



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE- PGCS**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE LIGANTES E RECEPTORES DE
MATRIZ EXTRACELULAR NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS
TÍMICAS E SUA PARTICIPAÇÃO NA MIGRAÇÃO**

Andréa Aragão Francelino

Maceió-AL
Março de 2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE- PGCS**

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE LIGANTES E RECEPTORES DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS TÍMICAS E SUA PARTICIPAÇÃO NA MIGRAÇÃO

Andréa Aragão Francelino

Dissertação de Mestrado 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 parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Ayres
Martins

Maceió-AL
Março de 2008

F815

FRANCELINO, Andréa Aragão

Estudo da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular nas células endoteliais tímica e sua participação na migração. [manuscrito] / Andréa Aragão Francelino . - 2008.

63 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas. Inst. De Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Profª Dra. Silvana Ayres Martins

1. Timo – imunidade 2. Matriz extracelular 3. Célula Endotelial 1. Título II.
Autor

CDU 616.438



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

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Andréa Aragão Francelino, intitulada: "Estudo da Expressão de Ligantes e Receptores de Matriz Extracelular nas Células Endoteliais Tímicas e sua Participação na Migração", orientada pela Profª. Drª. Silvana Ayres Martins, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 25 de março de 2008.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata Aprovada

Banca Examinadora:

Profª Drª. Déa Maria Serra Villa Verde – IOC/FIOCRUZ (Titular)

Profª. Drª. Theresinha de Jesus Carvalho Calado – UFAL (Titular)

Profª Drª. Eliana Maria Maurício da Rocha – UFAL (Titular)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunohistologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ, com o apoio financeiro da UFAL/CAPES.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus filhos:
Juliana, Janine e João Victor, razão de todos
os meus esforços e ao grande amor que sinto
por eles....*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por todas as conquistas obtidas até hoje, por sempre estar ao meu lado, dando-me força, coragem e persistência para vencer todas as dificuldades que a vida, às vezes, apresenta, e pela oportunidade de viver e poder, mesmo que de forma ingênua e diminuta, deixar a minha marca e minha contribuição.

Aos meus pais, que me colocaram no mundo, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação educacional e que sem perceber me ensinaram princípios e valores fundamentais para que eu chegasse onde estou. Amo vocês!

Ao meu companheiro, amigo, confidente, amante, esposo, Neto, por estar me acompanhando nessa jornada, desde a entrada na Universidade. Obrigada pela paciência, tolerância e confiança, é mais uma etapa que conquisto, e você foi fundamental nela. Te amo!

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por ser um dos pilares da minha formação, onde retorno através do ICBS para conclusão do mestrado em Ciências da Saúde, em nome da Prof.Dra.Theresinha Calado agradeço a oportunidade.

A minha muito mais que orientadora Silvana Ayres Martins(Sil), a você minha maior gratidão, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, confiança e oportunidade, sem as quais não teria atingido meus objetivos e me tornado uma profissional mais responsável e um ser humano melhor.

As minhas avós, Amélia e Iracema (*in memoriam*) pela convivência e por despertarem em mim um amor incondicional;

Ao meu grande amigo Mauro Martins, você foi a pessoa responsável por essa conquista, de coração te agradeço pelo estímulo, pela força e principalmente pela amizade, em seu nome agradeço a FCBS/ CESMAC, por todo o apoio dado para que eu concluísse o Mestrado. Obrigado Dr.João Sampaio, Dr.Douglas Apratto e João Sampaio Neto pela compreensão e apoio.

As minhas amigas irmãs Annelise e Fabiana, por toda a barra que seguraram enquanto estive envolvida nas atividades do Mestrado, pela amizade, cumplicidade e união, meu grande abraço e minha eterna gratidão. Não poderia esquecer de você Fofi, que mesmo distante nesse momento, sempre esteve ao meu lado, compartilhando cada degrau alcançado;

Aos meus colegas de mestrado: Ana Raquel, André, Wendell, Yede, Paulo, Anderson, Socorro e principalmente ao meu grande amigo e companheiro Fernando, que esteve mais próximo em cada experimento, em cada seminário, em cada estresse, e a minha amiga Alane por toda contribuição. Obrigada pela amizade de vocês, pela troca de informações, pelos momentos de alegria que passamos juntos. Valeu! A convivência com vocês foi maravilhosa.

A Prof. Dra. Salete Smaniotto, pela grande colaboração que me deu, pela paciência e por todos os momentos compartilhados, pelos sorrisos, pelos aborrecimentos, e principalmente pelos ensinamentos. Talvez você não tenha percebido mais você foi fundamental nessa caminhada. Obrigada Sal.

Ao Prof. Dr Wilson Savino pela grande colaboração, por ter aberto as portas do Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo na FIOCRUZ/RJ para que realizássemos os experimentos, e a toda sua equipe. Em especial ao Désio, por toda paciência, contribuição e pelas boas risadas. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas da Casa Amarela da FIOCRUZ/RJ; Juliana, Tuan Tran, Thatiana, Langia (com seu sotaque arrastado), Thiago (com suas gargalhadas), Samia (obrigada pelo apoio), Solange (grande companheira), Fernando e Santiago (Uruguai) e não poderia esquecer do Dr. Henrique Lenzi, que com seus ensinamentos tornava cada refeição uma verdadeira produção científica.

Aos colegas do Laboratório de Imunohistologia do ICBS/UFAL, em nome do Adalberto agradeço pela parceria e apoio, e a você Delma, pelos cafezinhos, incentivos e pela sua solidariedade, meu grande abraço!

Aos meus irmãos: Robson, Anamélia, Adriana e Aragãozinho, por fazerem parte da minha vida e de alguma forma acompanharem meu crescimento e aos meus sobrinhos: Larissa, Filipe, Henrique, Rodrigo, Mariana e Estella, que vocês busquem seus objetivos, pois é muito gratificante alcançá-los. Sem esquecer dos meus cunhados (as) Jorge, Eurico e Roberta, meu grande beijo!

A minha secretária Maria, por estar me acompanhando a tanto tempo, cuidando dos meus filhos como se fossem seus. Pode ter certeza, que sem sua colaboração eu jamais chegaria onde cheguei. Serei eternamente grata a você.

Aos amigos e Coordenadores de Curso da FCBS/CESMAC: Lucélia, Valéria, Thadeu, Jacinto, Ana Lúcia, Flaviana, Roberta, Bruno Gurgel, Vinicius, Paulo, Daniela, Alex, Samara, Emanuelle, Desterro, Loanne, Mônica, Socorro Lira, Sandra, Irís, entre tantos outros que compartilharam da minha luta para vencer mais uma batalha.

Aos alunos do Curso de Graduação em Nutrição da FCBS/CESMAC, uma das razões dos meus esforços, a vocês o meu muito obrigado por entender minha ausência em alguns momentos e por todos os bilhetes e e-mails que me enviaram me dando força para ir adiante.

A todos os professores do mestrado. Obrigado por todas as oportunidades, ensinamentos e convívio. Em especial a Prof. Dra. Iracilda Lima por ter despertado em mim o amor à leitura, de forma crítica e coerente. Ao Prof. Dr. Gilberto Fontes por ter instigado o raciocínio lógico através da bioestatística, Prof. Dr. Emiliano Barreto pelas correções e incentivo e aos coordenadores do mestrado, Prof. Dr. Célio Rodrigues, com toda sua tranquilidade e atualmente Prof. Dra. Eliana Rocha,

por conduzir de excelente forma o Mestrado de Ciências da Saúde do ICBS/UFAL;

À Aurinete, que com sua paciência nos recebia em sua sala, para dúvidas, matrículas e avisos gerais, meu abraço!

A todos aqueles que, de algum modo, tornaram possível à realização deste trabalho.

Os meus sinceros e eternos agradecimentos!

ÍNDICE	PÁGINA
TITULO	i
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 - Características Gerais da Morfologia e Ontogenia do Timo.	03
1.2 - Microambiente Tímico e Diferenciação Intratímica de Linfócitos	07
1.2.1 - Células Epiteliais Tímicas	11
1.3 - Matriz Extracelular	13
1.3.1 - Fibronectina	16
1.3.2 - Laminina	17
1.3.3 - Receptores de Matrix Extracelular	18
1.4 – Células Endoteliais	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 - Animais	25
3.2 - Reagentes	25
3.3 - Anticorpos	25
3.4 - Cultura de Células	26
3.4.1 - Linhagem de Células Endoteliais	26
3.4.2 - Cultura de Células Endoteliais	26
3.4.3 - Obtenção de Timócitos	27
3.5 - Citofluorimetria	27
3.6 - Ensaio de Imunocitoquímica	28
3.6.1 - Ensaio de Imunofluorescência Confocal	28
3.6.2 - Ensaio de Imunoperoxidase	29
3.7 - Ensaio de Adesão	29

	11
3.8 - Ensaio de Migração Transendotelial	30
3.9 - Análise Estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1- Expressão de moléculas e receptores de ECM	33
4.2- Participação das moléculas de ECM nas interações tEnd.1/timócitos	37
4.2.2- Migração transendotelial	40
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

FORMA ABREVIADA	SIGNIFICADO ESCRITO POR EXTENSO
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Grupos de diferenciação
CD2	Molécula de adesão que interage com LFA-3
CD3	Complexo protéico associado ao receptor clonal para antígeno da célula T (CD3-TCR)
CD4	Molécula acessória de células T, que serve como marcador fenotípico relacionado às funções auxiliares.
CD8	Molécula acessória de células T, que serve como marcador fenotípico relacionado à função citotóxica.
DAB	Dimetilaminobenzeno
DN	Duplo Negativo
DP	Duplo Positivo
ECM	Matriz extracelular
ECMr	Receptores de matriz extracelular
FcR	Receptor para porção Fc das imunoglobulinas
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1 (CD54)
Ig	Imunoglobulina
HEV	Vênula de endotélio alto
JMC	Junção cortico-medular
MAb	Anticorpo monoclonal

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
PBS	Salina com fosfato tamponada
SFB	Soro fetal bovino
SP	Simples-positivo
TCR	Receptor de células T
TEC	Células epiteliais tímicas
t-END.1	Célula endotelial tímica
TNC	Células “ <i>nurse</i> ” do timo
VLA	Antígeno de aparecimento tardio
VLA-4	Receptor de fibronectina ($\alpha 4\beta 1$) pertencente à família das integrinas
VLA-5	Receptor de fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) pertencente à família das integrinas
VLA-6	Receptor de laminina ($\alpha 6\beta 1$) pertencente à família das integrinas

RESUMO

Os precursores das células T sofrem diferenciação e seleção intratímica através das interações com os componentes do microambiente tímico. Este é constituído em sua grande maioria por células epiteliais tímicas (TEC), macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e os produtos de secreção dessas células, tais como hormônios, interleucinas e moléculas de matriz extracelular (ECM). O tráfego de células T, que a princípio penetram no timo provenientes da medula óssea, com fenótipo de células imaturas e, a sua posterior saída, como células maduras, depende terminantemente dos vasos sanguíneos que irrigam o órgão. Tais vasos são constituídos principalmente de células endoteliais tímicas. Tendo em vista que a expressão de ligantes e receptores de ECM em células endoteliais tímicas, assim como sua função nos processos de migração e emigração de células T do timo permanece pouco estudada, neste trabalho foi avaliada a expressão de alguns ligantes de ECM e seus respectivos receptores em uma linhagem de células endoteliais tímicas, *tEnd.1*. Além disso, estudou-se também o papel destes componentes de ECM na interação entre as células *tEnd.1* e os timócitos. A princípio, foi detectado por imunofluorescência confocal a presença das proteínas de ECM fibronectina e laminina, que foram também observadas através de citofluorimetria, enquanto a presença de seus respectivos receptores, VLA5 e VLA6, foram evidenciados por imunoperoxidase e citofluorimetria. Ensaio de adesão sugeriram que o uso de anticorpos anti-receptores de ECM, anti-VLA5 e anti-VLA6, inibem pelo menos parcialmente, a adesão de timócitos às células endoteliais *tEnd.1*. Por fim, ensaios de migração transendotelial demonstraram claramente uma menor migração em números absolutos dos timócitos pré-tratados com anticorpos anti-receptores de ECM, embora essa diminuição não tenha sido estatisticamente significativa. Tomando em conjunto, os dados neste trabalho demonstraram que as células endoteliais tímicas da linhagem *tEnd.1* são capazes de expressar tanto ligantes de ECM, como seus respectivos receptores, sugerindo ainda, a participação destas moléculas nos processos de migração de linfócitos intratímicos.

ABSTRACT

The traffic of T cells, that occur when bone marrow-derived T cell precursors penetrate the thymus, with a phenotype of immature cells, and its subsequent output, as mature cells, depends of the thymic blood vessels that consists mainly of thymic endothelial cells. The expression of ligands and receptors of ECM in thymic endothelial cells, as well as its role in the processes of migration and emigration of the T cells from the thymus remains unclear. Our goal was to evaluate the expression of some of ECM ligands and their respective receptors in the strain of thymic endothelial cells tEnd.1. In addition, we aimed to study the role of the components of the ECM in the tEnd.1 cells and thymocytes interaction. First, it was detected by confocal immunofluorescence the presence of ECM proteins fibronectin and laminin, which were also observed through flow cytometry. The presence of their respective receptors, VLA5 and VLA6, were highlighted by immunoperoxidase and flow cytometry. Assays of adhesion showed that the use of antibodies anti-VLA5 and anti-VLA6 seems to block at least partially, the adhesion of thymocytes to endothelial cells. In addition, the transendothelial migration assay showed less migration in absolute cell number of the thymocytes pre-treated with antibodies anti-receptors of ECM, although this migration was not statistically significant. Finally, when the phenotype of the transmigrated thymocytes was observed, there was not difference in the migration pattern among them. This investigation shows that the thymic endothelial cells are able to express fibronectin and laminin proteins, as well as, their respective receptors VLA5 and VLA6, and suggests that these molecules could participate in the processes of intrathymic lymphocytes migration.

1. INTRODUÇÃO

As respostas imunes são condições que precisam ser reguladas, e para tanto alguns mecanismos são impostos. Assim, os linfócitos devem ser selecionados de maneira que, uma vez produzidos, somente reajam a antígenos estranhos e não a antígenos próprios (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Os órgãos linfóides têm importância decisiva na imunidade, onde os linfócitos interagem com células não linfóides importantes em seu processo de amadurecimento e no início de respostas imunes adaptativas. Tais órgãos podem ser divididos em órgãos linfóides centrais ou primários nos quais são gerados ou amadurecidos os linfócitos, e órgãos linfóides periféricos ou secundários, que iniciam as respostas adaptativas. Nos mamíferos, os órgãos linfóides centrais são a medula óssea e o timo. Tanto os linfócitos B como os linfócitos T surgem na medula óssea, mas apenas os precursores dos linfócitos T migram para o timo para que possam sofrer diferenciação e amadurecimento (JANEWAY, 2000).

O timo é composto por vários tipos celulares, sendo as células epiteliais tímicas (TECs) seus principais componentes, e ainda por moléculas de matriz extracelular (ECM) (RAMOS, 2000). Muitas das interações entre as células e a ECM são mediadas por receptores de superfície celular da família das integrinas (SAVINO *et al.*, 2003). A ECM, além de estar envolvida na migração, participa de forma crucial na diferenciação e ativação de linfócitos (ALBELDA & BUCK, 1990; de SOUZA *et al.*, 1991; KABIR-SALMANI *et al.*, 2004). As células e a ECM constituintes do microambiente tímico são determinantes para o desenvolvimento dos linfócitos T, na mesma proporção em que os vasos sanguíneos são decisivos para a entrada dos precursores e sua saída, como células T imunocompetentes para os órgãos linfóides secundários e periferia (NABARRA & ANDRIANARISON, 1995; ROSSO *et al.*, 2004).

