timócitos às células estromais tímicas.



As CETc foram pré-tratadas com PRL (10 ng/mL) e os timócitos foram submetidos à adesão por uma hora. Os timócitos aderentes foram recolhidos, contados e marcados para citometria. PRL aumentou significativamente o número de timócitos e nas subpopulações duplo positivo e  $CD8^+$ . Barras representam a média  $\pm$  EPM. n=6, \*p<0,05; em relação ao controle. A análise estatística foi feita com do teste t.

Em relação ao epitélio tímico (linhagem 2BH4), o pré-tratamento das TECs com PRL na concentração de 10 ng/mL não interferiu no número de timócitos totais aderidos às células epiteliais quando comparado ao grupo controle, assim como não alterou o número de células nas diferentes subpopulações de timócitos (Figura 22).

**Figura 22.** A prolactina não altera a adesão de timócitos às células epiteliais tímicas



As TECs (linhagem 2BH4) foram pré-tratadas com PRL (10 ng/mL) e os timócitos foram submetidos à adesão por uma hora. Os timócitos aderentes foram recolhidos, contados e marcados para citometria. Barras representam a média  $\pm$  EPM. n=5. A análise estatística foi feita com do teste t.

### 5.9 Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente as células estromais e epiteliais tímicas

A capacidade migratória de timócitos foi avaliada em sistema de *transwell*. Para isso, as CETc e as TECs (linhagem 2BH4) foram plaqueadas e pré-tratadas ou não com PRL (10 ng/mL), por 24 horas. Após este período foi adicionada ou não, a quimiocina CXCL12 (200 ng/mL) no meio condicionado presente na câmara inferior do *transwell* e na câmara superior foram inseridos os timócitos. Após 3 horas de migração, os timócitos migrantes foram recolhidos, contados, marcados com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo.

Ao analisar a migração frente as CETc do número absoluto de timócitos totais migrantes, foi observado que o pré-tratamento com PRL (10 ng/mL) foi capaz de aumentar o número total de timócitos migrantes quando comparado ao grupo controle. Este aumento também foi observado na presença da quimiocina isolada ou na combinação com a PRL. Ainda, foi observado um aumento significativo na migração de timócitos totais na presença da CXCL12 em combinação com a PRL quando comparado ao grupo PRL (Figura 23A).

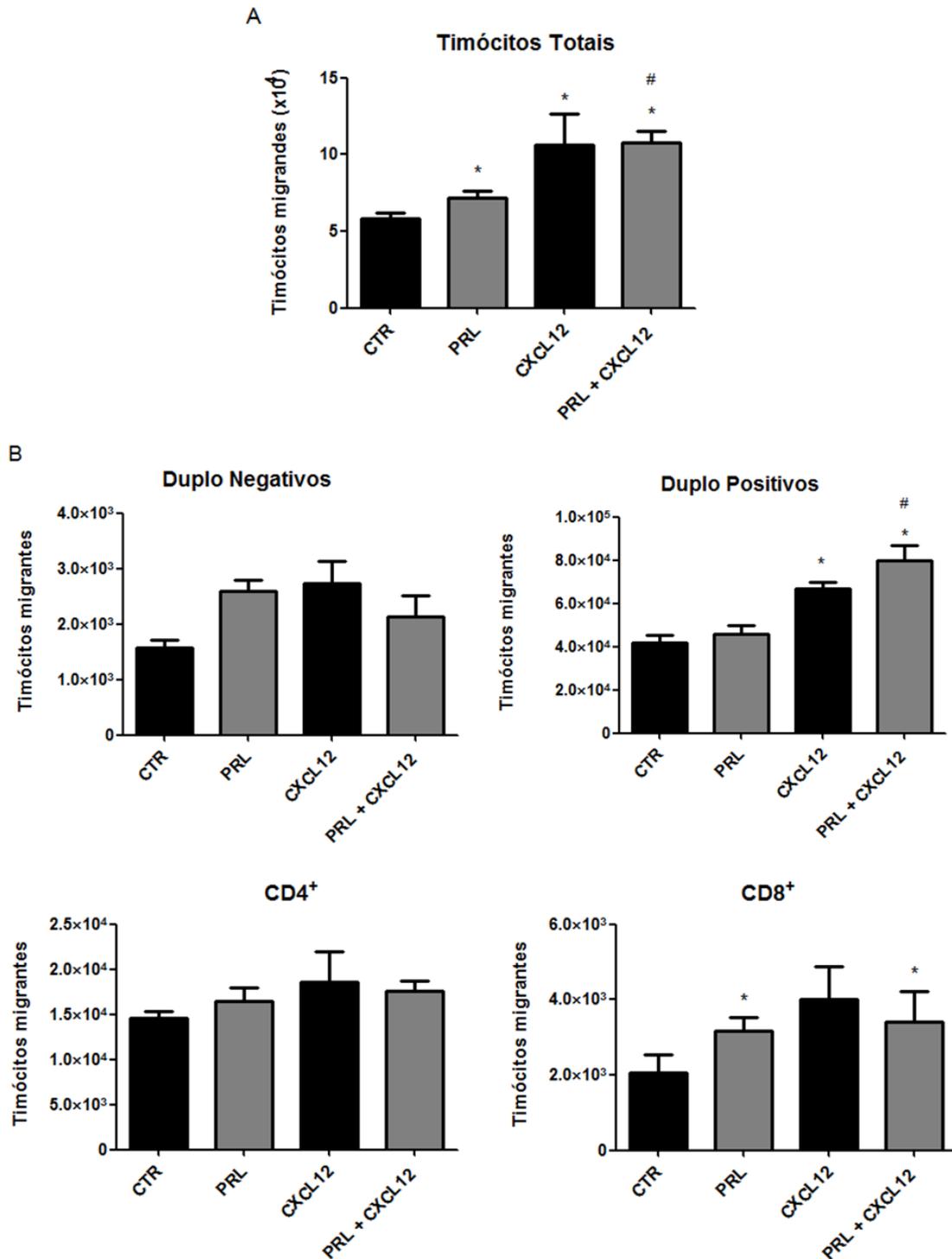
Quando foram avaliadas as subpopulações, verificou-se que em timócitos duplo positivo e timócitos CD8<sup>+</sup> ocorreu um aumento no número de células migrantes na presença da CXCL12 em combinação com a PRL quando comparado ao grupo controle. Em relação aos timócitos duplo positivo este aumento também foi observado quando comparado ao grupo PRL. Interessante notar que somente na subpopulação CD8<sup>+</sup> ocorreu um aumento significativo de células migrantes no grupo PRL quando comparado ao grupo controle (Figura 23B).

Ao analisar a migração frente as TECs (linhagem 2BH4) do número absoluto de timócitos totais migrantes, foi observado que o pré-tratamento com PRL (10 ng/mL) sem a presença da CXCL12 não foi capaz de aumentar o número total de timócitos migrantes quando comparado ao grupo controle. A presença da CXCL12 foi capaz de aumentar o número total de timócitos migrantes quando comparado ao grupo controle e ao grupo PRL. Ainda, foi observado um aumento significativo na migração de timócitos totais na

presença da CXCL12 em combinação com a PRL quando comparado aos demais grupos (CTR, PRL e CXCL12) (Figura 24A).

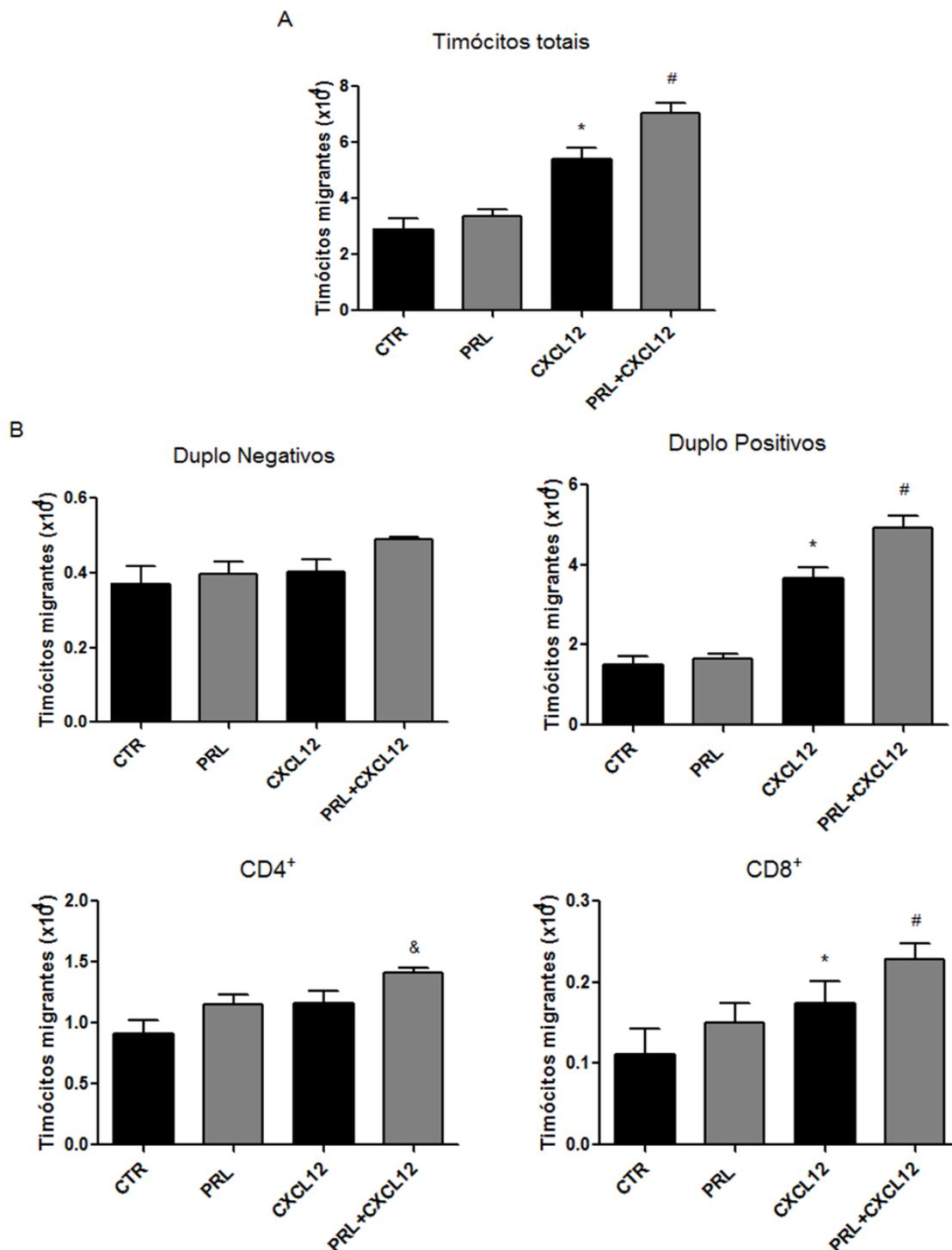
Quando foram avaliadas as subpopulações migrantes, verificou-se que em timócitos duplo positivo e timócitos CD8<sup>+</sup> ocorreu um aumento no número de células migrantes na presença da CXCL12 isolada ou em combinação com a PRL quando comparado ao grupo controle e ao grupo PRL. Interessante notar que nas subpopulações duplo positivo e CD8<sup>+</sup> ocorreu um aumento significativo de células migrantes no grupo PRL+CXCL12 quando comparado ao grupo somente com a CXCL12. Ainda, foi observado um aumento significativo na migração das células CD4<sup>+</sup> do grupo PRL+CXCL12 quando comparado ao grupo controle (Figura 24B).

**Figura 23.** Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente às células estromais tímicas.



As CETc foram pré-tratados com PRL (10 ng/mL) e a migração foi desenvolvida por 3 horas. Em A, é mostrado o número total de timócitos migrantes. Em B, o número absoluto das subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, analisadas por citometria de fluxo. As barras representam médias  $\pm$  EPM. A análise estatística foi feita com do teste ANOVA, seguido do teste de Tukey. n=6, \* p<0,05 em relação ao controle, # p<0,05 em relação a PRL.

**Figura 24.** Efeito da prolactina sobre a migração de timócitos frente às células epiteliais tímicas



As TECs (linhagem 2BH4) foram pré-tratadas com PRL (10 ng/mL) e a migração foi desenvolvida por 3 horas. Em A, é mostrado o número total de timócitos migrantes. Em B, o número absoluto das subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, analisadas por citometria de fluxo. As barras representam médias  $\pm$  EPM. A análise estatística foi feita com do teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.  $n=6$ , \*  $p<0,05$  em relação a CTR e PRL, #  $p<0,05$  em relação a CTR, PRL e CXCL12, &  $p<0,05$  em relação a CTR.

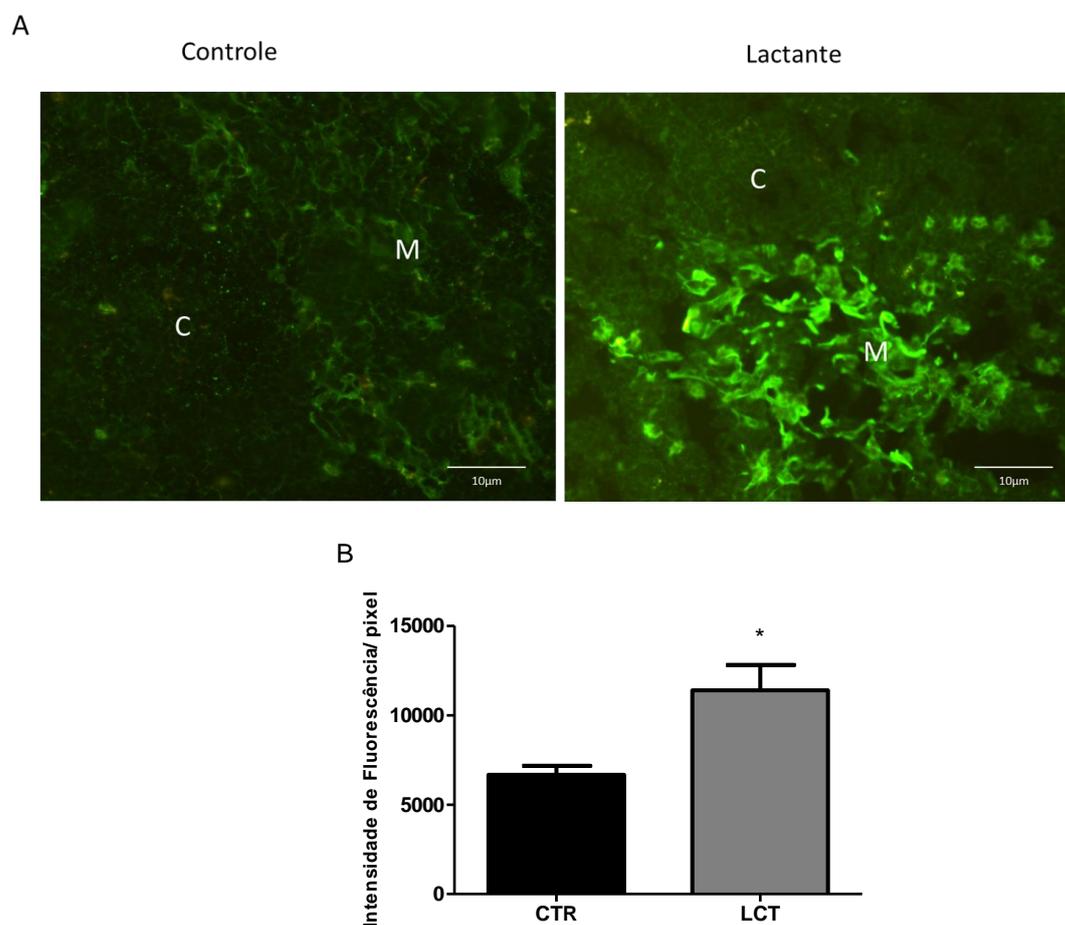
### **5.10 Expressão da quimiocina CXCL12 no microambiente tímico de camundongos fêmeas lactantes**

Considerando os altos níveis de PRL durante a lactação, buscou-se avaliar a expressão da quimiocina CXCL12 no microambiente tímico de fêmeas lactantes (LCT) e não lactantes (controles-CTR). Para isso, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência indireta em cortes congelados do timo com anticorpo específico para a quimiocina CXCL12.