1.1. Características da morfologia, ontogenia e involução do timo

O timo é um órgão linfoepitelial que no tórax, está situado no mediastino superior, anteriormente aos grandes vasos que emergem do coração (Fig.1),

sobrepondo-se entre o mediastino e o coração (van EWIJK, 1991). De acordo com Didio (2002), embriologicamente, é uma glândula par, porém, as faces mediais das suas primitivas estruturas direita e esquerda estão em contato íntimo, semelhante a um órgão ímpar bilobado. Assim, as partes do timo são

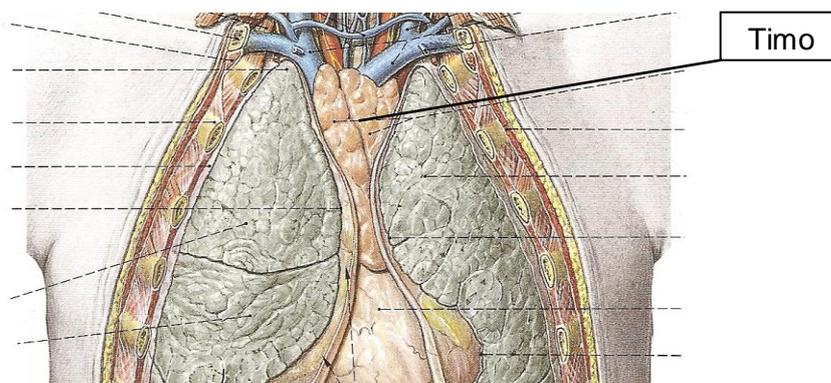


Figura 1. Localização do timo: encontrando-se no mediastino superior, sobreposto aos grandes vasos do coração. Fonte: Sobotta, 2000.

denominadas lobos direito e esquerdo, constituídos por lóbulos parciais ou totalmente envolvidos por cápsulas finas de tecido conjuntivo. Cada lóbulo tímico é subdividido por septos primários de tecido conjuntivo que levam vasos sanguíneos para um grupo de lóbulos parenquimatosos, que aparecem com forma poliédrica e possuem 0,5 a 2 mm de diâmetro (Fig.2). Os lóbulos tímicos não são, contudo, completamente independentes uns dos outros, existindo continuidade de lóbulo a lóbulo através de estreitas pontes parenquimatosas que consistem em um cordão parenquimatoso contorcido, com expansões irregulares correspondendo aos lóbulos (FAUSTO *et al.*, 2004). Cada lóbulo apresenta duas

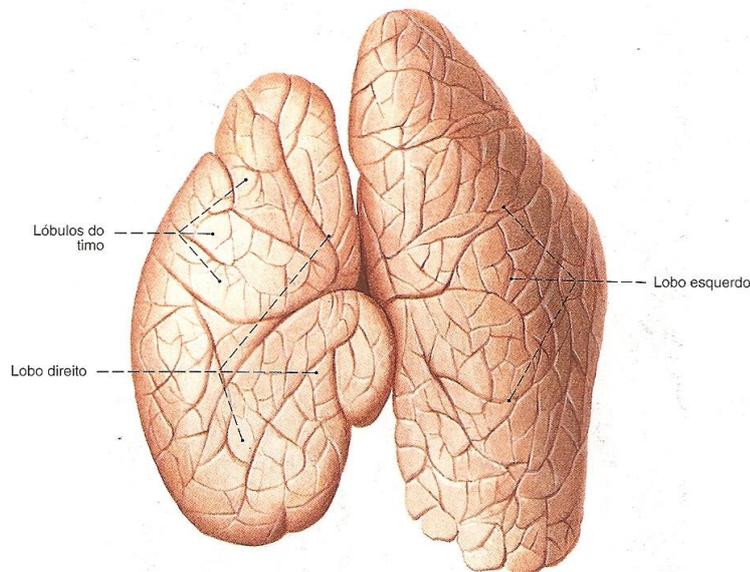


Figura 2. Lóbulos tímicos. Anatomia do timo mostrando o órgão bilobulado, onde cada lobo é constituído de vários lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo. Fonte : Sobotta, 2000.

regiões uma mais densa e periférica, o córtex, que contém um grande número de timócitos imaturos em diferentes estágios de diferenciação. A outra região, a medula, localiza-se mais internamente, e é onde se encontram os linfócitos maduros que poderão deixar o órgão como células T imunocompetentes, indo povoar as chamadas regiões timo-dependentes dos órgãos linfóides secundários (van EWIJK, 1991), ver figura 3.

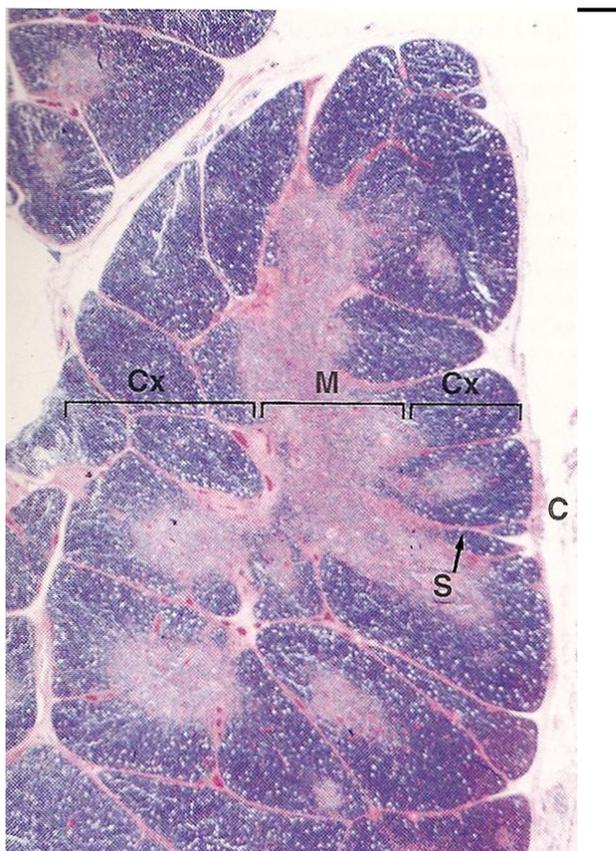


Figura 3. Histologia do timo. Micrografia de corte histológico mostrando uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo (C), da qual se irradiam septos interlobulares (S), A região

Estruturalmente, o timo distingue-se dos demais órgãos linfóides por apresentar um estroma primariamente epitelial, constituído por elementos endo e ectodérmicos derivados, nos roedores, apenas da 3ª bolsa faríngeana, em associação com componentes mesodérmicos (CORDIER & HAUMONTS, 1980; PICKER & SIEGELMAN, 1993). Na vida fetal e no período neonatal é o órgão com maior importância imunológica e, anatomicamente é o maior órgão linfático com maior atividade linfopoética, constando como precursor da linfopoese (BOYD *et al.*, 1993; DRUMMOND, 1996; SAVINO *et al.*, 1994).

Quanto à irrigação, esta apresenta características peculiares, na qual os capilares e pequenos vasos destinados ao órgão apresentam uma membrana basal, envolvida por uma camada de células epiteliais. Esta, apesar de não ser totalmente contínua, atua como uma barreira, dificultando, embora não impedindo totalmente, a passagem de antígenos ou macromoléculas do sangue para o interior do parênquima e, conseqüentemente, o seu contato com os linfócitos do órgão (CARNEIRO e SILVA *et al.*, 2001).

O timo é o primeiro órgão linfóide a aparecer durante a ontogênese e no ser humano os dois primórdios laterais de tecido tímico surgem no final da quarta semana de vida embrionária (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Na ontogenia tímica de camundongos, somente a partir do 11^o dia surgirão as primeiras células hematopoiéticas pluripotentes (EZINE, 1989). Entre o 14^o e o 15^o dias de gestação, as células precursoras dos timócitos penetram no timo à altura da junção córtico-medular (JCM), apresentando fenótipo CD4⁻CD8⁻. Esses precursores já se caracterizam como linfócitos, e desde este estágio até o nascimento observa-se uma intensa linfopoiese. Nesta altura são formadas a região cortical e a porção central ou medular, e a partir do 17^o dia de gestação observa-se então um padrão córtico-medular (Fig.3). O desenvolvimento do timo se completa entre 4 e 6 semanas de idade (SAVINO *et al.*, 1983), e sua involução inicia-se a partir da puberdade, (FAUSTO *et al.*, 2004). A involução tímica caracteriza-se pelo declínio da produção dos níveis séricos de hormônios tímicos (SAVINO *et al.*, 1983) e posterior perda de sua massa relativa, podendo também ocorrer em consequência de infecções agudas em qualquer fase da vida (SAVINO *et al.*, 1992).

A importância do timo na imunidade foi inicialmente descoberta em experimentos com camundongos. Miller (1961) demonstrou, pela primeira vez, o papel fundamental do timo para o estabelecimento e desenvolvimento do sistema imune normal. Foi observado que a remoção cirúrgica do timo (timectomia) ao nascimento resultava em animais que apresentavam tecido linfóide pobremente desenvolvido, a resposta imune prejudicada e maior susceptibilidade a infecções recorrentes (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007), despertando assim o interesse para este órgão (MOORE, 2001). Alguns dos mais recentes avanços nas diversas áreas da biologia do timo, especialmente nos últimos cinco anos, incluem a organogênese do timo, a regulação transcricional que induz à escolha do tipo celular que se desenvolverá no ambiente intratímico, e a migração, regulada por quimiocinas, de precursores de células T através dos diferentes microambientes tímicos (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

1.2. Microambiente tímico e diferenciação intratímica de linfócitos T

Vários autores afirmam que os principais componentes do microambiente tímico são as TECs, presentes em todas as regiões, sendo distintas morfológicamente de acordo com a sua localização dentro do órgão. (BOYD *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1998; van EWIJK *et al.*, 1999, SAVINO & DARDENNE, 2000; FAUSTO *et al.*, 2004). Além das TECs são encontrados também como constituintes do microambiente tímico: macrófagos, células dendríticas e alguns fibroblastos (van EWIJK, 1988), que interagem de diferentes formas com os timócitos, os quais gradativamente se diferenciam dando origem aos linfócitos T maduros (Fig. 4). No microambiente tímico encontramos também os produtos elaborados por estas células, tais como moléculas de ECM (LANNES VIEIRA *et al.*, 1991; VILLA VERDE *et al.*, 1994), hormônios e interleucinas (SAVINO *et al.*, 1982; LE *et al.*, 1991).

As principais moléculas moduladas no decorrer da diferenciação intratímica dos linfócitos T são: receptor clonal de célula T (TCR), um heterodímero composto pelas subunidades $\alpha\beta$, que reconhece peptídeos associados ao MHC; complexo CD3, subunidades protéicas associadas de forma não-covalente ao TCR, e que participam na transdução do sinal de ativação da célula T; CD4 e CD8, co-receptores para interação do TCR com as moléculas de MHC classes II e I, respectivamente; CD25, cadeia α do receptor de IL-2; CD24, antígeno resistente ao calor (HSA); CD44, receptor para ácido hialurônico e fibronectina (HE *et al.*, 1991). Desta forma, os precursores dos timócitos, a princípio oriundos do fígado fetal e posteriormente da medula óssea, sofrem diferenciação e seleção, em grande maioria dentro do timo. Após a entrada no timo as primeiras células de origem linfóide apresentam fenótipo CD90 (marcador geral de células T), CD24, CD44 e ainda níveis baixos de CD4, que logo deixam de ser expressos (HENG *et al.*, 2005). Em seguida, os precursores dos timócitos dirigem-se para a região subcapsular, apresentando um fenótipo duplo negativo (DN) para as moléculas CD4 e CD8, ou seja não expressam o complexo TCR-CD3, nem as moléculas acessórias CD4 ou CD8, o que corresponde a 5% da subpopulação total. Neste

estágio podem ainda ser subdividido pela expressão diferencial de CD44 e CD25 em DN1, DN2, DN3 e DN4.

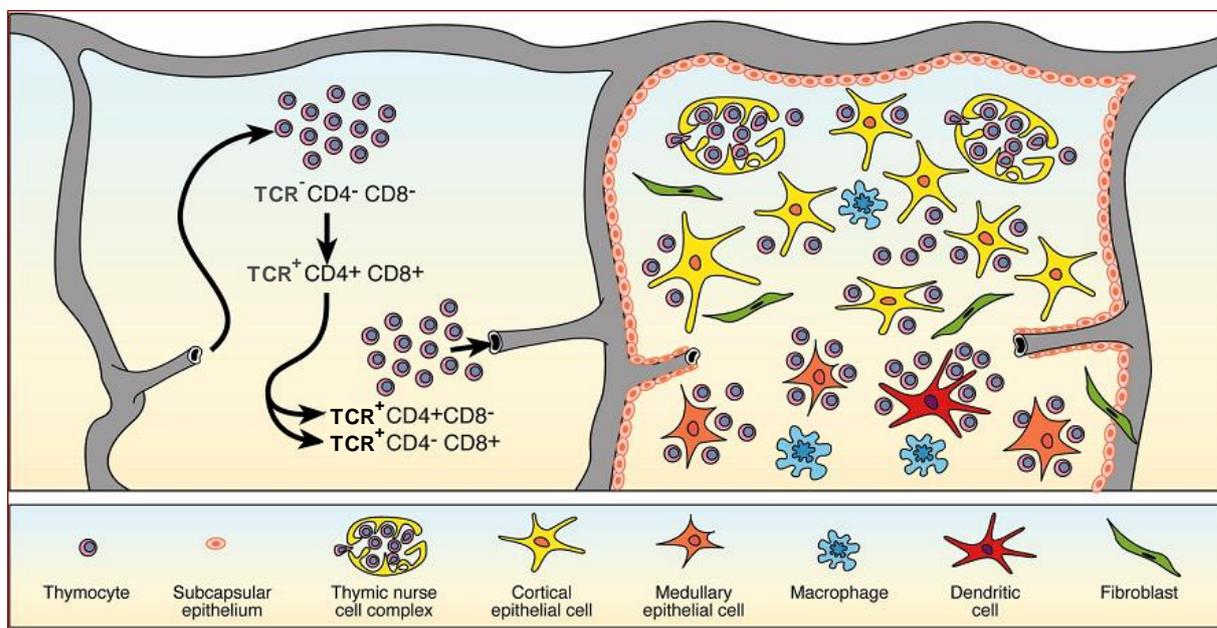


Figura 4. Migração intratímica de células T e o microambiente tímico. À esquerda, estão demonstrados os estágios de diferenciação intratímica de linfócitos, e a respectiva localização no interior de um lóbulo tímico quando da entrada de precursores e saída de células T maduras. À direita os componentes do microambiente tímico, onde se podem distinguir diferentes tipos de células epiteliais, incluindo os complexos “nurse”, e ainda componentes não-epiteliais como as células dendríticas e os macrófagos (modificado a partir de SAVINO *et al.*, 2002).

Com o processo de maturação progressiva e a medida que migram em direção a medula do órgão, sofrem rearranjo dos genes das cadeias do TCR e começam a expressar as moléculas $CD4^+$ e $CD8^+$, sendo agora denominado duplo positivo (DP), compreendendo 80% da população de timócitos totais do timo. Estas células sofrem seleção positiva, que é um sinal de vida dado por uma interação de baixa afinidade para os antígenos próprios e depois uma seleção negativa, que é a eliminação dos linfócitos reativos para os antígenos próprios presentes nos órgãos linfóides primários, a qual depende da avidéz com que se

ligam as células do microambiente tímico. Assim, das células precursoras linfóides que penetraram no timo, 95% morrem por apoptose (ANDERSON *et al.*, 1996; LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Esse evento se deve principalmente aos rearranjos mal sucedidos das cadeias de TCR e aos processos de seleção positiva e negativa, restando apenas uma pequena parcela de 5 a 10% dos timócitos gerados que chegam à maturação alcançando a medula do órgão e deixando o mesmo como célula imunocompetente de fenótipo simples positivo (SP), ou seja, células CD4⁺ ou CD8⁺ (HARE *et al.*, 1999; BENOIT & MATHIS, 1999; SAVINO *et al.*, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001; SAVINO *et al.*, 2004; LIMA, & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Estas células SP emigram do órgão através dos vasos localizados na JCM, alcançando a corrente sanguínea e indo povoar as áreas timo-dependentes dos órgãos linfóides periféricos (LIND *et al.*, 2001; ANDERSON & JENKINSON, 2001; GILL *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2007), conforme ilustrado na figura 5.