Foi constatado pela análise qualitativa que o timo proveniente de fêmeas não-lactantes (controle) expressa a quimiocina CXCL12 tanto na região cortical, quanto na região medular. Já o timo proveniente de fêmeas lactantes apresentou uma maior expressão da quimiocina tanto na região cortical como também na região medular quando comparado ao grupo controle conforme mostrado na figura 25 A.

A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que a lactação estimulou de forma significativa a expressão da quimiocina CXCL12 quando comparado ao grupo controle (Figura 25 B).

**Figura 25.** Expressão da quimiocina CXCL12 no microambiente tímico de camundongos fêmeas lactantes



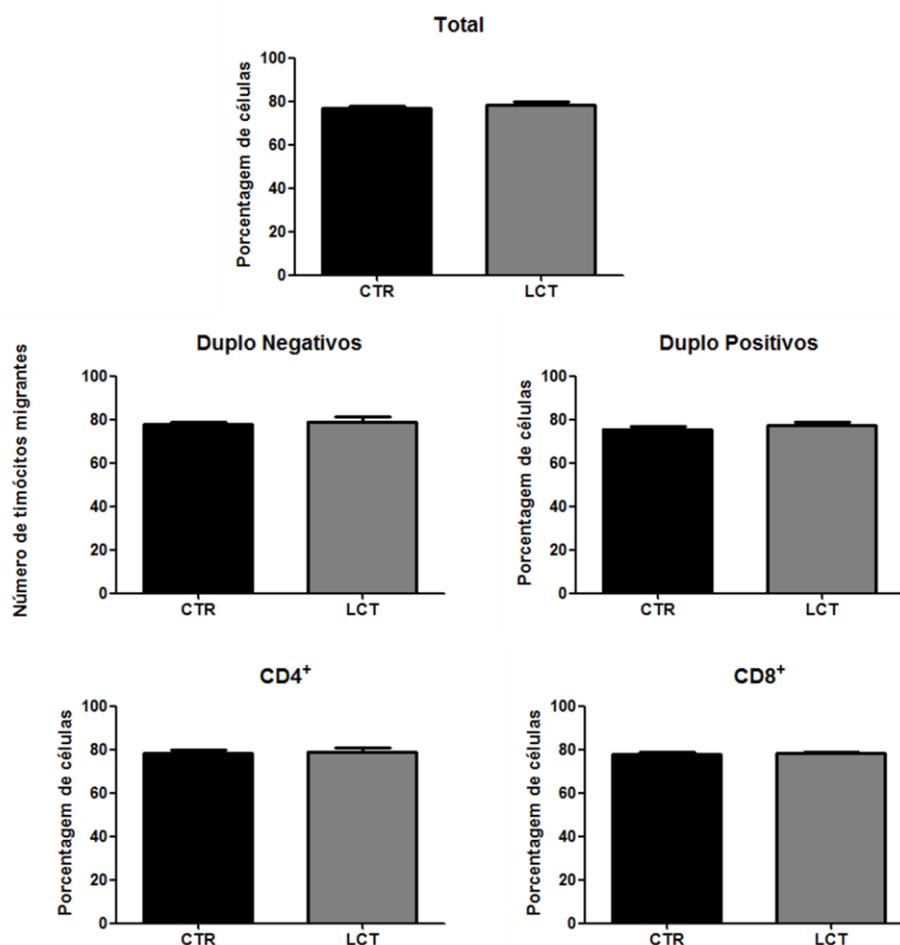
Timo de camundongos fêmeas lactantes (LCT) e não lactantes (CTR) submetidos ao ensaio de imunofluorescência. **(A)** Fotomicrografias representativas mostram em verde a marcação de CXCL12. C= região cortical; M= região medular. Aumento 400x. **(B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. As barras representam média  $\pm$  EPM da intensidade de fluorescência a partir de 10 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. \*  $p < 0,05$  estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. A análise estatística foi feita com o teste t.

### 5.11 Expressão de CXCR4 em timócitos de camundongos fêmeas lactantes

Para avaliar a expressão do receptor da quimiocina CXCL12 em timócitos frescos provenientes de camundongos fêmeas lactantes, as células foram marcadas com anticorpo anti-CXCR4, e posteriormente a análise foi realizada por citometria de fluxo. Timócitos de fêmeas não-lactantes foram utilizados como controle.

Foi observado que um alto percentual de timócitos totais e nas diferentes subpopulações expressaram em sua superfície CXCR4 conforme mostrado na figura 26. Entretanto, não foi constatado alteração na expressão do CXCR4 no percentual de timócitos totais e das subpopulações, quando comparados os grupos de fêmeas lactantes com as fêmeas não lactantes (Figura 26).

**Figura 26.** Expressão do receptor de quimiocina CXCR4 em timócitos de camundongos fêmeas lactantes.



Timócitos obtidos de fêmeas controle (CTR) e lactantes (LCT). Os gráficos mostram a expressão do CXCR4 na superfície de timócitos totais e nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, analisadas por citometria de fluxo, em termos de porcentagem de células que expressam o receptor. Os resultados estão representados sob a forma de média  $\pm$  EPM. A análise estatística foi realizada com teste t. n=6 por grupo.

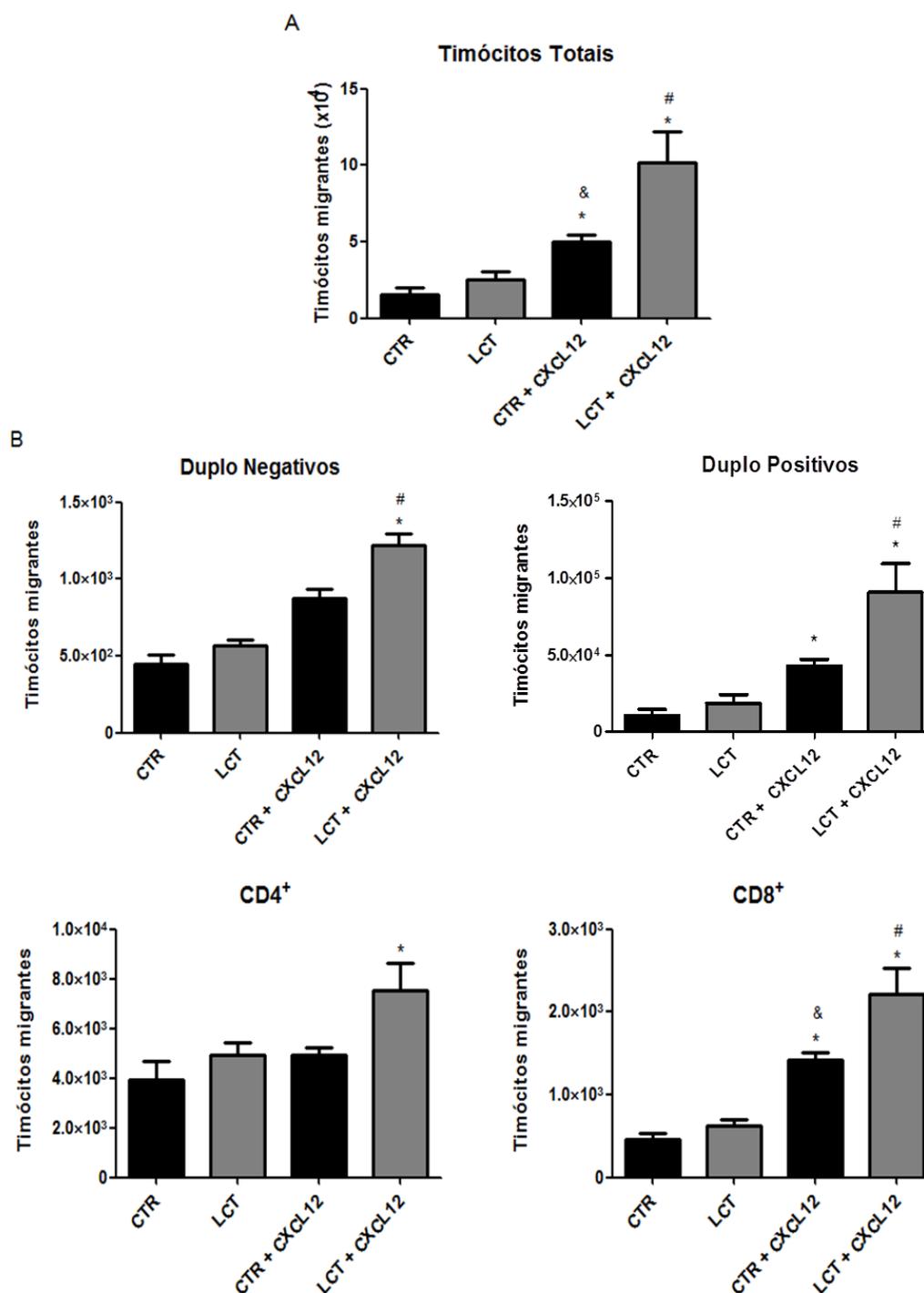
### 5.12 Efeito da lactação na migração de timócitos frente a quimiocina CXCL12

Para avaliar a capacidade migratória de timócitos frescos provenientes de camundongos fêmeas lactantes (LCT) e não lactantes (CTR) frente a quimiocina CXCL12. A capacidade migratória de timócitos foi avaliada em sistema de transwell. Após 3 horas de migração, os timócitos migrantes foram recolhidos, contados, marcados com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo.