Os linfócitos T maduros, uma vez ativados, podem também recircular. Esta recirculação ocorre num grau muito menor do que aquele observado entre os linfócitos B maduros, mas provavelmente os mecanismos utilizados para a migração seletiva de ambos são os mesmos. A recirculação de linfócitos T não é aleatória, pois tal processo requer um mecanismo ativo de reconhecimento destas células pelas células endoteliais, através de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas na superfície das células T e os contra-receptores correspondentes no endotélio. É a partir deste reconhecimento que ocorre diapedese dos linfócitos pela parede vascular (YOUNG, 1999; WESTERMANN *et al.*, 2001). Foi demonstrado que as quimiocinas e seus receptores desenvolvem um papel chave nas diferentes fases de maturação e migração para a periferia de células maduras que tenham passado pelos processos de seleção positiva e negativa (ANNUNZIATO *et al.*, 2001). Os principais antígenos de superfície em linfócitos T maduros se encontram no quadro 1.

Ao emergirem do timo, os linfócitos T expressam outras moléculas de membrana que, por um lado, marcam seu estágio de diferenciação e, por outro, os tornam capazes de novas interações celulares (BOYD *et al.*, 1993).

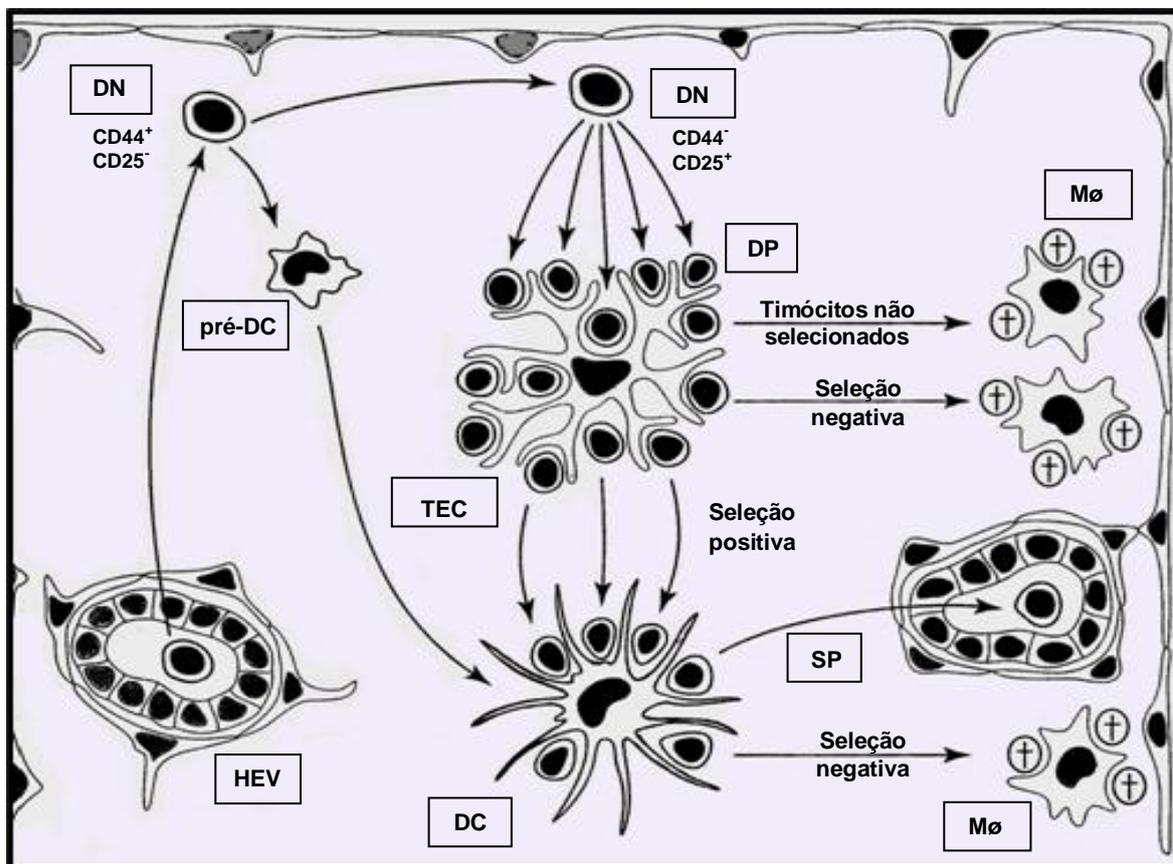


Figura 5. Diferenciação intratímica de linfócitos. Nos adultos, os precursores das células T penetram no órgão à altura da junção córtico-medular transmigrando através das HEV para o interior do parênquima, iniciando um programa altamente ordenado de diferenciação, o qual ocorre no contexto da migração através do microambiente tímico. HEV, vênula de endotélio alto; TEC, células epiteliais;; DC, células dendríticas; MO, macrófagos (BLACKMAN *et al.*, 1990).

Quadro 1
Principais antígenos de superfície em linfócitos T maduros

Antígenos Característicos
TCR - Receptor clonal, interação com MHC classe I e II/peptídeo
CD3 - Complexo acessório, associado ao TCR
CD2 - Interage com LFA-3 na célula apresentadora de antígenos (APC)
CD4 - Marcador de linfócito T auxiliar (interação com MHC classe II)
CD8 - Marcador T supressor/citotóxico (interação com MHC classe I)
LFA-1 - Interage com ICAM-1 nas vênulas do endotélio alto (HEV)
L-selectina - Receptor de migração, liga-se às adressinas da HEV em linfonodos

1.2.1. Células Epiteliais Tímicas

As TECs são o principal componente celular do microambiente tímico e apresentam significativa heterogeneidade (BALERCIA *et al.*, 1990; MEIRELLES DE SOUZA *et al.*, 1993). São capazes de influenciar a proliferação, seleção e migração de células T, principalmente através da produção de substâncias como interleucinas, quimiocinas, hormônios tímicos, e através do contato mediado por moléculas de classe I e de classe II do MHC. Estas moléculas são capazes de apresentar peptídeos endógenos ao TCR expresso pelas TECs no contexto de co-receptores, respectivamente CD8 e CD4, também expressos na superfície dos tímocitos. O contato célula-célula também pode ser mediado por moléculas de adesão expressas pelas células epiteliais, através de moléculas de ECM e seus receptores (KIM *et al.*, 1998; van EWIJK *et al.*, 1999; SAVINO & DARDENNE, 2000). Além da heterogeneidade das TECs, foi proposta uma diversidade

funcional, segundo a qual vários tipos de interações celulares podem ocorrer entre TECs e timócitos em diferenciação (SAVINO *et al.*, 2002).

Ainda visando interações TEC/timócitos, experimentos *in vitro* têm demonstrado que as TECs sintetizam moléculas de ECM, tais como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (SAVINO *et al.*, 1986, 2003; LANNES *et al.*, 1991; VILLA VERDE *et al.*, 1994), assim como os receptores de ECM VLA-5, VLA-6 e CD44 (LANNES *et al.*, 1993; VILLA VERDE *et al.*, 1994)

Alguns dos diferentes tipos de interações TEC/timócitos estão resumidos de forma esquemática na figura 6.

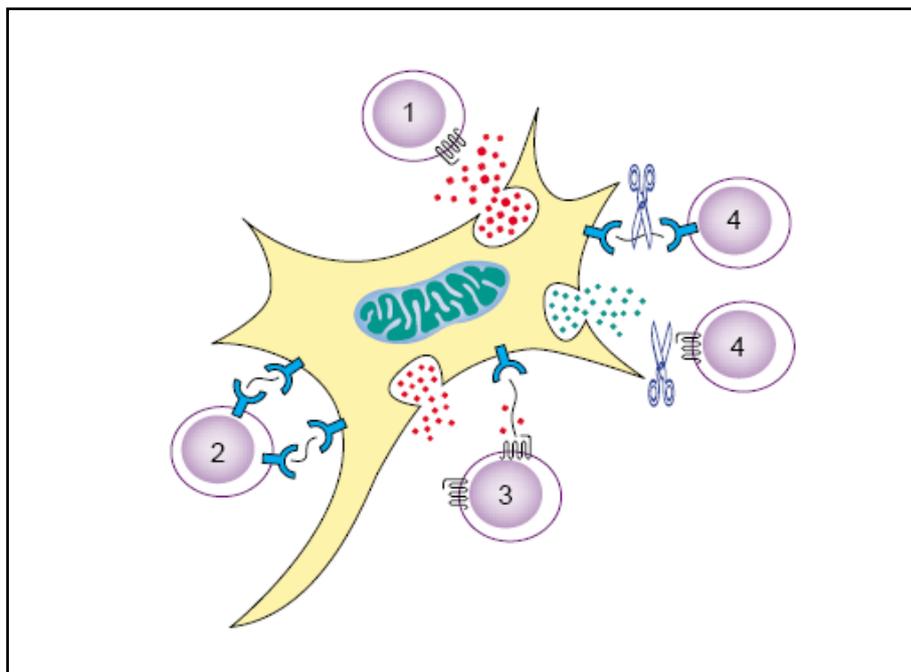


Figura 6. Heterogeneidade de interações entre células epiteliais tímicas e timócitos. Algumas das interações que podem ocorrer entre os timócitos e as células do microambiente tímico estão demonstradas no esquema acima, onde em 1) pode ser observado uma típica interação entre o receptor de quimiocina e sua respectiva molécula, em 2) uma interação mediada por receptores tipo integrinas e a ECM; em 3) uma molécula de ECM que pode se ligar e apresentar uma molécula de quimiocina ao timócito; em 4) esta mostrado um processo homeostático representado por tesouras de metaloproteinases as quais podem romper a ECM ou as interações através de quimiocinas (SAVINO *et al.*, 2002).

No timo de várias espécies animais pode-se isolar uma estrutura linfoepitelial que dependendo da espécie animal é capaz de envolver grande número de timócitos (20-200), predominantemente de fenótipo imaturo CD4⁺/CD8⁺. Essas estruturas denominadas de células “*nurse*” do timo (TNC), são encontradas na região cortical dos lóbulos tímicos em forma de complexo. As TNCs representam um exemplo de contato íntimo entre as células do microambiente tímico, e podem ser usadas como modelo *in vitro* para estudos de migração (VILLA VERDE *et al.*, 1995).

1.3. Matriz Extracelular

A ECM é uma rede complexa de macromoléculas que proporcionam um arcabouço físico para a estabilização da estrutura tecidual, modulando o comportamento celular (HORTA & AGUIAR, 2006). Inicialmente, pensava-se que a ECM tinha como única função a sustentação e o preenchimento dos tecidos. Hoje, no entanto, sabe-se que a interação das células com a ECM é um evento crítico em diversos processos fisiológicos, tais como, manutenção da arquitetura tecidual, morfogênese, desenvolvimento embrionário, entre outros (ROSSO *et al.*, 2004). Além disso, no sistema imune está envolvida na diferenciação, migração e ativação de linfócitos (de SOUZA *et al.*, 1991; SUNDQVIST *et al.*, 1993). A ECM tímica foi primeiramente analisada por Henry (1967) e Savino (1982) que descreveram a distribuição de fibras reticulínicas e fibras elásticas respectivamente em timos humanos e de gambá.

As macromoléculas que constituem a ECM são: (1) sistema colágeno, (2) sistema elástico, (3) proteoglicanas, e (4) glicoproteínas multifuncionais (laminina, fibronectina, tenascina e outras). Cada uma desempenha funções de maneira integrada com as demais, isso faz com que a ECM seja classificada como um verdadeiro complexo funcional. Os colágenos e o sistema elástico constituem a arquitetura da ECM, e em conjunto com as glicoproteínas atuam como moléculas de adesão do substrato intercelular, importante nas interações célula-célula e

célula-matriz. Os glicosaminoglicanos e proteoglicanos têm um papel fundamental no equilíbrio hidroeletrólítico e ácido básico (revisto em ARENAS & ZURBARÁN, 2002).

Muitas das interações entre as células e a ECM responsáveis por tais eventos são mediadas por receptores de superfície celular da família das integrinas (SAVINO *et al.*, 2003), as quais servem de união entre a ECM e o citoesqueleto (ARENAS & ZURBARÁN, 2002) e dentre estas substâncias podemos destacar a laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, pela grande importância nos processos de adesão e migração de vários tipos celulares, inclusive das células hematopoéticas (ANJOS *et al.*, 2000).

No timo, dentre as moléculas de ECM, a laminina e a fibronectina são produzidas pelo menos por TECs, células fagocitárias do retículo tímico (PTR) e fibroblastos. Interessantemente, as células do microambiente tímico e os timócitos expressam os receptores para laminina (VLA3 e VLA6), e os receptores para fibronectina (VLA4 e VLA5) (SAVINO *et al.*, 2000, 2002).

Alguns modelos *in vitro*, têm demonstrado que a adesão e a migração de timócitos sobre TECs, assim como sobre PTRs, são eventos mediados por moléculas de ECM produzidas por células do microambiente tímico (SAVINO *et al.*, 1993; 1996; AYRES-MARTINS *et al.*, 2004).

Ainda neste sentido, estudos realizados *in vitro* com TNCs isoladas a partir de timo de camundongos, mostraram que laminina e fibronectina aceleram a liberação de timócitos por TNCs sendo que esta liberação é bloqueada parcialmente por anticorpos anti-laminina e anti-fibronectina (VILLA-VERDE *et al.*, 1994). O quadro 2 mostra as diferentes moléculas de ECM produzidas no microambiente tímico.

1.3.1. Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína de adesão celular, classificada como um dímero de 450 kD (kiloDaltons), composto por duas extensas subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de 225 kD, ligadas por um par de pontes

Quadro 2. Moléculas de ECM produzidas por células do microambiente tímico.

Molécula	Localização Intralobular	Fonte celular
Fibronectinas		
Convencional	C – M	TEC, PTR, Fb
Derivada de “Splice” alternativo	C – M	ND
Lamininas		
Laminina – 1	C – M	TEC, Fb
Laminina – 2	C	TEC
Laminina – 5	C ou M	TEC
Nidogênio	C – M	TEC, Fb
Colágenos		
Tipo I	C – M	Fb
Tipo III	C – M	Fb
Tipo IV	C – M	TEC, PTR, Fb
Galectinas		
1	C – M	TEC
3	C – M	TEC, PTR
9	C – M	TEC,
Glicosaminoglicanas		
Heparan sulfato	ND	TEC
Ácido hialurônico	C – M	TEC

Distribuição do lóbulo tímico. C= córtex; C-M=cortex e medula; Fb=fibroblastos; M=medula; ND= não determinado; PTR= célula fagocitária do retículo tímico; TEC=célula epitelial tímica.

Fonte: Savino *et al*, 2003

dissulfídicas através de seus terminais carboxílicos. É uma glicoproteína de ECM multifuncional, considerada uma das principais proteínas adesivas, sendo encontrada tanto em tecidos como no sangue (YAMADA, 1994).

Existem três formas de fibronectina: (1) um dímero solúvel, denominado fibronectina plasmática, que circula no sangue e em outros líquidos corporais, importante na coagulação sanguínea, (2) um oligodímero de fibronectina unido a superfície celular e (3) fibrilas de fibronectina encontrada na ECM. Cada cadeia polipeptídica da fibronectina é constituída de uma série de domínios estruturais e funcionais, contendo a molécula pelo menos seis sítios peptídicos capazes de promover adesão celular, sendo classificados em três regiões gerais: o domínio central de ligação celular, a região III CS de *splicing* alternativo, e o domínio de ligação à heparina. É no domínio central de ligação às células onde se encontra a seqüência polipeptídica RGD (Arg-Gly-Asp), a qual se liga ao receptor clássico da fibronectina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5), enquanto a região IIICS contém as seqüências LDV (Leu-Asp-Val), assim como REDV (Arg-Glu-Asp-Val) as quais são reconhecidas pelo receptor $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), que por serem reguladas por *splicing* alternativo do mRNA não estão presentes em todas as isoformas (HAY, 1991).