Foi constatado um aumento no número de timócitos totais migrantes de LCT quando comparados ao seu CTR ( $p=0,07$ ). Quando os grupos foram avaliados na presença do quimioatraente, a CXCL12, observou-se um aumento significativo das células totais migrantes em relação aos seus respectivos controles. Ainda, foi observado um aumento significativo na migração de timócitos totais do grupo LCT na presença da CXCL12 quando comparado aos demais grupos (Figura 27A)

Quando foram avaliadas as subpopulações, verificou-se um aumento significativo de células migrantes em todas as subpopulações de timócitos provenientes de LTC quando na presença da CXCL12. Nos timócitos duplo positivo este aumento também foi observado nos timócitos das fêmeas CTR na presença da CXCL12. Em relação a subpopulação  $CD8^+$  ocorreu um aumento de células migrantes de LCT quando comparados ao seu CTR ( $p=0,06$ ). Quando os grupos foram avaliados na presença do quimioatraente, observou-se um aumento significativo dos timócitos  $CD8^+$  migrantes em relação aos seus respectivos controles e este aumento foi evidenciado no grupo LCT na presença da CXCL12 (Figura 27B).

**Figura 27.** Efeito da lactação na migração de timócitos frente a quimiocina CXCL12.



Os timócitos de animais controles (CTR) e lactantes (LCT) foram submetidos à migração por 3 horas. Em A, é mostrado o número total de timócitos migrantes. Em B, o número absoluto das subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, analisadas por citometria de fluxo. As barras representam médias  $\pm$  EPM. A análise estatística foi feita com do teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.  $n=5$ , \*  $p<0,05$  em relação ao CTR, #  $p<0,05$  em relação ao LCT e ao CTR+CXCL12, &  $p<0,05$  em relação ao LCT.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo abordamos questões relacionadas à participação da PRL nos compartimentos linfóide e estromal do microambiente tímico, procurando assim esclarecer questões sobre o papel deste hormônio na fisiologia do timo. Os resultados evidenciaram que a PRL exerce efeitos sobre as células estromais tímicas, células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4) e sobre os timócitos como foi demonstrado pela modulação da expressão de ligantes de matriz extracelular e quimiocina; reorganização do citoesqueleto; alteração na adesão de timócitos às células estromais e aumento no número de timócitos migrantes.

Tanto o desenvolvimento quanto a função do sistema imunológico envolvem interações complexas entre células linfóides e células estromais que constituem o microambiente tímico (ANDERSON et al., 1996). Estudos demonstraram que a técnica do explante tímico permitiu o estabelecimento de culturas celulares, compostas de uma mistura celular com predominância de células epiteliais e fibroblastos (CHAUDHARY et al., 2013; WANG et al., 2015).

Neste contexto, nosso estudo demonstrou que o modelo experimental desenvolvido, utilizando cultura primária para mimetizar o microambiente tímico, foi capaz de preservar os componentes epiteliais do timo, tanto as cTECs quanto as mTECs (Figura 8) o que foi demonstrado pela expressão das citoqueratinas 5 e 8, fato relevante, visto que as TECs são componentes essenciais do microambiente tímico, o que é necessário para o desenvolvimento dos timócitos e estabelecimento da tolerância aos peptídeos próprios, como os demais componentes celulares não epiteliais, presentes no timo, os fibroblastos, macrófagos e células dendríticas, componentes estes essenciais para os processos de migração e diferenciação de timócitos (BLACKBURN; MANLEY, 2004).

Neste estudo, a PRL na concentração de 10 ng/mL não alterou a viabilidade de TECs (linhagem 2BH4) e foi capaz de aumentar a viabilidade dos timócitos (Figura 9). Assim, a concentração da PRL estabelecida para o estudo foi de 10 ng/mL, não apenas pelo seu efeito na viabilidade celular, mas também foi demonstrado em estudos anteriores que esta concentração estimulou a adesão de células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC) em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) através das integrinas

VLA-4 e LFA-1 (MONTES DE OCA et al., 2005). Ainda, esta mesma concentração foi capaz de estimular *in vitro* a produção de timulina por TECs humanas e murinas e a proliferação de TECs (DARDENNE et al., 1989), bem como favorecer a sobrevivência, proliferação e diferenciação de timócitos (CARREÑO et al., 2005).

Diversos tipos celulares, respondem a sinais da matriz extracelular, bem como à sinais hormonais (GLUKHOVA; STREULI, 2013). No caso, de sinais da PRL, a regulação da MEC depende do fenótipo celular envolvido e das propriedades desta MEC circundante. Estudos mostram que o envolvimento da laminina da MEC é crucial para que diferentes tipos celulares, como as células epiteliais mamárias, por exemplo, respondam à prolactina que por sua vez é indutora de lactação (STREULI; AKHTAR, 2009).

Em nosso estudo, ao se avaliar a influência da PRL, na deposição de moléculas da matriz extracelular nas CETc e TECs (linhagem 2BH4), foi possível observar que o tratamento com PRL estimulou o aumento da produção de laminina (Figuras 12 e 13), em ambas as células, quando comparados aos grupos controles. Esses dados corroboram a estudos nos quais o tratamento de TECs com outro hormônio, o GH, induziu um aumento na deposição de laminina (DE MELLO-COELHO et al., 1997; SMANIOTTO et al., 2005). Ao ser avaliada a fibronectina, constatou-se que o tratamento não alterou sua deposição em CETc e TECs. Porém, outros estudos demonstraram um aumento na deposição de fibronectina em cultura primária de TNCs derivadas de timo murino quando tratadas com PRL (DE MELLO-COELHO et al., 1997).

Neste trabalho, quando avaliada a distribuição de moléculas de MEC nas CETc e TECs (linhagem 2BH4), foi mostrado que a expressão de proteínas da MEC tímica pode ser modulada pelo tratamento com PRL. Esses dados, juntamente com os dados da literatura, sugerem que os componentes da MEC têm participação ativa no microambiente tímico, pois permitem a correta localização dos timócitos em virtude da maior ou menor expressão de receptores de matriz; e no que se refere a laminina, a PRL modulou positivamente.

O desenvolvimento e a função dos linfócitos dependem de sua migração precisa em resposta a quimiocinas. Estudos mostram que, durante a seleção

tímica, a ligação da quimiocina CXCL12 ao seu receptor CXCR4 na superfície dos timócitos, fornece sinais para a migração e diferenciação de células T. Sabe-se que a CXCL12 é pleiotrópica, atuando também na condução de precursores de células T para microambientes específicos onde há fatores necessários para seu desenvolvimento (TRAMPONT et al., 2010; JANAS et al., 2009). A literatura mostra que a CXCL12 é expressa seletivamente pela maioria das células estromais tímicas (LUCAS et al., 2017). Desta forma, ao avaliar a expressão da CXCL12 em CETc e em TECs (linhagem 2BH4) após tratamento com PRL, foi possível observar um aumento da expressão desta quimiocina, quando comparada ao grupo controle em ambas as células (Figuras 14 e 15). Em concordância com nossos resultados, outros hormônios também são capazes de modular a expressão de quimiocinas. Por exemplo, o tratamento com GH aumenta a expressão da quimiocina CXCL12 em TNCs e no microambiente tímico (SMANIOTTO et al., 2005).

Em seguida, foi avaliado o citoesqueleto de actina, que fornece o principal suporte da célula, e sua organização é essencial para o movimento celular. Além disso, sua interação com integrinas e complexos de adesão focal, permite o movimento celular (DA SILVA et al., 2015). Neste sentido, foi possível observar em nosso estudo que a organização do citoesqueleto de F-actina das CETc e TECs sob o efeito da PRL (Figuras 16 e 17) apresentou uma reorganização quando comparado aos controles. Além disso, as TECs demonstraram a formação de estruturas essenciais para o processo de migração celular como presença de numerosos complexos de adesão focal, lamelipódios e filopódios. Estas alterações no citoesqueleto, causados pela PRL, corroboram aos estudos de Da Silva e colaboradores (2015), no qual a PRL alterou a distribuição dos filamentos de F-actina do citoesqueleto de células mamárias, e essa remodelação ocasionou uma maior migração de células no câncer de mama.

Após avaliar a expressão de MEC pelas CETc e TECs, foi verificada a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na membrana dos timócitos. Há cerca de 24 tipos de integrinas nas células de mamíferos, que reconhecem de maneira específica diversos ligantes da matriz extracelular (SUN, et al., 2016). Foi observado que o tratamento com PRL, não alterou o percentual de timócitos que expressam na sua superfície as integrinas VLA5 e VLA6. Estes

dados corroboram a estudos de Smaniotto e colaboradores (2005), no qual o GH, não alterou a expressão dos receptores de superfície VLA-5 e VLA-6 nos timócitos. Ainda, estudos demonstram que as integrinas possuem baixa afinidade quando expressas em células no estado de repouso, mas podem ser estimuladas e mediar a adesão em resposta a quimiocinas e citocinas (VIELKIND, et al., 2005).

Sabe-se que o desenvolvimento de células T depende de uma rota migratória complexa. Vários receptores de quimiocinas e seus ligantes influenciam os processos de migração de timócitos e, assim, garantem acesso a microambientes tímicos apropriados. Dentre os receptores, pode-se citar o CXCR4 que é expresso pelos progenitores linfoides T e contribuem para sua entrada no timo (SCHWARZ et al., 2007) pois sua expressão altamente dinâmica durante o desenvolvimento de timócitos, sugere papéis característicos em estágios de desenvolvimento específicos (LUCAS et al., 2017).

Estudos mostram que o CXCR4 está presente na maioria, senão todos os timócitos duplo positivos (DP), sugerindo que pode ser um importante regulador de timócitos corticais, atuando no posicionamento dos timócitos DP e na seleção positiva dos  $\alpha\beta$ TCR (LUCAS et al., 2017). Em nosso estudo, foi possível observar após o tratamento com PRL, um aumento da expressão de CXCR4 no número de timócitos duplo positivo e simples positivo CD4<sup>+</sup> quando comparados ao grupo controle (Figura 20). De acordo com nosso conhecimento da literatura, esta é a primeira vez que está sendo demonstrado que a PRL foi capaz de modular a expressão do CXCR4 na superfície de timócitos.

A migração linfocitária depende de eventos sequenciais de adesão/deadesão celular e existem proteínas da MEC envolvidas nestes eventos (SAVINO et al., 1991). Neste sentido, buscou-se avaliar se a PRL poderia modular a adesão de timócitos às CETc e TECs (linhagem 2BH4). Foi constatado que o tratamento com PRL induz uma maior adesão de timócitos às CETc, tanto dos timócitos duplo positivo, como dos timócitos SP CD8<sup>+</sup> quando comparado ao grupo controle (Figura 21). Entretanto, a PRL não foi capaz de interferir na adesão dos timócitos as TECs (Figura 22).

Dados da literatura, mostram que o tratamento de TECs (linhagem IT-76M1) de camundongo BALB/c com PRL ou GH promoveu uma melhora da adesão de timócitos, o efeito se deu devido ao aumento das quantidades de componentes da MEC e suas respectivas integrinas (DE MELLO-COELHO et al., 1997). Nossos dados sugerem que o tratamento das CETc com PRL estimulou a liberação de substâncias no meio extracelular favorecendo a adesão dos timócitos às CETc, resultado que não foi observado frente as células epiteliais tímicas (linhagem 2BH4). Estudos futuros serão necessários para melhor compreensão da participação da PRL na adesão CETc/timócitos.

Diante da capacidade da PRL em aumentar a adesão de timócitos às CETc e a importância das moléculas da MEC no direcionamento dos timócitos ao longo da maturação intratímica, o próximo passo foi analisar a migração dos timócitos frente as CETc e as TECs pré-tratadas com PRL, utilizando o ensaio em câmara de *transwell* e na presença da quimiocina CXCL12. Sendo assim, os nossos resultados mostraram que a PRL foi capaz de aumentar o número total de timócitos migrantes. Além disso, quando combinamos PRL com a quimiocina CXCL12 este efeito foi potencializado (Figuras 23 e 24). Em concordância com estes resultados, Smaniotto e colaboradores (2005) mostraram que timócitos derivados de camundongos transgênicos para o GH migraram mais eficientemente através de câmara *transwell* frente a CXCL12. Ainda, a migração transendotelial de timócitos pré-tratados com GH foi aumentada em resposta a CXCL12 (SMANIOTTO et al., 2011).

Cada subpopulação de linfócitos em particular, no microambiente tímico, pode exibir um comportamento diferente, pelo menos em relação à sua resposta migratória (SMANIOTTO et al., 2010). Neste estudo, quando foram avaliadas as subpopulações, verificou-se que em timócitos duplo positivo e timócitos CD8<sup>+</sup> ocorreu um aumento no número de células migrantes na presença da CXCL12 em combinação com a PRL quando comparado ao grupo controle. Interessantemente, na migração frente as TECs, foi observado um aumento no número de timócitos migrantes na presença de PRL em combinação com CXCL12 quando comparado ao grupo da CXCL12 isolada (Figuras 23 e 24). Estes dados suportam a hipótese que a combinação de PRL com quimiocinas estimula a migração de timócitos, sugerindo que

provavelmente os estímulos combinados aumentam as interações celulares, fato importante para determinar o grau de migração dessas células.

Sabe-se que a quimiocina CXCL12 classicamente se liga a seu receptor CXCR4 (BLEUL et al., 1996). Inicialmente, acreditava-se que o CXCR4 era o receptor exclusivo para CXCL12. Mais tarde, o CXCR7 foi considerado um segundo receptor para CXCL12 com uma afinidade de ligação 10 vezes maior comparado ao CXCR4 (BALABANIAN et al., 2005). Posteriormente estudos mostraram a presença deste receptor em linfócitos e constatou que nos linfócitos T, sua localização é principalmente intracelular (HARTMANN, et al., 2008; MELO, et al., 2014). Neste contexto, sugere-se que a expressão de CXCL12 em CETc e TECs estimulada pela PRL, possa estar se ligando também ao receptor CXCR7 expresso na superfície dos timócitos e assim aumentando o número de células migrantes frente a CETc e TECs. No entanto, estudos futuros sobre o efeito da PRL na expressão de receptores para CXCL12 serão necessários para melhor compreensão se tal hipótese se confirmam ou não.

O tratamento *in vitro* com a PRL nos forneceu um conjunto de dados demonstrando seus efeitos moduladores em eventos celulares, dentre eles adesão e migração de células do microambiente tímico. Ainda, sabendo que altos níveis de PRL são secretados durante a lactação (LE TISSIER et al., 2015). Diante disso, buscamos avaliar em modelos de animais lactantes, a expressão da quimiocina CXCL12 no timo e a expressão do seu receptor em timócitos, bem como a migração destes frente a CXCL12.

Sabe-se que em mamíferos, durante a gestação, o timo perde peso e diminui sua celularidade, principalmente em relação aos timócitos, havendo assim uma acentuada involução do córtex (PEPPER, 1961). Uma das justificativas que explicam estas alterações, são os aumentos de hormônios típicos da gravidez. Uma vez que estes hormônios voltam a homeostase normal após o parto, o timo volta ao seu tamanho e funcionalidade normal (PHUC, et al. 1981).

Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez a expressão da quimiocina CXCL12 no timo de fêmeas lactantes. A literatura mostra que a expressão de CXCL12 ocorre tanto no córtex como na medula tímica (TRAMPONT, et al., 2010). Outros estudos demonstraram a presença da

CXCL12 em porções exclusivas, como em todo o córtex (LUCAS et al., 2017) ou exclusivamente na medula tímica (MISSLITZ, et al. 2004). As razões para essas discrepâncias não são totalmente claras.

Conforme demonstrado neste estudo, a quimiocina CXCL12, encontrou-se aumentada tanto em CETc como em TECs (linhagem 2BH4) após o tratamento com PRL. Quando observada no timo de fêmeas lactantes, houve uma maior expressão desta quimiocina, tanto na região cortical como também na região medular quando comparado ao grupo controle. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou este aumento na expressão da CXCL12 (Figura 25). Baseados em nossos resultados *in vitro* e dados da literatura que mostram os altos níveis de PRL durante a lactação (LE TISSIER et al., 2015), podemos sugerir a participação da PRL no aumento da expressão de CXCL12 no microambiente tímico das lactantes.

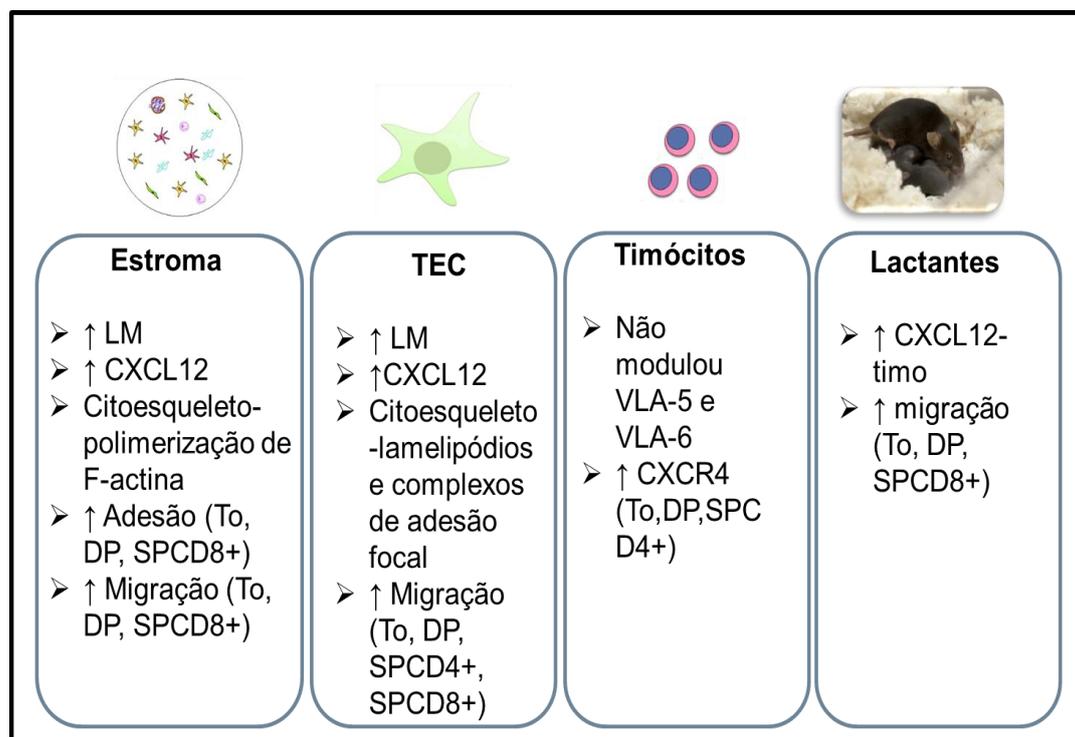
No que se refere a expressão do CXCR4 na superfície dos timócitos não foram observadas alterações na expressão deste receptor em fêmeas LCT quando comparadas as fêmeas não LCT (Figura 26). Estudos realizados por Smaniotto e colaboradores (2005), utilizando timócitos obtidos de camundongos transgênicos para o GH, observaram que a expressão do CXCR4 na superfície dos timócitos nas diferentes subpopulações CD4/CD8 também não foi alterada. Além disto, vale ressaltar que nosso estudo demonstra pela primeira vez a expressão do CXCR4 em timócitos de fêmeas lactantes.

Mudanças drásticas no microambiente tímico durante a gravidez podem influenciar na secreção de citocinas e outros produtos solúveis e influenciar a diferenciação de timócitos redirecionado a seleção, maturação e migração (CLARKE; KENDALL, 1989). Após o parto, ocorre o reestabelecimento da homeostase dos hormônios típicos da gravidez e o timo volta ao seu tamanho e funcionalidade normal (PHUC, et al. 1981). Neste sentido, buscamos avaliar a capacidade migratória de timócitos totais obtidos de camundongos fêmeas lactantes e não lactantes, frente a quimiocina CXCL12. Foi constatado um aumento na capacidade migratória dos timócitos totais e de todas as subpopulações CD4/CD8, obtidos de fêmeas lactantes frente a CXCL12 (Figura 27).

Estudos demonstraram que a diminuição de timócitos durante a gravidez, resulta de um menor número de timócitos DP corticais sendo produzidos (KENDALL; CLARKE, 2000). Porém sabe-se que após o parto, o organismo retoma seu controle endócrino normal, além disso, com o aumento na produção de PRL. Em nosso estudo, foi observado um aumento na capacidade migratória dos timócitos obtidos de fêmeas lactantes frente a CXCL12, incluindo as subpopulações de timócitos duplo positivo e CD8<sup>+</sup>. Futuras investigações são necessárias para compreender a interação da PRL com a quimiocinas CXCL12 e a participação destas moléculas na migração intratímica.

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo (Figura 28) aumentam o conhecimento sobre os efeitos da PRL no microambiente tímico. Reforçam a hipótese de que a PRL estimula moléculas envolvidas na adesão e migração de timócitos durante o processo da diferenciação de linfócitos T.

**Figura 28.** Representação esquemática dos resultados



Esquema representando os resultados obtidos durante o estudo. Fonte: Autor

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, apoiam a hipótese que a PRL exerce efeitos sobre células linfoides e estromais do microambiente tímico murino, no tocante a modulação de diferentes parâmetros celulares, como expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular e quimiocina CXCL12, citoesqueleto e nos eventos de adesão e migração. Nosso estudo, reflete ainda os efeitos de altos níveis séricos de PRL sobre o microambiente tímico. Nossos dados fornecem em conjunto, conhecimento científico para uma melhor compreensão da fisiologia tímica; e para futuras intervenções imunológicas baseadas na PRL, sendo necessárias pesquisas mais específicas neste contexto.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALEXANDROPOULOS, K; DANZL, N.M. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. **Immunologic Research**. v. 54, p. 177–190, 2012.
- ANDERSON, G. et al. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. **Semin Immunol**. v. 12, p. 457-464, 2000.
- ANDERSON, G. et al.. Cellular interactions in thymocyte development. **Annual Review of Immunology**. v. 14, p. 73-99, 1996.
- ANDERSON, G., TAKAHAMA, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. **Trends Immunol**. v. 33, p. 256-263, 2012.
- ANNUNZIATO, F. Chemokines and lymphopoiesis in the thymus. **Trends Immunol**. v. 22, p. 277-281, 2001.
- BALABANIAN, K. et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. **J. Biol. Chem**. v. 280, p. 35760-35766, 2005.
- BEN-JONATHAN, N. et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocr Rev**. v. 17, p. 639-669, 1996.
- BERCZI, I.; NAGY E. A possible role of prolactin in adjuvant arthritis. **Arthritis Rheum**. v. 25, p. 591-594, 1982.
- BERKI, T. et al. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. **Int. Immunol**. v. 14, p. 463-469, 2002.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REI, A. Cytokines as mediators of central and peripheral immune-neuroendocrine interactions. In. Ader R, Felten DL, Cohen N. (Editors) **Psychoneuroimmunology**. Academic Press, San Diego, Ca. v. 3, p. 1-17, 2001.
- BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 4, p. 278-289, 2004.
- BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol Today**. v. 15, p. 504-511, 1994.
- BLEUL C.C. et al. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. **Nature**. v. 441, n. 7096, p. 992-996, 2006.
- BLEUL, C. C. et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 Entry. **Nature**. v. 382, p. 829-833, 1996.