Além de estar envolvida na adesão, essa glicoproteína também participa dos processos de migração, polaridade, forma, crescimento e diferenciação celular (HYNES, 1986), bem como reparação de tecidos, fagocitose de bactérias, complexos antígeno-anticorpos, servindo como substrato para enzimas fibrolíticas e da coagulação. Vários tipos celulares podem sintetizar fibronectina. No fígado, as células parenquimatosas e, praticamente todas as células sinusoidais, como células de Kupffer, células endoteliais e estelares são capazes de sintetizar essa glicoproteína. Entretanto, a maioria dos trabalhos sugere que a maior parte, senão toda a fibronectina circulante seja produzida pelos hepatócitos (PARISE *et al.*, 2004).

Nos processos intratímicos, vale salientar sua participação na adesão de timócitos de fenótipo imaturo $CD4^{-8}/CD4^{+}CD8^{+}$ às células do microambiente tímico através da interação com seus respectivos receptores (UTISUMI, 1991). Villa-Verde e col. (1995) demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-fibronectina é capaz de influenciar a migração *in vitro* de timócitos a partir de complexos linfoepiteliais TNC.

1.3.2. Laminina

As Lamininas compreendem uma grande família de glicoproteínas localizadas em membranas basais, possuindo multidomínios, e sendo o principal componente de membrana basal não colagenoso (TIMPL *et al.*, 1979; Hay, 1991; revisto em AYRES-MARTINS, 1996).

A primeira molécula de laminina a ser purificada e caracterizada foi obtida a partir do tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) produtor de membrana basal (HAY, 1991), possuindo um peso molecular de 900.000 kD. Esta isoforma de laminina tem forma de cruz e é composta por três cadeias polipeptídicas diferentes, denominadas α -1, β -1 e γ -1. Contém regiões compatíveis com receptores tipo integrinas e a interação se dá através de várias seqüências de aminoácidos localizados em vários domínios das moléculas (BECK *et al.*, 1990; BROWN & GIAVAZZI, 1994). Sua estrutura permite a formação de domínios distintos relacionados a funções específicas.

Há pelo menos 15 isoformas de lamininas já descritas, de acordo com as associações triméricas que podem envolver cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ , codificadas por genes distintos (MINER *et al.*, 1997; COLAGNATO & YURCHENKO, 2000). Entretanto, Klutesa e col. (2002), estudando as isoformas de laminina no timo, demonstrarem que a laminina que contém a cadeia α 1 (LN-1) não é expressa no timo humano. Todavia, isoformas de laminina que contém a cadeia α 2 (lamininas-2/4) ou a cadeia α 5 (lamininas-10/11) São expressas no epitélio subcapsular e em vasos sanguíneos tímicos, estando a expressão da cadeia α 4 da laminina aparentemente restrita às células endoteliais do timo, podendo a laminina-5, isoforma que contém a cadeia α 3, ser detectada em células epiteliais medulares tímicas e fracamente no epitélio subcapsular.

Como outras proteínas de ECM, a laminina apresenta vários domínios funcionais, que permitem ligações a moléculas como: colágeno tipo IV, heparan-sulfato, nidogênio e ainda aos receptores protéicos de laminina localizados na superfície celular, geralmente do tipo integrinas (MINER *et al.*, 1997). É através dessas interações que as lamininas contribuem para diferenciação, forma, migração e sobrevivência celular (COLOGNATO & YURCHENKO, 2000).

Entre as funções conhecidas da laminina estão a ação na adesão celular, indução da formação de neuritos e função mitogênica (ENGVALL, 1994), assim como, mediação da ligação das células epiteliais ao colágeno tipos IV das membranas basais (YURCHENCO & SCHITTONY, 1990; ENGVALL, 1994). Hoje já é sabido que a laminina, pode agir no posicionamento sítio-específico de linfócitos (BARBOSA, 1999).

1.3.3. Receptores de Matriz Extracelular

As integrinas são moléculas de glicoproteínas transmembrana, compostas por dois heterodímeros não-covalentes designados como subunidades α e β , cada uma com grande domínio extracelular e pequena, porém importante, extensão citoplasmática e participam na organização tissular, assim como, receptores para outras moléculas de adesão (ver revisão SONNENBERG, 1993). A adesão mediada por integrinas é um processo que requer energia, a qual também depende de cátions divalentes extracelulares (revisão por DIAMOND & SRINGER, 1994).

Como heterodímeros compostos de subunidades α e β , podem se combinar de forma não covalente, interligando a ECM ao citoesqueleto e transmitindo sinais bioquímicos para dentro da célula (PAKIANATHAN, 1995).

Existem pelo menos 15 cadeias α e 8 cadeias β que já foram clonadas e seqüenciadas. Os leucócitos expressam 13 diferentes integrinas as quais mediam a ligação com as células endoteliais. As mais importantes para adesão endotelial são as integrinas β 1, β 2 (CD18) e β 7. A subfamília β 2 é expressa em todos os leucócitos e consiste em uma subunidade β 2 ligada a uma das quatro subunidades α : CD11a (α L), CD11b (α M), CD11c (α X) ou CD11d (α D). Os linfócitos produzem primariamente CD11a/CD18 (LFA-1 ou antígeno 1 associado a função linfocitária), enquanto que os eosinófilos, neutrófilos e monócitos produzem todas as quatro β 2 integrinas. A expressão de uma ou mais integrinas ocorre na superfície de qualquer célula do organismo, exceto em eritrócitos maduros (revisão por DIAMOND & SPRINGER, 1994).

Como definido anteriormente, as integrinas, formam uma classe de moléculas de adesão localizadas na superfície celular, que mediam a adesão célula-matriz extracelular, as quais são cruciais para diversos processos biológicos normais ou não, tais como a diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário, a transdução de sinais, a resposta imunológica, a manutenção da estrutura celular, a cicatrização de ferimentos e a formação de metástases (DENNIS *et al.*, 1997).

Uma das famílias das integrinas importantes que servem de receptores para a ECM, é a família dos VLAs (*very late antigens*) na qual a subunidade $\beta 1$ pode se associar a uma das diferentes subunidades α . Esta associação entre a subunidade $\beta 1$ a uma das subunidades α ($\alpha 1/7$ e αv), determina a(s) especificidade(s) a um determinado ligante, como por ex., $\alpha 5\beta 1$, receptor para fibronectina, ou $\alpha 6\beta 1$, receptor para laminina, e assim por diante (BOSMAN, 1993). Além disso, várias integrinas podem se ligar a mais de um ligante, como é o caso da $\alpha 4\beta 1$ que pode funcionar como receptor de fibronectina e também da molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (SONNENBERG, 1993). Crisa e col. (1996) propuseram o modelo no qual a adesão e migração dos timócitos seria mediada pelas integrinas VLA-4 e VLA-5 coordenadamente com o seu desenvolvimento dentro do timo. Também ficou demonstrado que a expressão de VLA-4 nos timócitos DN funciona como uma importante integrina na interação com as células estromais, sendo o nível de expressão dessa integrina diminuída à medida que o timócito amadurece. Além disso, a maioria dos timócitos maduros SP são menos adesivos as células estromais tímicas por seu reduzido nível de expressão de VLA-4 (SAWADA *et al.*, 1992).

1.5. Células Endoteliais

A célula endotelial possui uma forma alongada com um núcleo proeminente, várias organelas, e na sua forma adulta observa-se a presença de invaginações ultraestruturais na membrana citoplasmática, chamadas de cavéolas (MICHEL, 1998), e compõe o revestimento mais interno da parede dos vasos

sangüíneos (MOHAMMAD & BOS, 1990). Este é constituído de uma superfície de células endoteliais, lâmina basal e camada adventícia de tecido conjuntivo (NABARRA & ANDRIANARISON, 1995). A camada adventícia e a média compõem o suporte estrutural da parede do vaso e são importantes na sua remodelagem (VERRIER & BOYLE, 1996). No entanto, alterações na morfologia celular estão associadas com a diferenciação celular, proliferação, migração e as interações célula-célula. *In vivo*, células endoteliais vasculares são alongadas e alinhadas com direção do fluxo sanguíneo. No nível de capilaridade, as células endoteliais são planas e células simples percorrem ao redor para formar a luz do vaso (TINELI *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas o conhecimento sobre a função da célula endotelial vascular mudou muito. Foi demonstrado que a célula endotelial modula o tônus vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980), e ao formar o endotélio mantém relacionamentos não só entre si através de junções celulares, como também com células musculares lisas que existem na túnica íntima por junções mioendoteliais (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1988) e, por meio de filamentos de ancoragem, com a lâmina basal sobre a qual repousa (MOHAMMAD & BOS, 1990). Talvez a função mais conhecida da célula endotelial seja a barreira da permeabilidade, pela qual se regulam as trocas e o transporte ativo de substâncias na parede dos vasos (VERRIER & BOYLE, 1996).

Assim como as células e a ECM constituintes do microambiente tímico são cruciais para o desenvolvimento dos linfócitos T, os vasos sanguíneos (VS) são decisivos para a entrada dos precursores e sua saída, como células T imunocompetentes para os órgãos linfóides secundários e periferia (NABARRA & ANDRIANARISON, 1995; ROSSO *et al.*, 2004). Meredith e col. (1993) demonstraram por meio de experimentos *in vitro* com células endoteliais humanas que a ECM é necessária para prevenir a morte programada dessas células, sendo mediado pela integrina $\beta 1$.

As células endoteliais têm surgido como um importante alvo para IL-1. A IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF) ativam as funções das células endoteliais, principalmente no que diz respeito à inflamação e à trombose. Isso inclui a produção de atividade procoagulante, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), alterações na trombosmodulina, via de anticoagulação da proteína C, além

da expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas (BORASCHI *et al.*, 1991). As células endoteliais também sintetizam e armazenam nos corpos de Weibel-Palade um polímero formado por um número variável de unidades de 220 kD denominado fator de von Willebrand, que também é sintetizado pelos megacariócitos (de WIT *et al.*, 2003)

No timo, vários estudos mostram que os vasos sanguíneos penetram no parênquima tímico na região próxima a junção córtico-medular, onde de fato entram os precursores de linfócitos T. Nesta região as células endoteliais acham-se modificadas, apresentando uma morfologia cubóide ou colunar, sendo denominadas HEV (vênulas do endotélio alto). Estas células favorecem a entrada dos precursores para dentro do parênquima tímico, assim como, a saída dos linfócitos T já diferenciados (KRAAL & MEBIUS, 1997).

O recrutamento dos linfócitos T imaturos se dá através de sinais do sangue para essas regiões específicas no interior deste órgão. Dentre outras capacidades, as células endoteliais são habilitadas em liberar sinais para tal recrutamento, que por sua vez também depende de elementos perivasculares, incluindo revestimento perivascular epitelial em torno dos vasos sanguíneos, bem como outros “estromas” e/ou células destas regiões (PETRIE, 2002).

Diante dos constantes avanços da ciência na área da imunologia, e da indubitável importância que esta área vem adquirindo atualmente, faz-se necessário o empreendimento de estudos que visem conhecer aspectos diversos no que diz respeito ao sistema imunológico, e considerando-se que a expressão de ligantes e receptores de ECM e sua função na imigração de precursores, e emigração e endereçamento de células T do timo, ainda permanece pouco estudada, ressalta-se a importância de um estudo concernente a expressão de algumas proteínas de ECM e seus receptores (ECMr), usando como ferramenta cultura de células endoteliais tímicas e seu papel na interação entre estas células e os timócitos.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de ligantes e receptores de ECM em uma linhagem de células endoteliais tímicas tEnd.1, assim como, avaliar o papel dessas moléculas na interação entre timócitos e essas células.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar *in vitro*, a expressão dos ligantes e receptores de ECM nas células endoteliais tímicas da linhagem tEnd.1;

Analisar funcionalmente a capacidade de adesão de timócitos as células endoteliais, frente ao bloqueio dos receptores de ECM;

Avaliar o papel da ECM na transmigração de timócitos através das células endoteliais tEnd.1.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Para os ensaios com timócitos, foram utilizadas células linfóides intratímicas de camundongos isogênicos machos, da linhagem C57BL/6, com 4 semanas de vida pós-natal, mantidos sob condições de água e alimento *ad libitum*. Os animais foram provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). Todos os procedimentos com animais realizados neste trabalho estiveram de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz.

3.2. Reagentes

Meio de cultura RPMI 1640, albumina sérica bovina (BSA), L-glutamina, dimetilaminobenzeno (DAB), salina fosfatada tamponada (PBS), trypan blue, todos obtidos da Sigma Co. (Saint Louis USA). Soro bovino fetal (FCS), obtido da Cultlab (Campinas, SP), e o formaldeído 37% da Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

3.3. Anticorpos

Foram utilizados anticorpos purificados anti-fibronectina, anti-laminina, produzidos em coelho (Sigma, Chemical, St. Louis USA); além dos anticorpos monoclonais purificados (MAb) anti-receptor de fibronectina, CD49e (anti-VLA5), e anti-receptor de laminina, CD49f (anti-VLA6), produzidos em rato, pela Pharmingen (San Diego, USA); e o anticorpo anti-citoqueratina (Dako Co, Carpinteria, USA). Além destes, foram utilizados também os mesmos MAb anti-receptores de ECM, marcados diretamente com ficoeritrina (PE), CD49ePE e CD49fPE. Para a marcação dos timócitos, foram utilizados anticorpos anti-CD4PE e anti-CD8 cychome (Cy), todos produzidos pela Pharmingen (San Diego, USA).

Como controles negativos, dependendo das especificações dos anticorpos primários, foram usadas imunoglobulinas (Ig) purificadas de coelho ou rato ou marcadas diretamente com PE, todos produzidos pela Pharmingen (San Diego USA).

Como sistemas de revelação foram utilizados soros biotinizados de cabra anti-Ig de coelho e de carneiro anti-Ig de rato marcados com peroxidase (respectivamente GAR-PO e GARAT-PO), e o complexo estreptavidina-fluoresceína, todos obtidos da Amersham Int. (Buckinghamshire, Inglaterra).

3.4. Cultura de Células

3.4.1. LINHAGEM DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

A linhagem de células endoteliais tEnd.1 usada neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da FIOCRUZ/RJ, a mesma é derivada de vasos sangüíneos de timo de camundongos C57BL6, a partir da injeção de *polyomavírus* em camundongos recém-nascido e adultos. Esse procedimento resultou no aparecimento de múltiplos hemangiomas que induziram a formação de vasos sangüíneos em diferentes tecidos dos animais. As células desses vasos foram estabelecidas em diferentes linhagens dependendo do órgão de origem, as quais mantiveram as características de células endoteliais, como por exemplo, a expressão do fator de von Willbrand (WILLIAMS, *et al*, 1988).

3.4.2. CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células endoteliais da linhagem tEnd.1 foram mantidas pelo plaqueamento em garrafas de 75mm² (Nunc Co., Roskilde, Dinamarca), em meio RPMI suplementado (com 10% de FCS e 2mM de L-glutamina). Após 24 horas de

incubação a 37° C em ambiente de 5% de CO₂, as culturas foram lavadas com meio sem soro e incubadas por 1 h, após as quais foram fixadas com etanol por 5 minutos e usadas na realização de ensaios de imunocitoquímica (imunofluorescência) para avaliar a expressão de componentes de ECM.

3.4.3. OBTENÇÃO DOS TIMÓCITOS:

Os timócitos foram obtidos a partir de timos de camundongos C57BL6 dissociados em homogeneizador de tecido do tipo “Potter”, e utilizados após verificação da viabilidade por azul de tripan quando a mesma foi igual ou superior a 95%.

3.5. CITOFUORIMETRIA

Objetivando determinar o fenótipo das células endoteliais quanto a expressão de ligantes e receptores de ECM, e dos timócitos que participaram nas interações tEnd.1/timócitos quanto a expressão das moléculas CD4 e CD8, foram realizados ensaios de citofluorimetria dessas células.