BOLE-FEYSOT, C. et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Ver.** v. 19, p. 225-68, 1998.

BOUCHARD B. et al. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. **J. Immunol.** v. 163, p. 576-582, 1999.

CARRENO, P.C., et al. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. **J Neuroimmunol.** v. 160, p. 135-145, 2005.

CARY, L. .A; CHANG, J.F; GUAN, J.L. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. **J. Cell Sci.** v. 109, p. 1787-1794, 1996.

CHAUDHARY, D. K et al. Establishment and characterization of an epithelial cell line from thymus of *Catla catla*. **Gene.** v. 512, n.12, p. 546-553, 2013.

CHIKANZA, I.C. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. **Ann N Y Acad Sci.** v. 876, p. 119-130, 1999.

CIOFANI, M.; ZUNIGA-PFLUCKER, J.C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. **Ann Rev Cell Dev Biol.** v. 23, p. 463-493, 2007.

CLARKE, A. G.; KENDALL, M. D. Histological changes in the thymus during mouse pregnancy. **Thymus.** v. 14, n. 1-3, p. 65-78, 1989.

COSTANZA M. et al. Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmun Ver.** v.14, n. 3, p. 223-230,2015.

COX, E. A.; SASTRY, S.K.; HUTTENLOCHER, A. Integrin-mediated Adhesion Regulates Cell Polarity and Membrane Protrusion through the Rho Family of GTPases. **Molecular Biology of the Cell.** v. 12, p. 265–277, 2001.

CSABA, G. The Immunoendocrine Thymus as a Pacemaker of Lifespan. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.** v. 63, n. 2, p. 139-158, 2016.

DA SILVA, P. L. et al. Prolactin Promotes Breast Cancer Cell Migration through Actin Cytoskeleton Remodeling. **Frontiers in Endocrinology,** v.6, 2015.

DARDENNE, M. et al. Identification and functional activity of prolactin receptors in thymic epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, p. 9700- 9704. 1991.

DARDENNE, M. et al. Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. **Endocrinology.** v. 134, p. 2108-2114, 1994.

DARDENNE, M. et al. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. **Endocrinology.** v. 125, n. 1, p. 3-12, 1989.

DE MELLO-COELHO, V. et al. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. **J. Neuroimmunol.** v. 76, p. 39-49, 1997.

DUPRÉ, L. et al. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. **Frontiers in Immunology.** v. 6, p. 586, 2015.

EZAKI, T.; MATSUNO, K.; KOTANI, M. Thymic nurse cells (TNC) in spontaneous thymoma BUF/Mna rats as a model to study their roles in T-cell development. **Immunology.** v. 73, p. 151-158, 1991.

FLETCHER-CHIAPPINI, S.E. et al. Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb2 lymphoma cells: Antiproliferative vs. anticytolytic effects. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 202, p. 345-352, 1993.

GEIGER, B.; SPATZ, J. P.; BERSHADSKY, A. D. Environmental sensing through focal adhesions. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 10, p. 21-33. 2009.

GLUKHOVA, M. A.; STREULI, C. H. How integrins control breast biology. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 25, n.5, 2013.

GOFFIN, V.; FERRAG, F.; KELLY, P. A. Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors. In: **LeRoithD(ed) Advances in Mol Cell Endocrinol**, v. 2, p. 1-33, 1998.

GRAHAM, A. et al. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. **Seminars in Immunology.** v. 12, p. 457-464, 2000.

GUYDEN, J. C., PEZZANO, M. Thymic nurse cells: A microenvironment for thymocyte development and selection. **International Review of Cytology.** v. 223, p. 1-37, 2002.

HALEY, P. J. Species differences in the structure and function of the immune system. **Toxicology.** v. 188, p. 49-71, 2003.

HALKIAS, J. et al. Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 123, n. 5, p. 2131-2142, 2013.

HARTMANN, D.P.; HOLADAY, J.W.; BERNTON E.W. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. **FASEB J.** v.3, p. 2194-2202, 1989.

HARTMANN, T. N. et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 84, n. 4, p. 1130-1140, 2008.

HYNES, R.O.; YAMADA, K.M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. **J Cell Biol**, v. 95, p. 369-377, 1982.

IORIO, V .; TROUGHTON, L. D .; HAMILL, K.J. Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 250-263, 2015.

IRLA, M. et al. Autoantigen-specific interactions with CD41 thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. **Immunity**. v. 29, n. 3, p. 451-463, 2008.

JANAS, M.L. et al. Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. **J Exp Med**. v. 207, n.1, p. 247-61, 2010.

KELLEY, K.W.; WEIGENT, D.A; KOOIJMAN R. Protein hormones and immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 21, p. 384-392, 2007.

KENDALL, M. D.; CLARKE, A. G. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment. **J Anat**. v. 197, v. 3, p. 393-411, 2000.

KIM, C.H. et al. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood*. v. 19, p. 4434-4443, 1998.

KRANGEL, M.S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. **Curr Opin Immunol**; v. 21, n. 2, p.133-139, 2009.

KUPER, C. F. et al. Development of immune organs and functioning in humans and test animals: Implications for immune intervention studies. **Reprod Toxicol**. v. 64, p. 180-190. 2016.

LANCASTER, J.N.; LI, Y. EHRlich LIR. Chemokine-Mediated Choreography of Thymocyte Development and Selection. **Trends Immunol**. v. 39, n. 2, p. 86-98, 2018.

LANNES-VIERIA J, DARDENNE M, SAVINO W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment Ontogenetic studies and modulation by glucocorticoids hormones. **J Histochem Cytochem**. v.39, p. 1539-1546, 1991.

LAVOIE, H.A; WITORSCH, R. J. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 209, p. 257-269, 1995.

LE TISSIER, P.R. et al. Plasticity of the prolactin (PRL) axis: mechanisms underlying regulation of output in female mice. **Adv Exp Med Biol**. v. 846, p. 139-162, 2015.

LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 313–316, 2015.

LEONARD, W. J.; O'SHEA, J.J. Jaks and STATs: biological implications. **Annu. Rev. Immunol**. v.16, p. 293, 1998.

LIND, E. F. et al. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. **J. Exp. Med.** v. 194, p. 127-134, 2001.

LOPES N. et al. Lymphotoxin  $\alpha$  fine-tunes T cell clonal deletion by regulating thymic entry of antigen-presenting cells. **Nature Communications.** v. 9, n. 1, p. 1262, 2018.

LUCAS, B. et al. Progressive Changes in CXCR4 Expression That Define Thymocyte Positive Selection Are Dispensable For Both Innate and Conventional  $\alpha\beta$ T-cell Development. **Scientific Reports.** v. 7, p 1-11, 2017.

MANLEY, N. R. Structure and function of the thymic microenvironment. **Frontiers in Bioscience.** v. 16, n. 1, p. 2461-2477, 2011.

MAQUART, F. X .; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. **Pathologie Biologie,** v. 62, no. 2, p. 91–95, 2014.

MARANO, R. J.; BEN-JONATHAN, N. Minireview: Extrapituitary Prolactin: An Update on the Distribution, Regulation, and Functions. **Molecular Endocrinology.** v. 28, n. 5, p. 622–633, 2014.

MCKEAN, D. J. et al. Maturation versus death of developing double-positive thymocytes reflects competing effects on Bcl-2 expression and can be regulated by the intensity of CD28 costimulation. **J Immunol.** v. 166, n. 5, p. 3468-3475, 2001.

MELO, R. de C. C., et al. CXCR7 Is Highly Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potentiates CXCR4 Response to CXCL12. **Plos One.** v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.

MÉNDEZ, I.; CARIÑO, C.; DÍAZ, L. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. **Rev. Invest. Clín.** v. 57, n. 3, 2005.

MIKUŠOVÁ R. et al. What do we know about the structure of human thymic Hassall's corpuscles? A histochemical, immunohistochemical, and electron microscopic study. **Anatomischer Anzeiger.** v. 211, p. 140-148, 2017.

MILLER, J.F. Immunological function of the thymus. **Lancet.** v. 2, p. 748-749, 1961.

MISSLITZ, A. et al. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. **J. Exp. Med.** v. 200, p. 481-491, 2004.