Para tanto, as células tEnd.1 foram recolhidas e centrifugadas a 400 g, a 4 °C por 10 minutos, ressuspensas em PBS/BSA e lavadas por centrifugação, sendo todo o experimento mantido a mesma temperatura. Cerca de 10⁵ células viáveis foram distribuídas por poço da microplaca de PVC descartável de 96 poços com fundo em U (Alfesa, São Paulo, Brasil), e a mesma centrifugada como descrito acima. A seguir, as células foram incubadas com os anticorpos purificados anti-fibronectina (anti-FN) ou anti-laminina (anti-LN), ou ainda, com os anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6 diretamente marcados com o fluorocromo PE, assim como os seus respectivos controles de isotipo. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com 100 µl de PBS/BSA, sendo a detecção dos anticorpos anti-FN e anti-LN revelada com o conjugado GARalexa 488. Todas

as análises foram feitas por citometria de fluxo no aparelho FACScalibur® (Becton & Dickinson, CA, USA) com o programa CellQuest, e processadas no software WinMDI versão 2.8.

Para a avaliação do perfil dos timócitos, os mesmos foram recolhidos, centrifugados a 400 g, 4 °C por 10 minutos, ressuspensos em PBS/BSA e lavados por centrifugação, sendo todo o experimento mantido a mesma temperatura (4 °C). Após centrifugados, os timócitos foram contados e distribuídos na microplaca descartável de 96 poços, e a mesma, centrifugada como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e os timócitos ressuspensos em 2 µl de soro normal de camundongo por 10 minutos. Em seguida, foram incubados com anticorpos anti-CD4FITC e CD8Cy, ou ainda Ig não relacionada, marcadas com os mesmos fluorocromos por 30 minutos. A seguir, as células foram lavadas com 100 µl de PBS, sendo fixadas com PBS/Formaldeído a 1%. Todas as análises foram feitas como descrito acima para as células endoteliais tEnd.1.

3.6. Ensaio de Imunocitoquímica

3.6.1. Ensaio de Imunofluorescência Confocal:

Os ensaios de imunofluorescência confocal para detecção de componentes de ECM, fibronectina e laminina, foram realizados em placas do tipo Labtek de vidro de 8 poços. As células tEnd.1 foram contadas e plaqueadas em número de 10^5 por poço e cultivadas por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ e fixadas por 5 minutos com etanol absoluto. Em seguida foram hidratadas com PBS durante 10 minutos, e logo após foi colocado PBS/BSA 1% em cada poço por 30 minutos para o bloqueio dos sítios inespecíficos. A seguir foram colocados os anticorpos primários anti-FN ou anti-LN, os controles negativos anti-citoqueratina total e Ig de coelho não relacionada por 1h a temperatura ambiente (TA). Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS (5',10',5') e foi colocado o anticorpo secundário GARalexa488 por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com

PBS (5',5',5'), a lâmina montada com anti-pheding e observada por microscopia confocal.

3.6.2. Ensaio de Imunoperoxidase

Os ensaios de imunoperoxidase para detecção dos receptores de ECM foram realizados da seguinte forma: placas de Petri de 35 mm de diâmetro (Nunc, Roskilde, Denmark) com 24 horas de cultura de tEnd.1 foram fixadas como descrito acima e incubadas com PBS/BSA 1% por 20 minutos a TA, para neutralização de uma eventual ligação inespecífica dos anticorpos primários. A seguir as culturas foram incubadas com anticorpos específicos para os receptores de FN ou LN (VLA5 e VLA6), tendo como controles negativos a omissão do anticorpo específico ou sua substituição por Igs purificadas de rato. Após 45 minutos de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos, seguindo-se incubação com o anticorpo secundário GARAT-PO, por mais 45 minutos. Após nova lavagem, como descrito acima, a atividade enzimática foi revelada pelo dimetilaminobenzeno (DAB) em presença de H₂O e as placas observadas ao microscópio óptico.

3.7. ENSAIOS DE ADESÃO

Objetivando determinar uma possível participação das moléculas de ECM nas interações tEnd.1/timócitos, foram realizados ensaios com anticorpos anti-receptor de ECM (anti-VLA5 e anti-VLA6) com o objetivo de bloquear a formação destes complexos. Para isso, as células tEnd.1 foram contadas e plaqueadas com meio RPMI suplementado, em número de 5×10^5 células por garrafa de 25 cm² (Corning Glass Works, NY, USA) e cultivadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂ para adesão. Após este período, as células sofreram duas lavagens consecutivas com PBS, e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 1% por 30

minutos. Enquanto isso, os timócitos foram pré-tratados com os anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6, assim como com Ig de rato purificada, por 1h a 4 °C na concentração de 10 µg/mL. Logo após os timócitos foram lavados em PBS e adicionados sobre as tEnd.1 a uma relação de 50:1, e as garrafas incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 1 h. A seguir, as culturas foram lavadas delicadamente com PBS a 37 °C para remoção dos timócitos não aderidos. As células foram fixadas com etanol absoluto durante 10 minutos e coradas com Giemsa para obtenção do índice de adesão (IA). Para obter o índice de adesão, utilizamos a fórmula abaixo (LANNES-VIEIRA *et al.*, 1993; VILLA-VERDE *et al.*, 1993):

$$IA = \frac{\text{tEnd.1 com timócitos aderidos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de tEnd.1}} \times \frac{\text{timócitos aderidos nas tEnd.1}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de tEnd.1}} \times 100$$

Em outros experimentos os timócitos foram liberados da co-cultura, adicionando-se PBS gelado, e contados em câmara de Neubauer, para obtenção do número absoluto dos timócitos que aderiram as células tEnd.1, assim como, de seu perfil fenotípico por citofluorimetria (vide seção 3.5).

3.8. ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL

Para avaliar a participação das moléculas de ECM na migração transendotelial, foram realizados ensaios do bloqueio dos receptores $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ incubando-se previamente os timócitos com anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6. A concentração de todos os anticorpos anti-ECM utilizados nos ensaios de inibição foi de 10 µg/mL.

As células tEnd.1 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células em 500 µl de meio RPMI suplementado/inserto da placa de 24 poços e incubadas por 48 h a 37 °C, 5% CO₂, para recobrirem toda a membrana de 10mm com poros de 8 µm (Corning Costar, Cambridge, USA). Após este tempo, o meio antigo foi removido e os insertos lavados com RPMI sem soro por 1h. Enquanto isto, os

timócitos foram obtidos como descritos na seção 3.4.3, e previamente tratados com anticorpos MAb purificados anti-VLA5 ou anti-VLA6 ou ainda com Ig não relacionada, e 2×10^6 timócitos foram adicionados em meio de cultura sem soro às tEnd.1. A co-cultura foi então incubada a 37°C, 5% CO₂ por 10h. Em seguida, os timócitos que transmigraram para a câmara inferior da placa de 24 poços foram recolhidos, contados, marcados com anticorpos anti-CD4PE e anti-CD8PE e fixados em PBS/1% formaldeído. Além do número absoluto de células migrantes, foi avaliado também o perfil fenotípico e a capacidade migratória de cada subpopulação definida por CD4 e CD8 por meio de citofluorimetria. Com o objetivo de normatizar o número de timócitos que transmigraram, o resultado foi expresso pelo cálculo do INPUT de cada subpopulação, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{INPUT} = \frac{\text{número de células migrantes de cada subpopulação}}{100} \times \text{número de células de cada subpopulação colocada no inserto}$$

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism® versão 2.1, através dos testes estatísticos t-student (não pareado) e Mann-Whitney (quando as análises eram feitas entre mais de dois grupos).

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS E RECEPTORES DE MATRIZ EXTRACELULAR

Objetivando saber se a linhagem de células endoteliais tímicas tEnd.1 expressava componentes de ECM, tais como fibronectina e laminina, assim como seus respectivos receptores VLA5 e VLA6, foram realizados experimentos segundo protocolos estabelecidos nos Laboratórios de Pesquisas sobre o Timo, Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ, e no de Imunohistologia/ICBS/UFAL. Para tanto, foram usados diferentes métodos.

Inicialmente as culturas de tEnd.1 com 24 horas de cultivo em câmaras de 8 poços tipo Labtek, foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência confocal. Essa técnica foi utilizada para detecção de proteínas de ECM expressas na superfície das células. Assim, ficou demonstrado que as células tEnd.1 expressam as proteínas de ECM, fibronectina e laminina, não tendo sido detectada marcação para citoqueratina, utilizada como controle negativo, uma vez que as células endoteliais não produzem essa proteína (dado não mostrado). Interessantemente, foi possível observar também por meio da técnica de imunoperoxidase, que é uma técnica na qual anticorpos são ligados quimicamente a enzima peroxidase, a expressão dos respectivos receptores desses ligantes de ECM, as integrinas VLA5 e VLA6 (Fig.7).

Objetivando conhecer o padrão de expressão desses componentes de ECM, os dados acima foram confirmados por citometria de fluxo. Esta técnica é uma técnica de medição das propriedades óticas de células individuais, ou partículas em geral. Nesta técnica, um fluxo contínuo de células passando sequencialmente, uma de cada vez, em frente a um feixe de laser com sensores que detectam a emissão de fluorescência e a dispersão de luz, fornece informações sobre os anticorpos ligados a essas células, além tamanho e da granularidade das mesmas. Na figura 8 pode-se observar histogramas da expressão de fibronectina e laminina nas células endoteliais tEnd.1, onde 79,78% dessas células expressaram fibronectina, enquanto foi observada a expressão de laminina em 95,05% das mesmas (quadro superior). Ainda na figura 8, foi demonstrada nas células tEnd.1 a expressão de VLA5 e VLA6, onde 80,08% das células marcaram positivamente para o anticorpo CD49ePE (específico para

VLA5) enquanto 67.73% delas foram positivas o anticorpo CD49fPE (específico para VLA6).

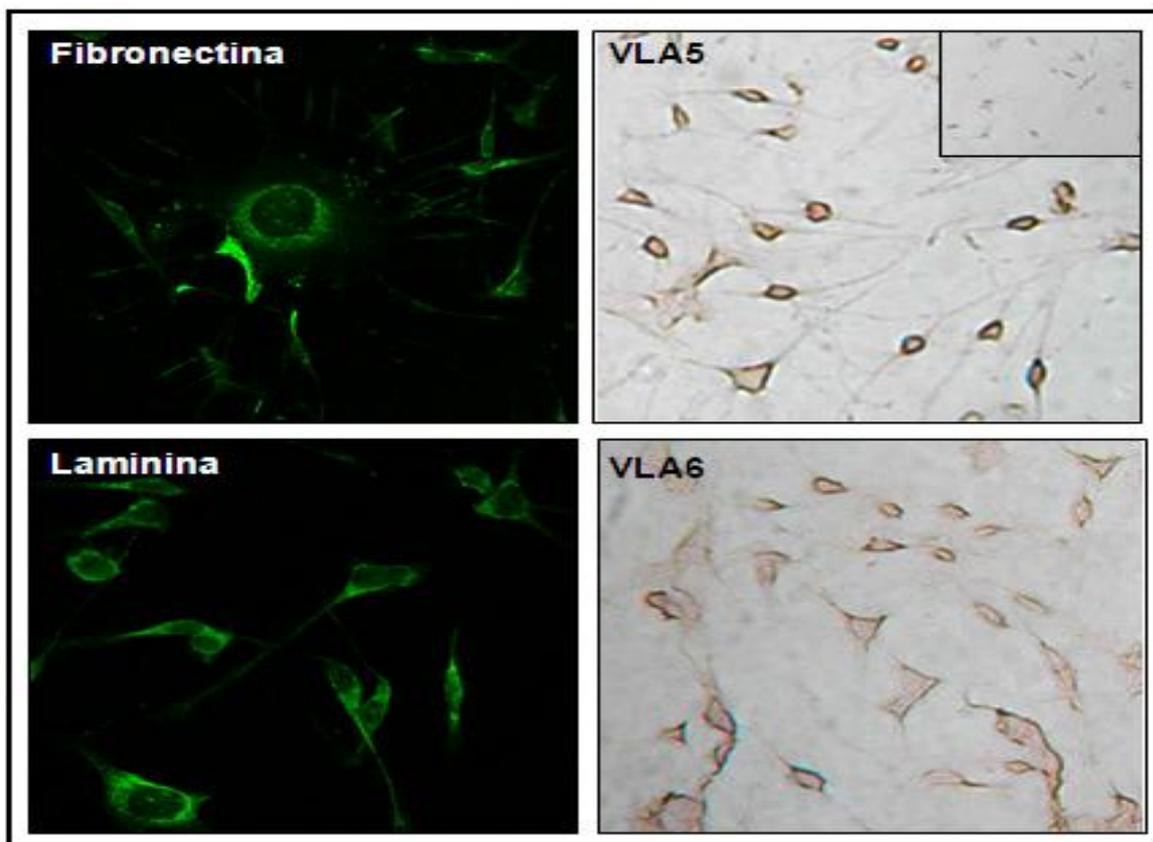


Figura 7. Expressão de ligantes e receptores de ECM por células endoteliais tímicas. Fotomicrografia do ensaio de imunocitoquímica confocal das células tEnd.1 submetidas aos anticorpos anti-FN ou anti-LN e reveladas em verde, pelo anticorpo secundário GAR-alexa488 (painéis a esquerda), onde observa-se a expressão de fibronectina e de laminina. Nos painéis a direita, estão demonstradas a expressão dos respectivos receptores VLA5 e VLA6 por meio da técnica de imunoperoxidase. No inserto, o controle negativo (Ig não relacionada). Aumento 100x.

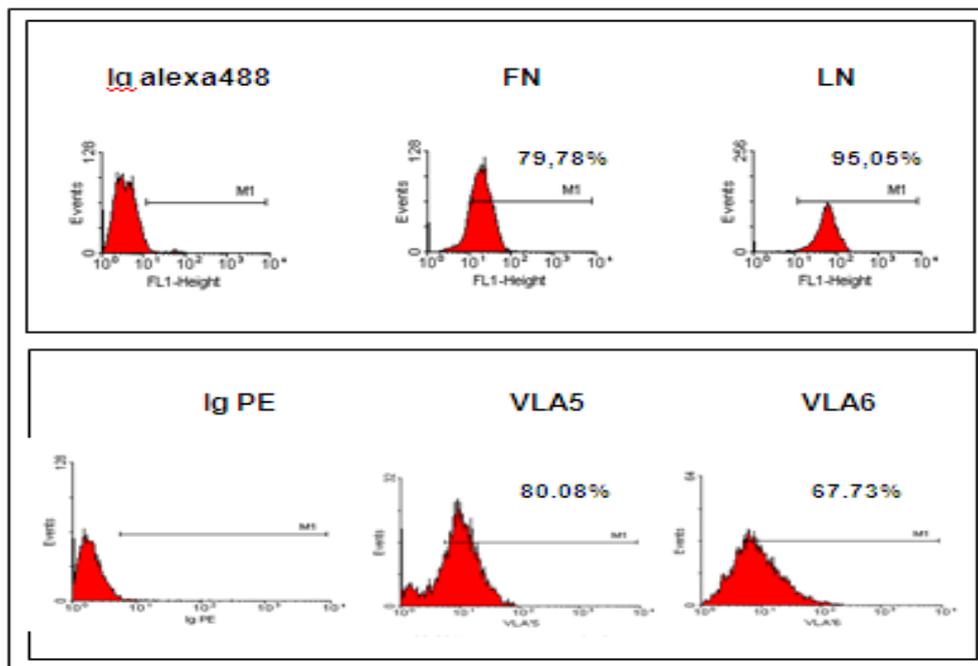


Figura 8. Expressão de ligantes e receptores por células endoteliais da linhagem tEnd.1. Histogramas mostrando a porcentagem das células t.END-1. positivas para a fibronectina e laminina (painel superior) e seus respectivos receptores VLA5 e VLA6 (painel inferior), determinadas por citofluorimetria.

4.2. PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ECM NAS INTERAÇÕES TEND.1/TIMÓCITOS.

4.2.1. ENSAIO DE ADESÃO

Após verificar que as células tEnd.1 expressavam os ligantes de ECM, fibronectina e laminina, e seus respectivos receptores VLA5 e VLA6, foram realizados ensaios funcionais de bloqueio de adesão.

Na figura 9 é possível observar o índice de adesão dos timócitos às células endoteliais tímicas, após tratamento prévio dos timócitos com anticorpos que bloqueiam os sítios de ligação aos seus respectivos receptores. Assim, foi observado em dois experimentos independentes o mesmo efeito biológico, no qual parece ter havido uma inibição da adesão daqueles timócitos pré-tratados com os anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6, que apresentaram um índice de adesão menor do que a Ig utilizada como controle de isotipo.

Ainda neste sentido, foi observado o número absoluto dos timócitos após liberação das células endoteliais, assim como, que subpopulação(ões) de timócitos estavam envolvidos neste evento biológico (Fig.10). Como resultado, na figura10A, pode-se observar um gráfico representativo de dois experimentos independentes do número absoluto de timócitos que foram pré-tratados como acima descrito, e que após 1 hora de incubação a 37 °C, 5% CO₂, foram liberados das células tEnd.1, contados e levados ao citômetro de fluxo para observação do seu perfil fenotípico. Os dados sugerem uma discreta participação da ECM neste evento, uma vez que houve uma pequena inibição da adesão no número dos timócitos pré-tratados em relação à Ig controle (Fig.10A), tendo este evento ocorrido discretamente no fenótipo DP (Fig.10B).

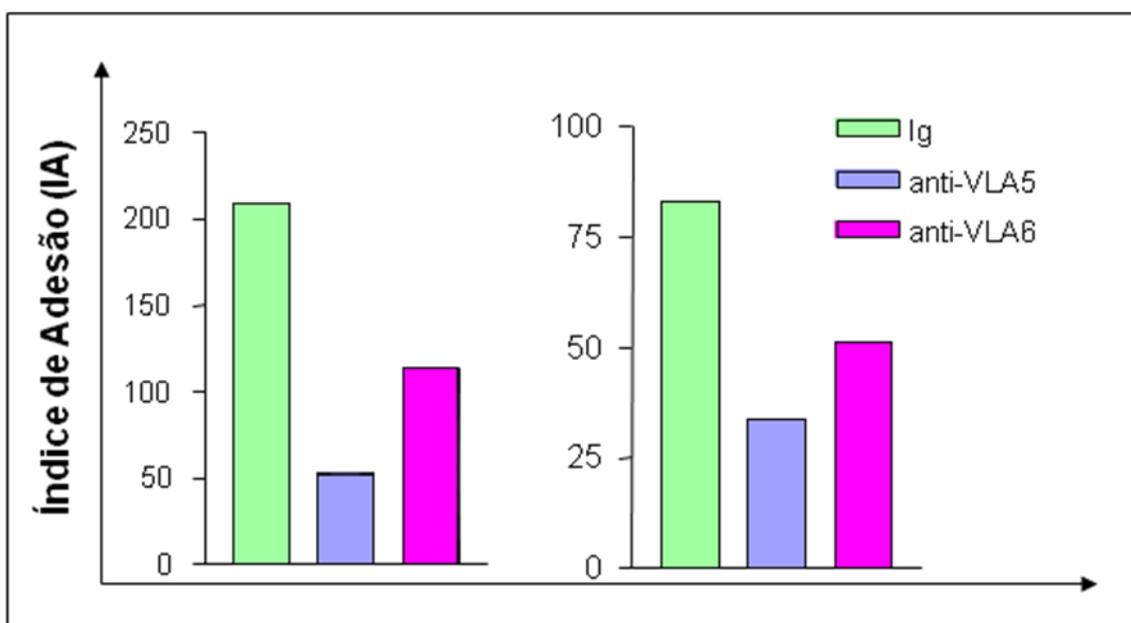


Figura 9. Padrão de adesão de timócitos às células endoteliais tEnd.1. Gráficos representativos mostrando o índice de adesão dos timócitos que foram pré-tratados com anticorpos anti-receptor de ECM, anti-VLA5 ou anti-VLA6 comparados aqueles pré-tratados com Ig controle.

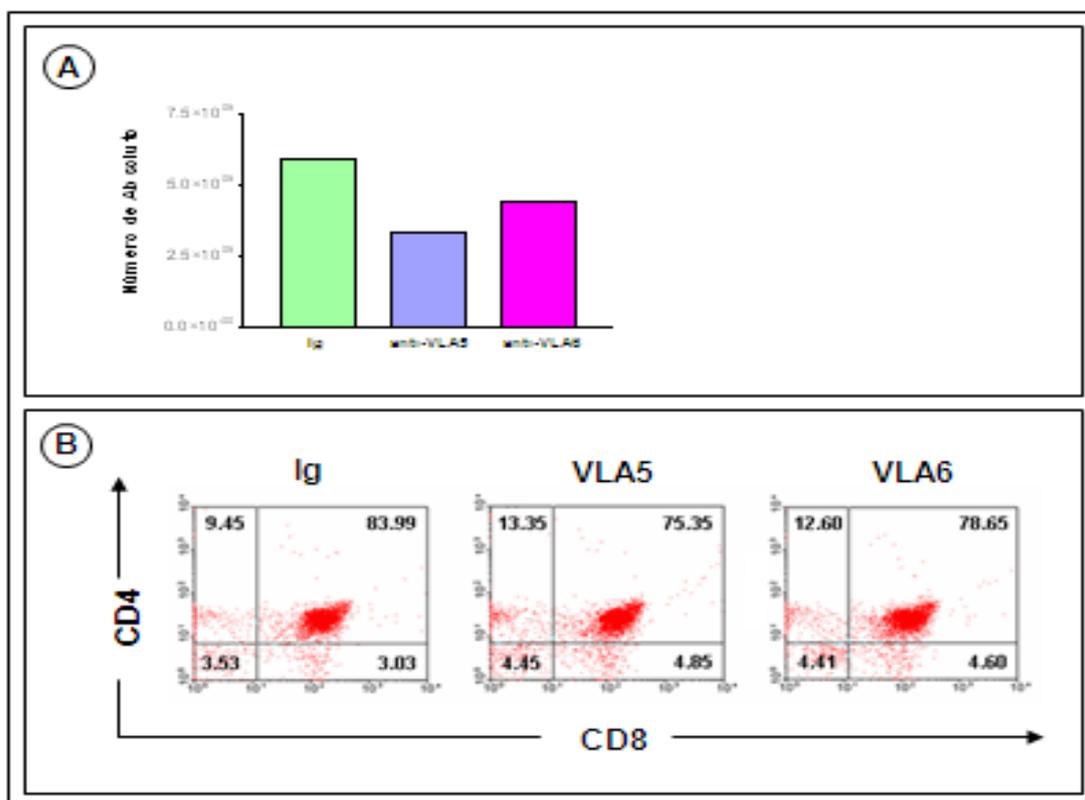


Figura 10. Modulação da adesão de timócitos às células endoteliais tímicas tEnd.1. Gráfico representativo de dois experimentos independentes mostrando um padrão sugestivo de diminuição do número absoluto dos timócitos pré-tratados com os anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6, quando comparados aos pré-tratado com seu controle de isotipo (A). Em B, observa-se dot-plot representativo de dois experimentos independentes, demonstrando o fenótipo dos timócitos após adesão às células endoteliais tímicas, os quais foram pré-tratados com os mesmos anticorpos anti-ECMr.

4.2.2. MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL

Com o objetivo de determinar uma possível participação das moléculas de ECM na transmigração dos timócitos através das células endoteliais tEnd.1, foram realizados ensaios de bloqueios nos quais os timócitos foram pré-tratados com os anticorpos anti-VLA5 e anti-VLA6, tendo como controle, o mesmo tratamento com uma Ig não relacionada. Os dados obtidos mostraram uma consistente diminuição dos números absolutos em relação à transmigração dos timócitos tratados com os anticorpos anti-ECMr, especialmente no caso do tratamento com anti-VLA5. Embora tenham sido claros os bloqueios com estes anticorpos, os mesmos não foram estatisticamente significativos ($p^{\text{anti-VLA5}}=0,065$ e $p^{\text{anti-VLA6}}=0,100$) (Fig. 11).

Considerando que as proporções de timócitos $CD4^+CD8^+$ são em torno de 80% dos timócitos totais do timo, expressamos a capacidade migratória de cada subpopulação, normalizando os valores obtidos pelo cálculo do INPUT (ver seção 3.8), para observar se haveria mudança no perfil normal das células pré-tratadas com anti-ECMr que migraram. Os dados demonstraram apenas uma discreta tendência a uma menor transmigração em relação à subpopulação DP dos timócitos pré-tratados com os anticorpos anti-ECMr quando comparado ao controle tratado com Ig não-relacionada, assim como um discretíssimo aumento na subpopulação CD8, sendo estes dados não estatisticamente significativos (Fig. 12).

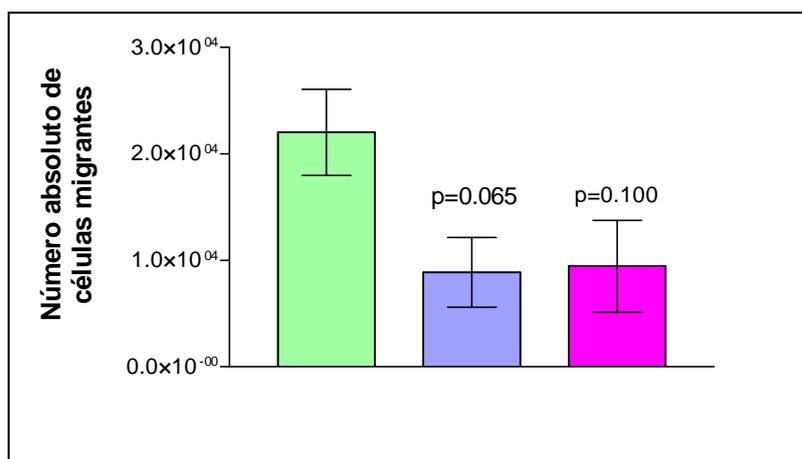


Figura 11. Transmigração de timócitos através das células endoteliais tímicas tEnd.1. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes, mostrando o número absoluto de timócitos pré-tratados com Ig (controle), ou com os anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6, que transmigraram através das células endoteliais tímicas t-END.1, no período de 10 horas. As barras representam as médias e seu correspondente desvio padrão.

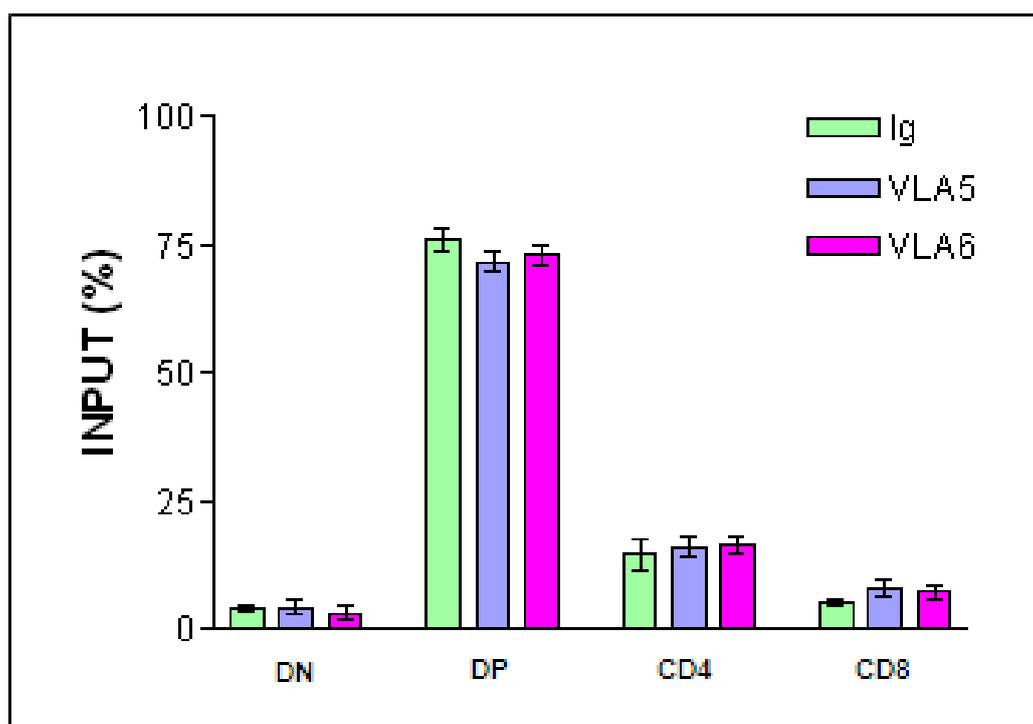


Figura 12. Perfil CD4/CD8 das subpopulações dos timócitos migrantes. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes, demonstrando o *input* de cada subpopulação de timócitos pré-tratados com Ig (barras verdes), ou com os anticorpos anti-VLA5 (barras azuis) ou anti-VLA6 (barras vinho), que transmigraram através das células endoteliais tímicas t-END.1, em relação ao número absoluto colocados para migrar. As barras representam as médias e seu correspondente desvio padrão.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Estudos anteriores mostram que os vasos sangüíneos, penetram no parênquima tímico na região próxima a junção córtico-medular onde entram os precursores de linfócitos T, e que tais vasos são constituídos principalmente de células endoteliais tímicas (van EWIJK, 1988; PETRIE, 2002). Além disso, estudos mostram que o timo é constituído de uma rede tridimensional de células do estroma que produzem e interagem com proteínas de ECM (SAVINO *et al.*, 1992). Neste sentido, esta interação compreende tanto uma adesão adequada como a comunicação entre esses elementos, sendo a interação das células com a ECM, um evento crítico para o desenvolvimento dos linfócitos intratímicos (SAVINO *et al.*, 1993; ROSSO *et al.*, 2004). Assim sendo, o papel da ECM na fisiologia e patologia do timo tem despertado cada vez mais interesse (VILLA-VERDE *et al.*, 1995; QUÍRICO *et al.*, 1995; SAVINO *et al.*, 2000; AYRES-MARTINS, 2004).

Por outro lado, um outro elemento crucial para fisiologia do timo são as células endoteliais tímicas. Estas são habilitadas em liberar sinais para o recrutamento dos linfócitos T imaturos (IMHOF *et al.*, 2000), que por sua vez depende de elementos perivasculares, incluindo revestimento perivascular epitelial em torno dos vasos sanguíneos, bem como outros “estromas” e/ou células destas regiões (PETRIE, 2002). Neste sentido, tem sido demonstrada a participação de moléculas de adesão, tais como, $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1, no endereçamento dos progenitores para o timo, sua migração dentro dele, e subsequente saída como células T maduras, mediados por adesão entre as células murais e células endoteliais (GARMY-SUSINI *et al.*, 2005).

Diante da importância concernente aos dados acima descritos, e, uma vez que há uma lacuna no que se refere ao conhecimento mais específico das células endoteliais tímicas em relação à ECM, este trabalho objetivou o estudo da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular em uma linhagem de células endoteliais obtidas a partir do timo de camundongos da linhagem C57BL/6, denominadas tEnd.1 (WILLIAMS *et al.*, 1989; AURRAND-LIONS *et al.*, 2004). Além disso, procurou-se avaliar uma possível participação dessas moléculas de ECM nas interações células tEnd.1/timócitos.

Os experimentos de imunofluorescência confocal realizados para evidenciar a expressão de ligantes de ECM nas células endoteliais tímicas tEnd.1,

de fato demonstraram a capacidade dessas células de produzir fibronectina e laminina (fig. 7). Neste contexto, experimentos anteriores já haviam demonstrado que não só as TECs (SAVINO *et al.*, 1986; LANNES *et al.*, 1991; VILLA VERDE *et al.*, 1994, 2002; SAVINO *et al.*, 2003), mas também uma outra subpopulação de células não epiteliais tímicas, as células fagocitárias do retículo tímico (PTR), também são capazes de expressar estes mesmos ligantes de ECM (AYRES-MARTINS *et al.*, 2004).

Após a observação de que as células endoteliais tEnd.1 expressavam as proteínas de ECM fibronectina e laminina, o próximo passo foi avaliar nestas células a expressão de seus respectivos receptores. Assim, utilizando a abordagem de imunocitoquímica, ficou demonstrada a expressão dos receptores VLA-5 e VLA-6 (fig.7), e de posse destes dados, objetivou-se saber qual o perfil de expressão destas moléculas. Assim, por meio de histogramas obtidos de células tEnd.1 viáveis, determinadas por citofluorimetria (Fig.8), confirmamos a expressão destes receptores, onde o VLA-5 foi expresso aproximadamente em 80% das células, enquanto o VLA-6 em 68% das mesmas. Tais receptores já tinham sido demonstrados anteriormente, não apenas em timócitos (SAWADA *et al.*, 1992; VILLA VERDE *et al.*, 1993), mas também em TECs (LANNES *et al.*, 1993; VILLA VERDE *et al.*, 1994) e em PTRs (AYRES-MARTINS *et al.*, 2004). Ainda neste contexto, Savino e col. (2000; 2002a) demonstraram que células do microambiente tímico expressam não só o receptor para laminina VLA6 e para fibronectina VLA5, mas também respectivamente, os receptores VLA3 e VLA4.

Uma vez que a linhagem de células tEnd.1 trata-se de uma linhagem de células endoteliais tímicas, pode-se supor que *in vivo* as células endoteliais tímicas estariam produzindo estes ligantes e receptores de ECM, reforçando assim, o conceito de que diferentes tipos celulares do microambiente tímico sejam co-responsáveis pela produção dessas proteínas de ECM, típicas de membrana basal.

Após a constatação da expressão de moléculas de ECM e seus receptores em células tEnd.1 e objetivando determinar uma possível participação das moléculas de ECM nas interações tEnd.1/timócitos, foram realizados ensaios funcionais de bloqueio de adesão e de transmigração de timócitos através das células endoteliais tEnd.1.

Para se observar o índice de adesão dos timócitos aderidos às células endoteliais tEnd.1, os timócitos foram pré-tratados com anticorpos anti-VLA5 e anti-VLA6, os quais apresentaram resultados que sugeriram uma inibição parcial da adesão dessas células às células tEnd.1. Tendo sido claramente observado em dois experimentos independentes, o mesmo efeito biológico (Fig 9). Estes, em ambos os experimentos apresentaram o índice de adesão (IA) bem menor nos timócitos pré-tratados quando comparado ao controle. Estes dados não sofreram tratamento estatístico por se tratar de um número muito baixo de experimentos, apesar de dados anteriores de adesão de timócitos sobre a ECM, terem sido demonstrados da mesma forma (SMANIOTTO *et al.*, 2005). Embora se faça necessário repetir os experimentos para o aumento do n, para assim serem obtidos resultados concernentes ao papel da ECM na adesão tEnd.1/timócitos comprovadamente significativos, dados anteriores com outros tipos de células do microambiente tímico, demonstraram claramente a participação dos mesmos ligantes e receptores de ECM nas interações dessas células com os timócitos. Neste sentido, utilizando alguns modelos *in vitro*, tem sido demonstrado que a adesão e a migração de timócitos sobre TEC, assim como sobre PTRs, são eventos mediados por moléculas de ECM (SAVINO *et al.*, 1993; 1996; AYRES-MARTINS *et al.*, 2004).

De acordo com Ayres-Martins e col. (2004) a adesão de timócitos a culturas de PTRs foi bloqueada de forma significativa quando as PTRs e/ou os timócitos foram tratados com anticorpos anti-fibronectina ou anti-laminina, ou com anti-VLA5 ou anti-VLA6. Dados de trabalhos anteriores mostraram que a adesão de timócitos a uma linhagem de células epiteliais tímicas de camundongos podia ser bloqueada pelo uso de anticorpos com especificidades para diferentes componentes e receptores de ECM (VILLA-VERDE *et al.*, 1994; LAGROTA CÂNDIDO *et al.*, 1996). Neste sentido, Villa-Verde e col. (1994) mostraram que a adesão de timócitos às culturas de TEC é reforçada com a presença de componentes de ECM. Além disso, tem sido demonstrada também a participação de integrinas e quimiocinas e seus receptores, no endereçamento dos progenitores para o timo, sua migração dentro dele, e subsequente saída como células T maduras (SAVINO *et al.*, 2003; SERINI & BUSSOLINO, 2004; GARMY-SUSINI *et al.*, 2005).

Uma vez que o IA dos timócitos pré-tratados com anticorpos anti-VLA5 ou anti-VLA6, e colocados para aderir sobre as células endoteliais tEnd.1 resultaram em uma inibição parcial da adesão em relação ao controle, foram realizados dois experimentos independentes em que os timócitos sofreram o mesmo tratamento, mas que após a adesão, foram liberados da co-cultura para averiguação do perfil CD4/CD8. Em relação ao número absoluto, em ambos os experimentos, semelhantemente ao ocorrido com os ensaios para verificação do IA, houve uma inibição parcial dos timócitos pré-tratados, especialmente com o anticorpo anti-VLA5 (Fig.10A), e de forma geral, essa modulação ocorreu discretamente nos timócitos de fenótipo duplo-positivo (Fig.10B), sugerindo uma participação parcial pelo menos desse receptor nas interações dos timócitos de fenótipo imaturo com as células endoteliais tímicas. Neste sentido, fazendo um paralelo, estes dados estariam de acordo com estudos anteriores, em que Dalmau e col. (1999) demonstraram que os linfócitos imaturos (DN ou DP) para os marcadores CD4 e CD8 são os que preferencialmente aderem as TEC, adesão esta dependente de ECM. Além disso, foi observada também em estudos *in vitro*, a participação da fibronectina e da laminina nas interações de timócitos de fenótipo imaturo com outro tipo celular do estroma tímico, quando da formação das rosetas PTR/timócitos (AYRES-MARTINS *et al.*, 2004).

Considerando que o processo de migração celular implica em eventos seqüenciais de adesão e de-adesão da célula migrante sobre o seu substrato, Scollay e Godfrey (1995) propuseram que a migração intratímica seguiria um padrão ordenado, enquanto Savino e col. (1996), propuseram que esta migração se daria sobre uma esteira molecular rolante a qual teria como substrato moléculas de ECM. Assim, um outro ensaio funcional desenvolvido neste trabalho foi o ensaio de migração *in vitro* em placas de "Transwell", utilizado para verificar qual a participação da ECM na transmigração de timócitos através das células endoteliais tEnd.1. Através desse ensaio foi possível observar a participação da fibronectina, pelo menos via a integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) neste evento, o que parece ocorrer também em relação à laminina via seu receptor $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6). Neste sentido, foi observado uma menor migração em números absolutos dos timócitos pré-tratados com anticorpos anti-VLA5 e anti-VLA6 quando comparados ao controle. Embora essa inibição da transmigração dos

timócitos pré-tratados com os anticorpos anti-ECMr não tenha sido estatisticamente significativa (Fig.11), parece muito provável que um aumento no número de experimentos resolveria este problema. Por outro lado, ao ser avaliado o perfil dos timócitos migrantes, de um modo geral não houve modulação significativa nas diferentes sub-populações de timócitos definidas pela expressão de CD4 e CD8 (Fig.12).

Interessantemente, foi sugerido um papel para os receptores VLA-4 e VLA-5 em humanos, onde os timócitos mais imaturos usariam VLA-4 para aderir e migrar sobre a fibronectina, enquanto estas células mais maduras aparentemente usariam VLA-4 e VLA-5 (CRISA *et al.*, 1996; DALMAU *et al.*, 1999). Segundo estes autores, as células T mais imaturas usariam o VLA-4 para aderir e migrar, enquanto as células T mais maduras passariam a expressar uma maior quantidade do receptor VLA-5 com o qual interagiria e, em colaboração com o VLA-4, adquiriria uma alta capacidade de migração. Além disso, Savino e col. (2003) demonstraram através do bloqueio *in vivo* do receptor VLA5 pela injeção intratímica do peptídeo GRGDSP (RGDS) juntamente com o fluorocromo FITC, que o número absoluto de recentes emigrantes tímicos foi significativamente menor quando comparado ao controle em relação ao baço, sugerindo que o VLA-5 exerça um papel na emigração de linfócitos do timo para o baço. Ainda neste contexto, considerando que a interação entre fibronectina e laminina e seus receptores tem uma relevância em aspectos fisiológicos do timo, poderíamos imaginar que em condições patológicas, onde houvesse modificação desta interação, poderia ocorrer uma modificação no processo de adesão e migração de timócitos. De fato, em estudos anteriores com camundongos NOD, os quais desenvolvem diabetes mellitus insulino-dependente, foi observado um defeito do receptor de fibronectina, a integrina $\alpha 5\beta 1$, no componente linfóide, com uma expressão diminuída desta molécula (COTTA-de-ALMEIDA *et al.*, 2004). Neste estudo, foi observada uma importante diminuição de expressão de VLA-5 em células $CD4^+CD25^+$, sugerindo que a retenção destas células do tipo regulatória no timo, esteja relacionada à diminuição de expressão de VLA-5. Nesse sentido, o defeito em $\alpha 5\beta 1$ nos timócitos desses camundongos talvez esteja associado a uma possível conseqüência para diabetes tipo 1 (GEUTSKENS *et al.*, 2004). Uma outra patologia em que sabidamente há alteração do padrão de ECM intratímica é

a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), onde o camundongo mdx é descrito como modelo experimental. Dados anteriores do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da FIOCRUZ/RJ e de outros laboratórios, demonstraram o envolvimento do sistema imune no desenvolvimento desta doença (MORRISON *et al.*, 2000; SPENCER *et al.*, 2001; SPENCER & TIDBAL, 2001; AYRES-MARTINS, 2004). De acordo com Ayres-Martins (2004), foi demonstrado que os timócitos de camundongos mdx apresentavam uma expressão diminuída da molécula de VLA5, assim como uma diminuição da capacidade de adesão e migração desse tipo celular nessa linhagem de camundongo, o que em teoria, poderia se pensar haver alguma relação com a patofisiologia da doença. Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que o hormônio do crescimento (GH) induziu o aumento da expressão de laminina e fibronectina, bem como de seus respectivos receptores VLA-5 e VLA-6 em culturas de TEC tratadas com o mesmo (de MELO-COELHO *et al.*, 1997; SAVINO *et al.*, 2002a), assim como *in vivo*, o aumento da expressão de laminina e de seu receptor VLA-6 no microambiente tímico (SMANIOTTO *et al.*, 2005), demonstrando assim a participação desses componentes de ECM em estados fisiológicos e patológicos.

Em conjunto, estes dados demonstram que as células endoteliais da linhagem tEnd.1 são capazes de expressar ligantes e receptores de matriz extracelular, e que as interações mediadas por estes ligantes (fibronectina e laminina) e seus respectivos receptores (VLA-5 e VLA-6), não são restritos apenas as células do estroma, mas também as células endoteliais que constituem os vasos tímicos. Além disso, estas moléculas de ECM parecem participar no padrão de migração de linfócitos no timo, uma vez que o uso de anticorpos anti-VLA5 e anti-VLA6 inibiram parcialmente a adesão/transmigração de timócitos às células endoteliais tímicas da linhagem tEnd.1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBELDA, S.M & BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J.*4:2868, 1990.

ANDERSON, G.; MOORE, N.C.; OWEN, J.T.T.; JENKINSON, E.J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 73, 1996.

ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev* 1:31, 2001.

ANJOS, A.R; SILVA, M.A; BORELLI, P. Matriz extracelular e Leucemia. Revisão. *Ver. Bras.Hematol.Hemoter.*Vol.22 nº3, 2000.

ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, P.; COSMI, L.; LAZZERI, E.; ROMAGNANI, S. Chemokines and lymphopoiesis in the thymus. *Trends Immunol.* 22: 277, 2001.

ARENAS, L. A. S; ZURBARÁN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte Barraquilla* (Col.), 16:9, 2002.

AYRES-MARTINS, S. Expressão de componentes de matriz extracelular e seus receptores em células fagocitárias do retículo tímico murino. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ, 1996.

AYRES-MARTINS, S. Expressão e papel funcional de receptores de fibronectina no timo de camundongo. 95 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ, 2004.

AYRES-MARTINS S; LANNES-VIEIRA, J; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A; BRITO, J.M; VILLA-VERDE, D.M.S ; SAVINO, W .Phagocytic cells of the thymic reticulun interact with thymocytes via extracellular matrix ligands and receptors. *Cell.Immunol.*229:21, 2004.

AURRAND-LIONS, M.; JOHNSON-LEGER, C.; PEPPER, M.S.; IMHOF, B.A. Haemangiomas are formed by cells expressing high levels of alpha beta3 integrin and lacking acetylated LDL uptake. *J Pathol.* 203(2):700, 2004.

BALERCIA, G.; ACCORDINI, C.; FRANCESCHINI, F.; BLAZSER, I.; OSCULATI, F. An ultrastructural study of normal human thymic epithelium in primary cultures. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*22:311, 1990.

BARBOSA, S.D.S. Rejeição de transplante cardíaco por células de camundongos chagásicos crônicos: envolvimento de laminina e seu receptor. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1999.

BECK, K.; HUNTER I & ENGEL J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4:148, 1990.

BENOIT, C.; MATHIAS, D. T-lymphocyte differentiation and biology. In Paul W. Fundamental immunology. 4th Edition. *Lippincott-Revan Publ.* Philadelphia, 367, 1999.

BLACKMAN, M.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248: 1335, 1990.

BORASCHI, D.; RAMBALDI, A.; SICA, A.; GHIARA, P.; COLOTTA, F.; WANG, J.M.; ZOIA, C.; REMUZZI, G.; BUSSOLINO, F. Endothelial cells Express the interleukin-1 receptor type 1. *The American Society of Hematology*, 1262, 1991.

BOSMAN, F T. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem. J.* 25: 469, 1993.

BOYD, R.L.; TUCEK, C.L.; GODFREY, D.I; IZON, D.J; WILSON, T.J; DAVIDSON, N.J; BEAN, A.G.D; LADYMAN, H.J; RITTER, M.A; HUGO, P. The thymic microenvironment. *Immunol.Today* 14:445, 1993.

BROWN, PD.; GIAVAZZI, R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann Oncol*, 6: 967, 1994.

CARNEIRO E SILVA ,F.O.; SEVERINO, R.S.; SANTOS, A.L.; DRUMMOND, S.S.; SILVA, M.; BOMBONATO, P.P.; REZENDE, R.J.; LIMA, E.M.M. Arterial supply of thymus in whithout breed cats. *Biosci J.* 17:61, 2001.

CRISA, I.; CIRULLI, V.; ELLISMAN, M.H.; ISHII, J.K.; ELICES, M.J.; AND SALOMON, D.R. Cell development: the roles of fibronectin, VLA-4 and VLA-5. *J Exp Med* 184: 215-228, 1996.

COLAGNATO, H.; YURCHENKO, P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimeres. *Dev Dyn* 218: 213, 2000.

CORDIER, A.C.; HAUMONTS, M. Development of thymus, parathyroids and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *American Journal of Anatomy*, v.157, .227, 1980.

COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BONOMO, A.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; RIEDERER, I.; de MEIS, J.; LIMA-QUARESMA, K.R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; VILLA-VERDE, D.M.; SAVINO, W. Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol* 33: 2439, 2003.

DALMAU, S.R.; FREITAS, C.S.; SAVINO, W. High expression of fibronectin receptors and L-selectin as a hallmark of early steps of thymocyte differentiation: Lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* 93: 974, 1999.

de MELO-COELHO, V.; VILLA-VERDE, D.M.S.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Pituitary hormones modulate by extracellular matrix-mediated interactions between thymocyte and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 76: 39, 1997.

de SOUSA, M.; TILNEY, N.L.; KUPIC-WEGLINSKI, J.W. Recognition of self within Self: Specific Lymphocyte Positioning and the Extracellular Matrix. *Immunol Today* 12:262, 1991.

DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venom: Evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 2471-2475, 1997.

de WIT, T.R.; de LEEUW, H.P.J.C.; RONDAIJ, M.G.; de LAAF, R.T.M.; SELLINK, E.; BRINKMAN, H.J.; VOOBERG, J.; van MOURIK, J.A. Von Willbrand factor

targets IL-8 to Weibel-Palade bodies in an endothelial cell line. *Experimental Cell Research*, 286: 67, 2003.

DIAMOND, M.S.; SPRINGER, T.A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biology* 4:506, 1994.

DIDIO, J.A. Sistema endocrino. In:-----, Tratado de anatomia sistêmica aplicada. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, V.2, 583, 2002.

DRUMMOND, S.S. Aspectos morfométricos e vascularização arterial em timo. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1996.

ENGVALL, E.; BOYLE, E.M. Injúria da célula endotelial na cirurgia cardiovascular. *An Thorac Surg* 62:915, 1996.

EZINE, S. The thymus; colonization and ontogeny. *Bull Inst, Pasteur*, 87:171, 1989.

FAUSTO, C.S.; CHAMMAS, M.C.; SAITO, O.C.; GARCIA, M.R.; JULIANO, A.G.; SIMÕES, C.A.; CERRI, G.G. Timo: caracterização ultra sonográfica. *Radiol Bras* 37(3):207, 2004.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, p. 373-,1980.

GARMY-SUSINI, B.; JIN, H.; ZHU, Y.; SUNG, R.J.; HWANG, R.; VARNER, J. Integrin $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin. Invest.* 115:1542, 2005.

GEUTSKENS, S.B.; MENDES-DA-CRUZ D.A.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Fibronectin receptor defects in NOD mouse leucocytes: possible consequences for type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 60: 30, 2004.

GILL, J.; MALIN, M.; SUTHERLAND, J.; GRAY, D.; HOLLANDER, G.; BOYD, R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev.*, 195:28, 2003.

HARE, K.J.; JENKINSON, E.J.; ANDERSON, G. CD69 expression discriminates MHC-dependent and independent stages of thymocyte positive selection. *J Immunol* 162: 3978, 1999.

HAY, E. Cell biology of extracellular matrix. 2nd edition. *Plenum Press*, 1991.

HE, H.; NAQUET, P.; CAILLOL, D.; PIERRES, M. Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a CA +2-independent mechanism. *J. Exp.Med.*173:515, 1991.

HENG, T.S.P.; GOLDBERG, G.L.; GRAY, D.H.D.; SUTHERLAND, J.S.; CHIDGEY, A.P.; BOYD, R.L. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J of immunol*, 2005.

HENRY, L. Involution of the human thymus. *J Pathol bacterial*, 93: 661, 1967.

HORTA, M.C.R.; AGUIAR, M.C.F. Immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. *Journal Pathology and medicine*.36: 88, 2006.

HYNES, R. O. Fibronectins. *Sci. Am.* 254:32, 1986.

IMHOF, B.A.; DUNON, D.; COURTOIS, D.; LUHTALA, M.; VAINIO, O. Intestinal CD8 alpha alpha and CD8 alpha beta intraepithelial lymphocytes are thymus derived and exhibit subtle differences in TCR beta repertoires. *J Immunol*,165: 6716-6722, 2000.

JANEWAY. C.A. O Timo e o Desenvolvimento de Linfócitos T IN. *Imunobiologia – o sistema imunológico na saúde e na doença*. 4ed. Artmed, Porto Alegre.227, 2000.

KABIR-SALMANI, M.; SHIOKAWA, S.; AKIMOTO, Y.; SAKAI, K.; IWASHITA, M. The role of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin in the IGF – I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation. *Mol.Human Reprod.* 10:91, 2004.

KIM, C.H.; OELUS, L.M.; WHITE, J.R.; BROXMEIER, H.E. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* 19:4434, 1998.

KRAAL, G.; MEBIUS, R.E. High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv Immunol*, 65: 347, 1997.

KLUTESA, S.; SILER, U.; SPEISER, A.; WESSELS, J.T.; VIRTANEN, I.; ROUSSELLE, P.; SOROKIN, L.M.; MULLER, C.A.; KLEIN, G. Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. *Immunology* 105: 407, 2002.

LAGROTA CÂNDIDO, J.M; VANDERLEI, Jr F.H; VILLA VERDE D M S & SAVINO W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. V. Effects of interferon-gama upon thymocyte/thymic epithelial cell interactions mediated by extracellular matrix ligands and receptors. *Cell. Immunol*, 1996.

LANNES-VIEIRA, J.; VAN DER MEIDE, P.H.; SAVINO, W. Extracellular Matrix Components of the Mouse Thymic Microenvironment. *Cell. Immunol.* 137:329, 1991.

LANNES-VIEIRA, J.; CHAMMAS, R.; VILLA-VERDE, D.M.S.; VANNIER DOS SANTOS M.A.; MELLO-COELHO, V.; SOUZA, S.J.; BRETANI, R.R.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment .III. Thymic epithelial cells express the VLA-6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int. Immunol.* 5: 1421, 1993.

LE, P.T.; LAZORICK, S.; WHICHARD, L.P.; HAYNES, B.F.; SINGER, K.H. Regulation of cytokine production in the human thymus: Epidermal growth factor and transforming growth factor- β regulate mRNA levels of interleukin 1 α (IL-1 α), IL-1 β , and IL-6 in human thymic epithelial cells at a post-transcriptional level. *J. Exp. Med.* 174: 1147, 1991.

LIMA, F.A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema immune. *Pediatria* 29: 33, 2007.

LIND, E.F.; PROCKOP, S.E.; PORRITT, H.E.; PETRIE, H.T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *Journal Experience Medicine*, v.194, p.127, 2001.

MEIRELLES DE SOUZA, L.R.; TRAJANO, V.; SAVINO, W. Is there an inter-specific diversity of the thymic microenvironment. *Developmental Immunology*, 3: 123, 1993.

MEREDITH, J. E., Jr.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M. A. The Extracellular Matrix As A Cell Survival Factor. *Molecular Biology Of The Cell*, 4:953, 1993.

MICHEL, C.C. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *J Mol Cell Cardiol* 30: 748-749, 1998.

MINER, J.H.; PATTON, B.L.; LENTZ, S.I. The laminin alpha chain : Expression, developmental transition and chromosomal localization of alpha 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11 and cloning of a novel 23 isodorm. *J Cell Biol*, 137:685, 1997

MOHAMMAD, S F.; BOS, W. J W. Physiology of the vessel blood interface. In: Bunt, T.J. (ed) – Ischemic vascular injury. A discourse on surgical technique. New York, *Futura Publishing*, 1-14, 1990.

MOORE, K. Anatomia orientada para a clinica –Ed.Guanabara koogan.Rio de Janeiro, 2001.

MORI, K.; ITOI, M.; TSUKAMOTO, N.; KUBO, H.; AMAGAI, T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and thymic parenchyma. *Int Immunol* , 19: 745, 2007.

MORRISON, J.; LU, Q.L; PASTORET, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest* 80: 881, 2000.

NABARRA, B.; ANDRIANARISON, I. Thymic reticulum of mice. III. The connective compartment innervation, vascularisation, fibrous tissues and myoid cells. *Tissue & Cell*, 27:249, 1995.

PAKIANATHAN, D.R. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leukoc Biol.*, 57: 699, 1995.

PARISE, E.R.; PARISI, F.H.; LEITE-MÓR, M.M.B.; NOGUEIRA, M.D. Valor prognóstico da fibronectina plasmática e da classificação de child-pugh na cirrose hepática alcoólica. Estudo comparativo. *Ver Assoc Med Brás*, 50(1):37-40, 2004.

PETRIE, H.T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol.Rev.*189:8, 2002.

PICKER, L.J.; SIEGELMAN, M.H. Lymphoid tissues and organs. In: PAUL, W.E. Fundamental immunology. 3 ed.: *Raven Press*, 1993.

QUÍRICO-SANTOS, T.; RIBEIRO, M.M.; SAVINO, W. Increased deposition of extracellular matrix components in the thymus gland of MDX mouse: correlation with the muscular lesion. *J Neuroimmunol* 59:9, 1995.

RAMOS, K.M. Caracterização e células epiteliais tímicas in vitro e suas interações com os timócitos. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2000.

ROSSO, F.; GIORDANO, A.; BARBARISI, M.; BARBARISI, A. From Cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199:174, 2004.

SAVINO, W. The elastic system in the thymus of the opossum *Didelphis marsupialis aurita*. *Anat Anz.* 151(10): 70-7, 1982.

SAVINO, W.; DARDENNE, M.; BACH, J.F. Thymic hormone containing cells. II. Evolution of cells containing the serum thymic factor (FTC or thymulin) in normal and autoimmune mice, as revealed by anti-FTS monoclonal antibodies. Relationship with Ia-bearing cells. *Clin. Exp. Immunol.* 52:1, 1983.

SAVINO, W.; ITOH, T.; IMHOF, B.A.; DARDENNE, M. Immunohistochemical studies on the phenotype of murine and human thymic stromal cell lines. *Thymus* 8: 245, 1986.

SAVINO, W.; LANNES VIEIRA, J.; VILLA-VERDE, D.M.S. Thymic Extracellular Matrix: Ligands, Receptors and Functions. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci* 44:257, 1992.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M. S.; LANNES-VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T cell migration and differentiation? *Immunol.Today* 14:561, 1993.

SAVINO, W.; LANNES-VIEIRA, J.; VILLA-VERDE D.M.S. Thymic extracellular matrix: ligands, receptors and functions. *Ciência e Cultura* 4: 257, 1994.

SAVINO, W.; DARDENNE, M.; CARNAUD, C. Conveyor belt model for intrathymic cell migration. *Immunol. Today* 7:97, 1996.

SAVINO, W.; DALMAU, S.R.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. Role of extracellular matrix mediated interactions in the thymus. *Dev Immunol* 7: 279, 2000.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Rev*, 21: 412, 2000.

SAVINO, W.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; SILVA, J.S.; DARDENNE, M.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. Intrathymic T cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* 23: 305, 2002.

SAVINO, W.; POSTEL-VINAY, M.C.; SMANIOTTO, S.; DARDENNE, M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 55: 442, 2002a.

SAVINO, W.; AYRES MARTINS, S.; NEVES-DOS-SANTOS, S.; SMANIOTTO, S.; O CAMPO, J.S.P.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; TERRA-GRANADO, E.; KUMESNOK, O.; VILLA-VERDE, D.M.S. Thymocyte migration: na affair of multiple cellular interactions? Mechanisms governing thymocyte migration. *Braz.J Med.Biol.Res.*36:1015, 2003.

SAVINO, W.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; SMANIOTTO, S. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *Journal of leukocyte Biology*. 75:951, 2004.

SAWADA, M.; NAGAMINE, J.; TAKEDA, K.; UTSUMI, K.; KOSUGI, A.; TATSUMI, Y.; HAMAOKA, T.; MIYADE, K.; NAKAJIMA, J.; WATANBE, T.; SAKAKIBARA, S.; FUJIWARA, H. Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymic stromal cells. *J. Immunol.* 149:3517, 1992.

SCOLLAY, R.; GODFREY, D.L. Thymic emigration: conveyor belt or lucky dips. *Immunol. Today* 16:268, 1995.

SERINI, G.; BUSSOLINO, F. Common cues in vascular and axon guidance. *Physiology*, 19: 348, 2004.

SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. The cardiovascular system. In: Weiss, L. Cell and tissue biology. A textbook of histology. 6. ed., Baltimore, Urban & Schwarzenberg, p. 354, 1988.

SMANIOTTO, S.; de MELO-COELHO, V.; VILLA-VERDE, D.M.S.; PLÉAU, J.M.; POSTEL-VINAY, M.C.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology* 146: 3005, 2005.

SOBOTTA, J. Atlas de Anatomia Humana. 21ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

SONNENBERG, A. Integrins and their ligands. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 184: 7, 1993.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord* 11: 556, 2001.

SPENCER, M.J; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K.; TIDBALL, J.G. Helper (CD4+) and cytotoxic (CD8+) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 98: 235, 2001.

SUNDQVIST, K.G.; PEDARI, L.; HAUZENBERGER, D. Anchorage and lymphocyte function: extracellular matrix substrata control morphogenesis and interleukin production but have minor effects on DNA synthesis. *Scand. J. Immunol.* 37: 295, 1993.

TINELI, R. A.; VIARO, F.; DALIO, M. B.; REIS, G. S.; BASSETO, S.; VICENTE, W. V. A.; RODRIGUES, A.J; EVORA, P.R.B . Mechanical forces and human saphenous veins: coronary artery bypass graft implications. *Braz J Cardiovasc Surg.*22(1): 87, 2007.

TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P.G. Laminin – a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254:9933, 1979.

RABINOVICH, G.A. Interaccion entre proteínas y glicanos en la regulacion fisiologica de las células T. *Medicina* (Buenos Aires), 66: 357, 2006.

UTISUMI, K.; SAWADA, M.; ,NARUMIYA, S.; NAGAMINE, J.; SAKATA, T.; IWAGAMI, S.; KITA, Y.; TERAOKA, H.; HIRANO, H.; OGATA, M.; HAMAOKA, T.; FUJIWARA, H. Adhesion of immature thymocytes to stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5685,1991.

Van EWIJK, W. Cell surface topography of thymic micro-environments. *Lab Invest*, 59: 579, 1988.

Van EWIJK, W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 591, 1991.

Van EWIJK, W.; WANG, B.; HOLLANDER, G.; JAWAMOTO, H.; SPANOPOULOU, E.; ITOI, M.; AMAGAI, T.; JIANG, Y.F.; GERMERAAD, W.T.;

CHEN, W.F.; KATSURA, Y. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *semin Immunol* 11:57, 1999.

VERRIER, E.D.P.; EDWARD, D.V.; BOYLE, E. M. Injúria da célula endotelial na cirurgia cardiovascular. *An Thorac Surg* 62, 915, 1996.

VILLA-VERDE, D.M.; de MELO-COELHO, V.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 133: 867, 1993.

VILLA-VERDE, D.M.; LAGROTA-CÂNDIDO, J.M.; VANNIER-SANTOS, M.A.; CHAMMAS, R.; BRENTANI, R. R.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. IV. Modulation of thymic nurse cells by extracellular matrix ligands and receptors. *Eur. J Immunol.* 24:659, 1994.

VILLA-VERDE, D.M.; MELLO-COELHO, V.; LAGROTA-CANDIDO, J.M.; SAVINO, W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 907-912, 1995.

VILLA-VERDE, D.M.S.; SILVA-MONTEIRO, E.; JACIULIONIS, M.G.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; BRENTANI, R.R.; SAVINO, W.; CHAMMAS, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.* 32: 1434, 2002.

YURCHEN, C.O.; YAMADA, P.D.; O "REAR, J.J. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 6:674, 1994.

YOUNG, A. J. The physiology of lymphocyte migration through the single lymphnode in vivo. *Semin immunol* 11:73, 1999.

YURCHENCO, P.D. & SCHITTNY, J. Molecular Architecture Of Basement Membranes. *FASEB J* 4: 1577, 1990

WEATER, P.R.; BURKITT, H.G.; YOUNG, B.; HEATH J.W. Wheater Histologia Funcional. 1ª edição, Guanabara-Koogan pag.201, 1994.

WERNECK, C.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J.; SILVA, L.C.F.; VILLA-VERDE, D.M.S.; SAVINO, W. & MOURÃO. Thymic epithelial cells synthesize a heparan sulfate with a highly sulfated region. *J Cell Physiology* 178:51, 1999.

WESTERMANN, J., ENGELHARDT, B., HOFFMANN, J.C. Migration of cell in vivo: Molecular Mechanisms and clinical implications. *Ann Intern Med* 135; 279-295, 2001

WILLIAMS, R.L.; COUTNEIDGE, S.A.; WAGNER, E.F. Embryonic lethality and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell*, 52(1): 121-131, 1988.

WILLIAMS, R.L.; RISAU, W.; ZERWES, H.G.; DREXLER, H.; AGUZZI, A.; WAGNER, E.F. Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* 57: 1053-63, 1989.