MONTES DE OCA, P. et al. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. **Lab Invest.** v. 85, n. 5, p. 633-642, 2005.

MONTGOMERY, D. W. et al. A Stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. **Biochem Biophys Res Commun.** v.145, p. 692-698, 1987.

MURPHY, W. J. Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function. **Journal of Experimental Medicine**. v. 178, n. 1, p. 231-236, 1993.

NAGY, E.; BERCI, I. Prolactin and contact sensitivity. **Allergy**. v. 36, p. 429-431, 1981.

NITTA, T.; SUZUKI, H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 73, n. 5, p. 1021-1037, 2016.

PEARSE, G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. **Toxicologic Pathology**. v. 34, n. 5, p. 504-514, 2006.

PEDRAZA, C., et al. Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8 (alpha 4 beta 1 gamma 1). *J Immunol*. v. 165, p. 5831-5838, 2000.

PEPPER, F.J. The effect of age, pregnancy and lactation on the thymus gland and lymph nodes of the mouse. **J Endocrinol**. v. 22, p. 335-48, 1961.

PEPPER, F. J. The effect of age, pregnancy and lactation on the thymus gland and lymph nodes of the mouse. **Journal of Endocrinology**. v. 22, n. 4, p. 335-348, 1961.

PÉREZ, A. N. et al. Editorial: Hormones, Neurotransmitters, and T-Cell Development in Health and Disease. **Frontiers in Endocrinology**. v. 10, 2019.

PETRIE, H. T; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. **Annu Rev Immunol**. v. 25, p. 649-679, 2007.

PHEE, H., et al. Pak2 is required for actin cytoskeleton remodeling, TCR signaling, and normal thymocyte development and maturation. *Elife*. v. 3, p. 1-23, 2014.

PHUC, L. H. et al. Thymic involution in pregnant mice. I. Characterization of the remaining thymocyte subpopulations. **Clin Exp Immunol**. v. 44, n. 2, p. 247-252, 1981.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **J. Biol. Chem**. v. 275, p. 21785–21788, 2000.

POZNANSKY, M. C., et al. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stromaderived factors. *J. Clin. Invest*. v. 109, p. 1101-1110, 2002.

RIBEIRO-CARVALHO, M. M. et al. Triiodothyronine modulates thymocyte migration. **Scand J Immunol**. v. 66, n. 1, p. 17-25. 2007.

SAMMS, M. et al. Circulating macrophages as well as developing thymocytes are enclosed within thymic nurse cells. **Cell Immunol**. v. 212, p. 16-23, 2001.

SAVINO, W .; VIEIRA, J. L. Is there a role for extracellular matrix in thymus physiology and pathology. **Memories of the Oswaldo Cruz Institute**, 1991.

SAVINO, W et al. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**. v. 12, n. 2, p. 77-89, 2015.

SAVINO, W. et al. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, p. 77-89, 2016.

SAVINO, W. et al. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? **Trends Immunol**. v. 23, p. 305-313, 2002.

SAVINO, W. et al. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. **Frontiers in Immunology**. v.6, n. 579, 2015.a

SAVINO, W. et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **J Leuk Biol**. 75:1-11, 2004.

SAVINO, W. Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease. **Frontiers of Hormone Research**. p. 69-75, 2017.

SAVINO, W., DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocr Rev**. 21: 412-443, 2000.

SAVINO, W.; DALMAU, S. R.; DE ALMEIDA, V. C. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. **Developmental Immunology**, v. 7, n. 2-4, p. 279-291, 2000.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. **Current Opinion in Pharmacology**. p. 1-9, 2010.

SAVINO, W; DARDENNE, M. Immunoneuroendocrine interactions. **Immunol Today**. v. 7, p. 318-322, 1995.

SAVINO, W; DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocr Rev**. v. 21, p. 412-443, 2000.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res*. v. 339, p. 83-92, 2010.

SCHWARZ, B. A. et al. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. **J. Immunol**. v. 178, p. 2008-2017, 2007.

SHI Y. et al. LT $\beta$ R controls thymic portal endothelial cells for haematopoietic progenitor cell homing and T-cell regeneration. **Nature Communications**. v. 7, p. 1-12, 2016.

SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXCL12. **Endocrinology**. v. 146, p. 3005-3017, 2005.

SMANIOTTO, S., et al. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. **brain, behavior, and immunity**. v. 24, n. 3, p. 451-461, 2010.

SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone is a modulator of lymphocyte migration. **Neuroimmunomodulation**. v. 18, n. 5, p. 309-313, 2011.

STREULI, C. H., AKHTAR, N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. **Biochem J**. v. 418, p. 491-506, 2009.

SUN L. et al. FSP1(+) fibroblast subpopulation is essential for the maintenance and regeneration of medullary thymic epithelial cells. **Scientific Reports**. v. 5, 14871, 2015.

SUN, Z.; GUO, S.S.; FÄSSLER, R. Integrin-mediated mechanotransduction. **The Journal of Cell Biology**. v. 215, n. 4, p. 445-456, 2016.

SUZUKI, G., et al. Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J. Immunol.* v. 162, p. 5981-5985, 1999.

TAKAHAMA, Y. et al. Generation of diversity in thymic epithelial cells. **Nat Rev Immunol**. v. 17, n. 5, p. 295-305, 2017.

THAPA, P.; FARBER, D. L. The Role of the Thymus in the Immune Response. **Thoracic Surgery Clinics**. v. 29, p. 123-131, 2019.

TRAMPONT, P. C. et al. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. **Nat. Immunol**. v. 11, p. 162-170, 2010.

UENO, T. et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. **J Exp Med**. v. 200, n. 4, p. 493-505, 2004.

VIANA, I. M. M. N. et al. Combined Effect of Insulin-Like Growth Factor-1 and CC Chemokine Ligand 2 on Angiogenic Events in Endothelial Cells. **Plos One**, v. 10, p. 1-14, 2015.

VIEIRA- ARAÚJO, L. F. Influência in vitro do Fator-1 de crescimento semelhante a insulina sobre as moléculas envolvidas na diferenciação de linfócitos T. Tese (doutorado) – **UFAL**. Maceió-AL. p. 47-48, 2017.

VIELKIND, S. et al. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. **J Immunol**. v. 175, p. 350–7, 2005.

VILLA-VERDE, D. M. et al. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. **Braz J Med Biol Res.** v. 28, p. 907-912, 1995.

WANG, S. et al. Characterization and angiogenic potential of human neonatal and infant thymus mesenchymal stromal cells. **Translational Medicine.** v. 4, n. 4, p. 339-350, 2015.

WERNECK, C.C. et al. Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium? **J Cell Physiol.** v.185, n.1, p. 68-79, 2000.

WU, H.; DEVI, R.; MALARKEY, W.B. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. **Endocrinology.** v. 137, p. 349-53, 1996.

XU, D. et al. Immunoregulation of autocrine prolactin: suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown. **Cellular Immunology.** v. 263, p. 71-78, 2010.

YANAGAWA, Y.; IWABUCHI, K.; ONOE, K. Enhancement of stromal cell-derived factor-1-induced chemotaxis for CD4/8 double positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology.* v. 104, p. 43-49, 2001.

YU-LEE, L. Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. **Recent Prog Horm Res.** v. 57, p. 435-55, 2002.

ZDROJEWICZ, Z.; PACHURA, E.; PACHURA P. The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. **Adv Clin Exp Med.** Mar-Apr. v. 25, n. 2, 369-375, 2016.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1: Comissão de Ética no Uso de Animais -projeto nº 14/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 14/2015

**TÍTULO:** Avaliação dos efeitos de hormônios hipofisários e semaforinas sobre órgãos linfoides e células do sistema imunológico.

**RESPONSÁVEL:** Salete Smanioto

**OBJETIVO:** Avaliar os efeitos de hormônios hipofisários e semaforina sobre órgãos linfoides e células do sistema imunológico.

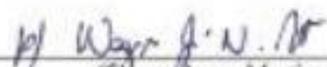
**SITUAÇÃO:** Aprovado

**PERÍODO DE VIGÊNCIA:** 01.07.2015 a 30.06.2020

**DADOS DO ANIMAL:**

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo isogênico	C57BL/6	250

Maceió, 16 de junho de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Silvana Ayres Martins  
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora de Comissão de  
Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFAL