



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

EFEITOS DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS TÍMICAS

Dissertação de Mestrado

Fernando Wagner da Silva Ramos

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

EFEITOS DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS TÍMICAS

Fernando Wagner da Silva Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas,
como pré-requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Salete Smaniotto

Maceió-AL
Março de 2008

R175

RAMOS, Fernando Wagner da Silva

Efeitos do hormônio de crescimento sobre as células endoteliais tímicas.
[manuscrito] / Fernando Wagner da Silva. - 2008.

68f.

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

Orientação: Prof^a Dra. Salete Smaniotto

1. Hormônio do crescimento 2. Timo I. Título II. Autor

CDU 612.438

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunohistologia do ICBS/UFAL e no Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo – FIOCRUZ/RJ. Durante o trabalho contamos com o apoio financeiro dos órgãos: UFAL/CAPES, CNPq e FIOCRUZ.

*“Aqueles que passam por nós, não
vão sós, não nos deixam sós. Deixam
um pouco de si, levam um pouco de
nós”.*

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, em primeiro lugar, a minha digníssima mãe Maria Rosário da Silva, por ser uma excelente pessoa, mulher e mãe. Sem perceber, ensinou-me a ser tudo o que sou. Uma mãe implacável, uma profissional responsável e competente. Todas as minhas conquistas eu devo aos seus esforços, sacrifícios e lágrimas derramadas na ausência do meu saudoso pai. Amo-te muito, mamãe. Você merece tudo de bom nessa vida.

Dedico, ainda, ao meu eterno pai Dario Ramos Barbosa, que partiu tão cedo, há 19 anos, não me dando oportunidade de conhecê-lo da forma como as pessoas o conheceram. Por ser um exemplo de homem íntegro, inteligente, excelente professor, médico, cirurgião-dentista e capitão do exército, não sei como conseguia fazer tudo tão bem feito e ainda ter tempo de ter 23 filhos. Pai, é na mesma Universidade que um dia você foi diretor de Centro (CCBI), chefe de departamento e professor titular de anatomia que, hoje, eu tento me tornar um mestre em ciências da saúde. Quando tinha 8 anos, tu partistes, mas tive oportunidade de presenciar algumas de tuas aulas, sem nada entender, no mesmo local onde hoje eu defendo a minha dissertação. Talvez seja por isso que eu tenha tanta afinidade pela arte da docência.

Essa vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de ser amado a cada dia de minha vida, mesmo com todos os meus pecados, pois Ele sempre esteve ao meu lado, seja nas horas boas, seja nos momentos de apreensão e dificuldades, e por ter me dito, através da palavra: “Tudo o que pedirdes com fé na oração, vós o alcançareis” (Mt 18, 22).

A Universidade Federal de Alagoas - UFAL, por estar possibilitando essa oportunidade de me aperfeiçoar através dos ensinamentos que obtive ao longo desses dois anos, e ao ICBS, representado pela Professora Dr^a Theresinha Carvalho Calado, em nome da qual cumprimento a todos os professores que fizeram parte das disciplinas e seminários do mestrado, em especial ao professor Célio Rodrigues que coordenou o mestrado com muita serenidade e pacificidade, o que foi continuado pela professora Eliana Maria, posteriormente, e a todos os membros da banca, pois suas observações contribuirão para a melhoria do presente trabalho.

À professora Dr^a Salete Smaniotto, por tornar o nosso projeto uma realidade. Sem ela, nada disso estaria acontecendo. Responsabilidade, compromisso, garra e objetividade, fazem dela uma profissional em destaque. Peço desculpas por eventuais falhas, o importante é que tentei. Salete, você soube ser a dose certa em cada momento dessa fase de conquistas. Quero que você permita cada vez mais que Deus faça parte da sua vida, pois você merece tudo de bom.

A minha esposa Elísia Almeida, por estar comigo há mais de 8 anos, dividindo comigo as alegrias, mas também as angústias. Obrigado por entender os meus momentos de estresse nessa reta final do mestrado. Ainda iremos compartilhar ótimos momentos juntos.

Aos meus irmãos: Carlos Alberto, que com toda a sua tranquilidade, paciência e responsabilidade é um grande exemplo de ser humano; Dario Ramos, que sempre procura ser perfeccionista no seu trabalho, com muita dedicação e força de vontade, por ser um grande irmão; a minha irmã-mãe Carmen Vânia, que ao longo desses últimos 7 anos passou por diversos obstáculos, mostrando ter muita garra para enfrentar todas as situações difíceis da vida, sempre com muita fé e amor, representando para mim um grande exemplo de vida; a minha irmã Daria Rose, que ao partir de forma tão repentina, já pediu a Deus que presenteasse minha mãe com o meu nascimento. Amo cada um de vocês de coração!

A minha vovó Áurea Nogueira, ser humano fantástico, que antes de partir, mostrou-me a importância de ler a bíblia sagrada e por ser uma pessoa humilde e amável. Aos meus tios: Helena Macedo (minha tão amada tia Nena) - queria ter mais tempo para ficar do seu lado, mas a correria é grande. Nunca esquecerei que você é a minha tia coruja. Você foi muito importante para a minha formação; Guido, Mil, Claudinho, Painho, Bibi, Lulinha e familiares.

Aos meus sobrinhos queridos, cada um com suas virtudes: Darlan, Juninho, Esthefany, Darinho, Julinha, Dudu e Matheus. Vocês são frutos de pessoas muito queridas por mim. Aos meus cunhados, meu sogro José Machado e minha sogra Maria Célia.

A todos os professores da pós-graduação; à Delma, que é a alegria do Laboratório de histologia e ao Adalberto, garoto que vai longe com o estudo dos tímócitos. Vocês já fazem parte da história desse Centro.

Aos pioneiros da turma do mestrado, por terem iniciado essa parte da história, vivendo diferentes experiências na busca do conhecimento: André, Wendell, Alane, Ana Rachel, Anderson, Paulo, Timbó, Iede, Socorro Alécio e, em especial, a minha

amiga Andréa Aragão, por viver muitos sofrimentos juntos, mas também compartilhar muitas alegrias, que podem até formar um livro, viu?

Ao Dr. Wilson Savino e sua equipe, por nos oferecer todas as condições dentro do Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo na FIOCRUZ, RJ. Ao Désio, Bernardo e companheiros pesquisadores que conheci na Casa Amarela (FIOCRUZ).

Ao CESMAC, pela oportunidade de fazer parte dessa conceituada instituição como estudante, pós-graduado e como professor. Aos meus amigos da coordenação de biomedicina: Alex, meu irmãozinho camarada, e Jacinto, com o qual aprendi a dividir os mesmos objetivos no sentido de promover avanços em nossa área e a todas as coordenações de curso. Aos demais professores do CESMAC, sobretudo aos meus amigos-irmãos Luiz Arthur, Chiara Rachel, Daniel, Leka, Léo e Nilmara. Aos meus alunos, por torcerem por mais uma vitória. Obrigado pela troca de conhecimentos em sala de aula.

Ao Magnífico Reitor da UNCISAL, Prof. Dr. André Falcão, por reconhecer a importância do meu mestrado e a todos que fazem parte da Maternidade Escola Santa Mônica e do LACEN, pela torcida em prol do êxito nessa conquista.

A Vaneska da Graça, que passou muitas noites sem dormir, ajudando-me a traduzir e entender melhor os artigos utilizados nesse trabalho. Obrigado pela disposição e pela amizade, agora é sua vez de concluir o seu doutorado. Good Luck!

À Professora Dr^a Silvana Ayres, que acompanhou cada passo dessa vitória, seja em Maceió, seja no Rio de Janeiro. Suas dicas foram muito importantes para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos que não citei, que não são poucos, pois o apoio de vocês foi essencial e, como afirma Antoine de Saint-Exupéry, “O essencial é invisível aos olhos”. Os meus sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1. Introdução	1
1.1 Histórico sobre o timo.....	1
1.2 O timo.....	4
1.3 O microambiente tímico e a diferenciação intratímica.....	7
1.4 Migração intratímica de células T	11
1.5 Célula endotelial.....	14
1.6 Interações imunoneuroendócrinas	19
1.7 O Hormônio de Crescimento e o sistema imune	20
1.8 A atuação do Hormônio de Crescimento nas células endoteliais	25
2. Objetivos	27
3. Material e método	28
3.1 Animais	28
3.2 Reagentes	28
3.3 Anticorpos.....	28
3.4 Tratamentos utilizados nos ensaios.....	29
3.5 Cultura de células endoteliais tímicas.....	29
3.6 Ensaio de proliferação de células endoteliais tímicas	30
3.7 Ensaio de imunocitoquímica.....	30
3.8 Ensaio de adesão timócito/tEnd.1.....	30
3.9 Ensaio de migração ransendotelial.....	31

3.10 Análise por citofluorimetria.....	32
3.11 Análise estatística.....	33
4. Resultados	34
4.1 Efeitos do GH na proliferação e morfologia das células endoteliais tímicas.....	34
4.2 Efeitos do GH sobre a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular por células endoteliais tímicas.....	37
4.3 Adesão de timócitos às tEnd.1 previamente tratadas com GH.....	41
4.4 Efeitos do GH na migração transendotelial.....	44
5. Discussão e conclusão	46
6. Referências	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina sérica bovina
CAM	Molécula de adesão celular
CD	Marcadores de superfície que designa linhagens ou estados de diferenciação celular
DN	Duplo negativo ($CD4^-CD8^-$)
DP	Duplo positivo ($CD4^+CD8^+$)
ECAM	Molécula de adesão celular
ECM	Matriz extracelular
ECMr	Receptor de matriz extracelular
EDTA	Ácido etildiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GH	Hormônio do crescimento
GHr	Receptor do hormônio do crescimento
HLA	Antígeno leucocitário humano
IA	Índice de adesão
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
JCM	Junção córtico-medular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células “natural killer”
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
SFB	Soro fetal bovino

SP	Simples positivo (CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺)
TCR	Receptor de célula T
TEC	Células epiteliais tímicas
tEnd.1	Linhagem de células endoteliais tímicas
Tg-GH	Transgênicos para o gene do GH bovino
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
VLA	Antígeno de aparecimento tardio

RESUMO

Uma série de evidências mostra que o hormônio do crescimento (GH) modula várias funções intratímicas, incluindo a migração de timócitos induzida por ligantes e receptores de matriz extracelular (ECM). A migração celular é indispensável para a diferenciação de células T, que, ao terminar sua maturação no timo, entram na circulação sanguínea e são endereçados para os órgãos linfóides secundários. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do GH nos processos de entrada e saída de células no timo, que envolvem, entre outras, interações célula-célula e célula-ECM. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do GH sobre as células endoteliais tímicas e a sua relação com os timócitos. Para o estudo, foi utilizada a linhagem tEnd.1 de células endoteliais derivadas de timo murino. Através de ensaios de proliferação, verificou-se que o GH aumentou significativamente o número de células endoteliais tímicas tratadas por 8 ou 24 horas na concentração de 20 ng/mL. Além disso, as células tratadas com GH apresentaram-se vacuoladas e ramificações citoplasmáticas foram evidenciadas. Analisou-se, por imunocitoquímica, a presença de ligantes de ECM em tEnd.1, onde se evidenciou um aumento na produção de laminina e fibronectina quando as tEnd.1 foram tratadas com GH, e por citofluorimetria, observou-se que o GH modulou positivamente a expressão dos receptores para a fibronectina, VLA-4 e VLA-5, nas tEnd.1. Além disso, o GH aumentou a adesão dos timócitos em tEnd.1, e os timócitos aderidos apresentaram fenótipo CD4/CD8 similar quando comparados ao controle. Demonstrou-se, ainda, que a migração transendotelial de timócitos em câmaras de *transwell* foi menor quando as tEnd.1 foram tratadas com GH e, através da citofluorimetria, verificou-se que esta diminuição ocorreu principalmente nas células duplo-positivas (DP). Em conclusão, o GH foi capaz de atuar na proliferação das células endoteliais e na expressão de ligantes e receptores de ECM por estas células. Ainda, o GH modulou positivamente a adesão tEnd.1/timócitos e negativamente a migração transendotelial. Nossos dados fortalecem a hipótese de que o GH desempenha papel relevante na fisiologia do timo e pode atuar em processos de migração transendotelial de timócitos.

Palavras-chaves: Hormônio de crescimento, Timo

ABSTRACT

Previous evidence shows that growth hormone (GH) modulates various intrathymic functions, including thymocyte migration induced by extracellular matrix (ECM) ligands and receptors. Cell migration is an essential event for intrathymic T-cell differentiation which when finished their maturation in the thymus, enter the bloodstream and are addressed to secondary lymphoid organs. However, little is known about the influence of GH in the processes of entry and exit of cells in the thymus, which involve, among others, cell-cell and cell-ECM interactions. The aim of the present study was to evaluate the effects of GH on the thymic endothelial cells and its relation with the thymocytes. For the study, we used the murine thymic endothelioma cell line tEnd.1. Through assays of proliferation, it was verified that GH significantly increased the number of thymic endothelial cells treated for 8 or 24 hours in the concentration of 20 ng/mL. Furthermore, the cells treated with GH presented more vacuoles and more evident cytoplasmic ramifications. We examined by immunocytochemistry, the presence of ECM ligands in tEnd.1, showing an increase in the production of laminin and fibronectin, and by cytofluorometry, a revealed an increase in the expression of fibronectin receptors VLA-4 and VLA-5 in the tEnd.1 treated with GH. Accordingly, thymocyte adhesion to GH-treated tEnd.1 cells was increased, as compared to controls, and such an increase was seen regardless of the stage of thymocyte differentiation. Lastly, we showed that transendothelial migration of thymocytes in transwell chambers was lower when tEnd.1 cells were treated with GH and that this decline occurred mainly in CD4⁺CD8⁺ cells. In conclusion, the GH enhanced proliferation of endothelial cells and expression of ECM ligands and receptors by these cells. GH positively modulated adhesion tEnd.1/ thymocytes and negatively the transendothelial migration. These results support the notion that GH plays an important role in physiology of the thymus, comprising the key step of transendothelial thymocyte migration.

Key-words: Growth hormone, Thymus.

1 INTRODUÇÃO

No curso da diferenciação dos linfócitos T, células progenitoras provenientes da medula óssea chegam ao timo através dos vasos sanguíneos localizados na medula e na junção córtico-medular (JCM), interagindo com o microambiente passando pelos processos centrais de seleção intratímica. Os linfócitos T assim gerados, que sofreram seleção positiva, emigram do órgão, através dos vasos localizados na JCM, indo povoar as áreas timo-dependentes dos órgãos linfóides periféricos (LIND *et al.*, 2001; MORI *et al.*, 2007). Durante este processo de diferenciação, os timócitos parecem migrar de forma ordenada da região cortical para a região medular do timo (SCOLLAY & GODFREY, 1995), sendo que este tráfego celular depende diretamente da expressão de moléculas de adesão e de adesão, incluindo ligantes e receptores de matriz extracelular (ECM), orientados por substâncias quimiotáticas (PATEL & HAYNES, 1993; KIM *et al.*, 1998; SAVINO *et al.*, 1993; 2000). Além dos estímulos mediados por estas moléculas, a regulação dos eventos de migração pode ser influenciada por outros estímulos, tais como: citocinas, agentes infecciosos e hormônios (SAVINO & DARDENNE, 2000).

1.1 Histórico sobre o timo

Por séculos, o timo permaneceu como um órgão enigmático com funções desconhecidas, sendo o último dos grandes órgãos do corpo a ter as funções reveladas. A origem da palavra timo [*thymus*, em latim e em inglês] parece incerta: alguns alegam que é proveniente do latim, pela semelhança existente entre o órgão com a folha da planta *Thymus vulgaris*, outros acreditam que deriva do grego antigo, sendo traduzida como alma, coração, coragem, mente, vontade ou propósito (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Até as primeiras décadas do século 20, o fato do timo na infância ter uma grande massa de tecido não foi observado, já que, naquela época, as autopsias feitas em crianças mortas por doenças fatais, tais como a difteria, geralmente, apresentavam o timo encolhido devido ao estresse ocorrido durante a doença e, assim, o pequeno tamanho do órgão era tido como normal. Após o surgimento de mortes infantis decorrentes de cirurgias, devido à anestesia, tal fatalidade era atribuída ao timo grande, que se pensava interferir na respiração, condição então conhecida por *status thymolympathicus*. Desde então, alguns médicos passaram a recomendar a irradiação para diminuir o tamanho do timo, desconhecendo-se que alguns dos pacientes poderiam vir a desenvolver adenocarcinoma da glândula tireóide (MILLER, 2002).

Desde que os imunologistas começaram a elucidar a origem e a função dos linfócitos periféricos em doenças, o papel do timo tornou-se claro e, pela década de 50, o reconhecimento do timo como local de produção de linfócitos tinha sido bem estabelecido. Sua competência imunológica foi inequivocamente demonstrada por Billingham *et al.*, 1956 e Gowans *et al.*, 1961.

Ao nascer, o timo pesa cerca de 15 a 20g, e alcança o maior tamanho em relação ao peso corpóreo nos primeiros meses de vida, quando podem ser observados timos enormes com formas pseudotumorais, fato que pode ser percebido nas radiografias de tórax de lactentes. A partir da puberdade, inicia-se o processo de involução tímica, que continua ao longo da vida. Esse processo começa no córtex e está associado à sensibilidade dos timócitos corticais à ação de diversos fatores, dentre eles: os corticóides, caracteristicamente expressos na fase adulta do indivíduo. A região cortical pode desaparecer completamente, enquanto os remanescentes medulares persistem, e é possível que a diferenciação de células T

no timo continue durante toda a vida do indivíduo adulto, ainda que em taxas muito reduzidas (MILLER, 1992).

Mesmo conhecendo o papel do timo como um órgão produtor de linfócitos, os imunologistas não acreditavam que este tivesse alguma função imunológica, pois as principais características de resposta imune, como a plasmocitopoese e a formação de centros germinativos, não eram observadas no timo de animais normais após a imunização. Além disso, os linfócitos do timo, ao contrário das células de outros tecidos linfóides, não eram capazes de iniciar ou transferir uma resposta imune ao antígeno em receptores apropriados; e os animais timectomizados na vida adulta produziam resposta celular e humoral tão eficientemente quanto os animais jovens (MILLER, 1961; RIBATTI *et al.*, 2006).

Detalhes relacionados à embriologia, anatomia, fisiologia, patologia e significado clínico do timo persistiram até 1961, quando Miller demonstrou pela primeira vez o papel fundamental do timo para o estabelecimento e desenvolvimento do sistema imune normal. Para isso utilizou experimentos com camundongos timectomizados imediatamente após o nascimento. Como resultado da timectomia neonatal os animais apresentavam tecido linfóide pouco desenvolvido, resposta imune prejudicada e maior susceptibilidade às infecções recorrentes (RIBATTI *et al.*, 2006; LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007), características adquiridas devido ao enfraquecimento da reação de hipersensibilidade imediata e retardada, uma vez que a produção de anticorpos requer a colaboração das células T (BANKS, 1991). Alguns dos mais recentes avanços nas diversas áreas da biologia do timo incluem a organogênese do timo, a regulação transcricional que induz à escolha/decisão 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 O timo

O timo é um órgão linfóide primário, no qual ocorre diferenciação e maturação de células denominadas pré-T provenientes da medula óssea (SAVINO & DARDENNE, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001), que está situado no tórax, no mediastino superior, em frente à traquéia, anteriormente aos grandes vasos que emergem do coração e consiste em dois lobos que surgem no embrião como primórdios separados de cada lado da linha média, e que mais tarde se tornam intimamente ligados por tecido conjuntivo (FAUSTO *et al.*, 2004).

Embriologicamente é uma glândula par, porém, as faces mediais das suas estruturas direita e esquerda estão em contato íntimo, semelhante a um órgão ímpar lobulado. Suas partes são denominadas lobos direito e esquerdo, constituídos por lóbulos parciais ou totalmente envolvidos por cápsulas finas de tecido conjuntivo (DIDIO, 2002). Para o desenvolvimento desse órgão são necessárias a migração e proliferação das células da crista neural para o interior da região faríngea. Elas interagem por contato ou através de secreções moleculares, com o epitélio do endoderma faríngeo, induzindo proliferação, migração e diferenciação da massa epitelial (GORDON *et al.*, 2004).

Ainda em camundongos, na fase fetal, a colonização tímica se dá por precursores hematopoéticos que migram em ondas para o timo. Durante esse processo de colonização, os precursores oriundos do fígado fetal e, posteriormente, da medula óssea, deixam os vasos faríngeos adjacentes, atravessando o parênquima peritímico e a membrana basal que envolve o rudimento tímico (IMHOF *et al.*, 2000). Na fase pós-natal, os precursores de células T são oriundos da medula

óssea. Essa migração envolve fatores quimiotáticos, proteínas de matriz extracelular, moléculas de adesão, metaloproteinases, entre outros fatores (SAVINO *et al.*, 2002a).

Quando se torna competente, o timo primordial adquire um microambiente propício para maturação de timócitos e diferenciação de células T. A cápsula delgada penetra no órgão através de prolongamentos ou septos de tecido conjuntivo trabecular e, ao se unirem, dividem o órgão em lóbulos. O estroma de cada lóbulo tímico é formado por uma rede de células epiteliais, por macrófagos e células dendríticas, por entre as quais migram e interagem os timócitos - designação geral das células em diferentes estágios de diferenciação que vão dar origem aos linfócitos T maduros (GORDON *et al.*, 2004).

A parte periférica de cada lóbulo, denominada córtex, é formada por tecido linfóide denso e contém a maioria dos timócitos imaturos em proliferação, enquanto a porção central, a medular, é constituída por tecido linfóide frouxo e contém as células maduras. O desenvolvimento dos timócitos avança concomitantemente com a migração dessas células do córtex para a medula tímica (GORDON *et al.*, 2004).

Durante a ontogenia, ocorrem modificações seqüenciais das moléculas expressas na superfície dos timócitos, onde estas alterações fenotípicas caracterizam os diferentes estágios de diferenciação celular. Ao terminarem seu processo de diferenciação, tais células entram na corrente sangüínea através das paredes das vênulas pós-capilares e migram para áreas de células T dependentes dos órgãos linfóides periféricos (RAVIOLA, 1977; SAVINO & DARDENNE, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001).

As regiões cortical e medular são divididas pela JCM. Estas regiões são preenchidas por uma rede tridimensional de elementos de ECM, células epiteliais tímicas (TEC), linfócitos e ainda outros tipos celulares, tais como: macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, neutrófilos e eosinófilos. A matriz extracelular tímica é uma rede estrutural constituída por moléculas que apresentam grande atividade de ligação entre si e com receptores expressos na superfície celular (SALOMON *et al.*, 1994; DALMAU *et al.*, 1999; SAVINO *et al.*, 2000, 2002a).

Durante a organogênese, células progenitoras hematopoéticas entram no rudimento tímico pelo tecido conjuntivo circundante (ITOI *et al.*, 2001; MASUDA *et al.*, 2005). Dentro do timo, células T desenvolvem-se em nichos formados por células estromais no parênquima tímico (van EWIJK *et al.*, 1999; GILL *et al.*, 2003). Após total maturação no parênquima, células T chegam à medula e, na JCM, deixam o timo para a periferia. Somente pequenas populações da linhagem de células T entram ou deixam o timo através dos vasos sangüíneos (PETRIE, 2002). Portanto, para assegurar a migração seletiva das células, os vasos sangüíneos, no timo, devem ter estruturas e mecanismos de reconhecimento específicos. Alguns autores afirmam que os espaços perivasculares são vistos exclusivamente na medula e na JCM do timo, identificados como regiões separadas por duas membranas basais: uma associada a um vaso sangüíneo, enquanto a outra, com a borda epitelial (KATO, 1997; MORI *et al.*, 2007).

Quanto à irrigação sangüínea do timo, esta apresenta características peculiares, na qual os capilares e os pequenos vasos destinados ao órgão não apresentam poros, mas sim uma membrana basal espessa, envolvida por uma camada de células epiteliais com prolongamentos finos que perfuram a lâmina basal e podem entrar em contato com as células reticulares epiteliais, porém, esta

membrana não é totalmente contínua, mas atua como uma barreira hematotímica, dificultando a passagem de antígenos ou macromoléculas do sangue para o interior do parênquima e, conseqüentemente, o seu contato com os linfócitos intratímicos (RAVIOLA & KARNOVSKY, 1972; SILVA, 2001).

As artérias penetram no timo pela cápsula, ramificam-se, seguindo os septos conjuntivos originando arteríolas que penetram no parênquima seguindo os limites entre as regiões cortical e medular. Essas arteríolas formam capilares que entram na região cortical, ramificam-se e anastomosam-se, dirigindo-se para a região medular, os quais desembocam em vênulas. A região medular recebe outros capilares diretamente das arteríolas do limite córtico-medular. As vênulas da região medular confluem para formar veias que penetram nos septos conjuntivos e saem do timo pela cápsula do órgão (RAVIOLA & KARNOVSKY, 1972; KATO, 1997), o que pode ser evidenciado através da figura 1.

O timo não possui vasos linfáticos aferentes e não constitui um filtro para a linfa, como ocorre nos linfonodos. Os poucos vasos linfáticos encontrados no timo são todos eferentes e localizam-se nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo dos septos e da cápsula do órgão, estes sofrem uma involução com o órgão (RAVIOLA & KARNOVSKY, 1972; KATO, 1997).

1.3 O microambiente tímico e a diferenciação intratímica

Os principais componentes do microambiente tímico são as TEC, presentes em todas as regiões, sendo distintas morfologicamente de acordo com a localização. Essa distinção também pode ser caracterizada pela presença de diferentes antígenos, sugerindo que diferentes subtipos de TEC possam ter funções específicas na diferenciação de timócitos (van EWIJK *et al.*, 1999; BOYD *et al.*, 1993).

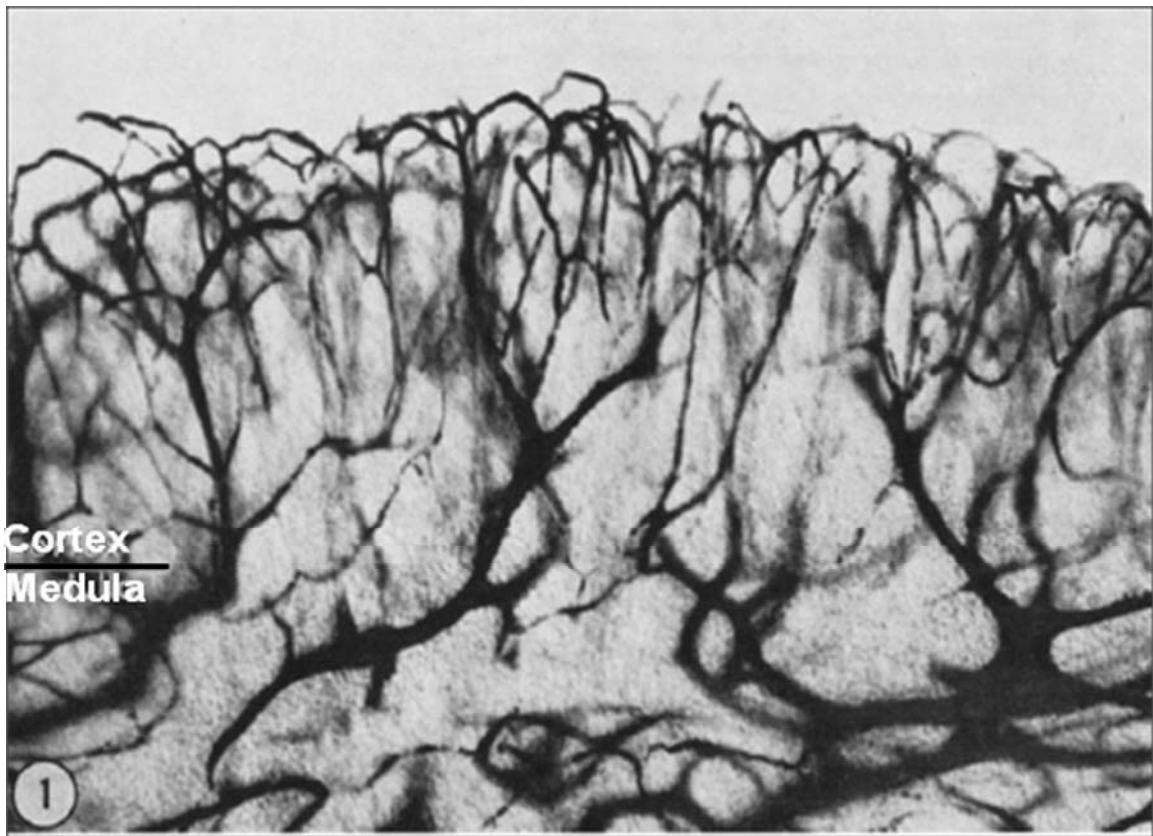


Figura 1. Fotomicrografia de um corte tímico de camundongo após injeção vascular com emulsão fotográfica.

Os capilares, originados de arteríolas da junção córtico-medular, sobem em direção ao córtex e formam, na região subcapsular, uma rede de ramificações e anastomoses. Posteriormente, dirigem-se para a região medular, desembocando em vênulas pós-capilares. 200x (RAVIOLA & KARNOVSKY, 1972).

Além disso, as TEC também 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 complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O contato célula-célula também pode ser mediado por moléculas de adesão expressas pelas células epiteliais, através de moléculas de ECM e seus receptores (van EWIJK et al., 1999; SAVINO & DARDENNE, 2000; KIM *et al.*, 1998).

No timo, as células linfóides imaturas, ou timócitos, proliferam-se e diferenciam-se, passando através de uma série de estágios fenotípicos que podem ser identificados pelos padrões característicos de expressão de diversas proteínas de superfície celular, devido a esse evento de maturação estas células passam a ser chamadas de células T. Esse processo envolve várias proteínas importantes, além de um rearranjo gênico das cadeias que formam o receptor de célula T (TCR), por expressão seqüencial das cadeias β e α (SAVINO & DARDENNE, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001; BOEHM & BLEUL, 2006).

O processo de diferenciação intratímica depende das interações dos timócitos com o microambiente tímico, tais como as que acontecem entre o TCR e o complexo MHC-peptídeo (RITTER & PALMER, 1999). Várias outras moléculas são expressas na superfície celular dos timócitos em diferentes estágios de diferenciação e maturação. Dentre estas podemos destacar CD4, CD8, CD24, CD44, CD25, CD69 e CD62L (ANDERSON & JENKINSON, 2001).

Em camundongos, as primeiras células de origem linfóide, ao entrarem no timo, apresentam fenótipo CD90⁺ (marcador geral de células T), CD24⁺, CD44⁺ e baixos níveis de CD4. Na seqüência, os timócitos mais imaturos, situados principalmente na região cortical, não expressam o complexo CD3/TCR, nem as

moléculas acessórias CD4 ou CD8, apresentando o fenótipo DN, o que representa cerca de 5% do total de timócitos. Esse subgrupo ainda pode ser identificado em diferentes estágios de acordo com a expressão de outras moléculas de superfície, tais como CD25 e CD44. Neste estágio tais células podem dar origem a células dendríticas ou natural killer (NK). As células DN diferenciam-se nesta ordem: $CD44^+CD25^-$, $CD44^+CD25^+$, $CD44^-CD25^+$ e $CD44^-CD25^-$. À medida que migram em direção à medula tímica elas adquirem os marcadores de superfície CD4 e CD8, gerando as células DP, ainda localizadas no córtex, e que compreendem 80% dos timócitos totais. As células DP que expressam TCR/CD3, selecionadas positivamente, tornam-se células maduras simples positivas (SP): $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$, funcionalmente competentes e aptas a povoarem os órgãos linfóides periféricos (HARE *et al.*, 1999; BENOIT & MATHIS 1999; SAVINO & DARDENNE, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001; GILL *et al.*, 2003; BOEHM & BLEUL, 2006).

Precursosores das células T, chegando no timo, entram numa fase de intensa proliferação. Num camundongo adulto jovem, no qual o timo contém cerca de $(1-2 \times 10^8)$ timócitos, aproximadamente 5×10^7 células são recentemente geradas a cada dia. No entanto, apenas cerca de 10^6 destas deixarão o timo como linfócitos T maduros. Apesar da disparidade entre os números de células T, continuamente geradas no timo, e o número das que o deixam, este não continua a crescer em tamanho ou em número de células. Isso acontece porque aproximadamente 98% dos timócitos gerados a cada dia morrem dentro do timo, não se observando qualquer dano disseminado, indicando que a morte deve ocorrer por apoptose (BENOIT & MATHIS, 1999).

1.4 Migração intratímica de células T

Simultaneamente aos processos de seleção intratímica, a migração celular é necessária para uma diferenciação normal, inclusive para a saída dos timócitos maduros para o leito vascular. Nos eventos intratímicos, células T passam por uma rota migratória intratímica direcionando-se para o córtex e, posteriormente, para a medula (Figura 2A). À medida que migram, os timócitos interagem com vários componentes do microambiente tímico, a rede tridimensional (Figura 2B) formada por TEC, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, através da interação direta célula-célula via ligantes e receptores de ECM e moléculas de adesão e de-adesão ou fatores solúveis como citocinas, quimiocinas e hormônios tímicos (BOYD *et al.*, 1993; SAVINO & DARDENNE, 2000; van EWIJK *et al.*, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001; ANNUNZIATO *et al.*, 2001; SAVINO *et al.*, 2002a).

Esta rede de moléculas de ECM, além de funcionar como suporte, influenciaria o processo de migração, desde o primeiro contato célula-célula até a saída dos timócitos do órgão. Os processos migratórios de células T no timo ocorrem numa seqüência de eventos que incluem interações com células do microambiente, diferenciação, seleção positiva/negativa, e passagem pelo espaço perivascular, que os conduzirá por vasos sanguíneos a órgãos linfóides periféricos (SAVINO *et al.*, 1993, 2002a, 2004; MORI *et al.*, 2007).

Os eventos de adesão envolvem interações mediadas por receptores e co-receptores de membrana expressos em timócitos e células do microambiente tímico, além dos elementos de ECM (SAVINO *et al.*, 1993). Dentre os componentes da ECM estudados no timo estão as proteínas fibrosas estruturais, como diferentes tipos de colágenos e glicoproteínas adesivas como fibronectina e laminina, cujos receptores estão compreendidos na família das integrinas que são heterodímeros compostos de

subunidades α e β que podem se combinar de forma não covalente, interligando a ECM ao citoesqueleto e transmitindo sinais bioquímicos para o interior da célula. Os receptores da família $\beta 1$ são chamados de VLA e são expressos por células do microambiente tímico e por timócitos e, nesse caso, sua expressão varia de acordo com o estágio de maturação dos mesmos e com a região do timo (JULIANO & HASKILL, 1993; PAKIANATHAN, 1995).

Além das moléculas de adesão e seus receptores, os eventos sequenciais de migração de timócitos incluem ainda as moléculas de-adesivas. Villa-Verde *et al.* (2002) demonstraram a expressão de galectina-3, uma lectina endógena produzida por células epiteliais e células fagocitárias do timo capaz de promover de-adesão de timócitos, em diferentes compartimentos tímicos.

Combinadas às moléculas de adesão e de-adesão, as quimiocinas promovem a orientação da migração celular, induzindo movimentos direcionais nos diversos estágios de maturação de timócitos, sendo expressas diferencialmente de acordo com a região do timo (KIM *et al.*, 1998; SAVINO *et al.*, 2004).

Os receptores de quimiocinas são expressos em timócitos dependendo da região do timo, mas também de seu estágio de maturação. Eles pertencem à família de receptores transmembranares ligados à proteína G, sendo que um receptor pode se ligar a várias quimiocinas e o contrário também pode acontecer. Esta chamada promiscuidade não se aplica a todas as moléculas, mas garante ampla interação entre elas, o que torna mais difícil o estudo e o entendimento do papel de cada molécula isoladamente. O papel destas moléculas como fator relacionado à migração de timócitos foi pressuposto quando timócitos de animais transgênicos para *Toxina pertussis* ficavam presos no timo, e não emigravam para a periferia (CHAFFIN & PERLMUTTER, 1991).

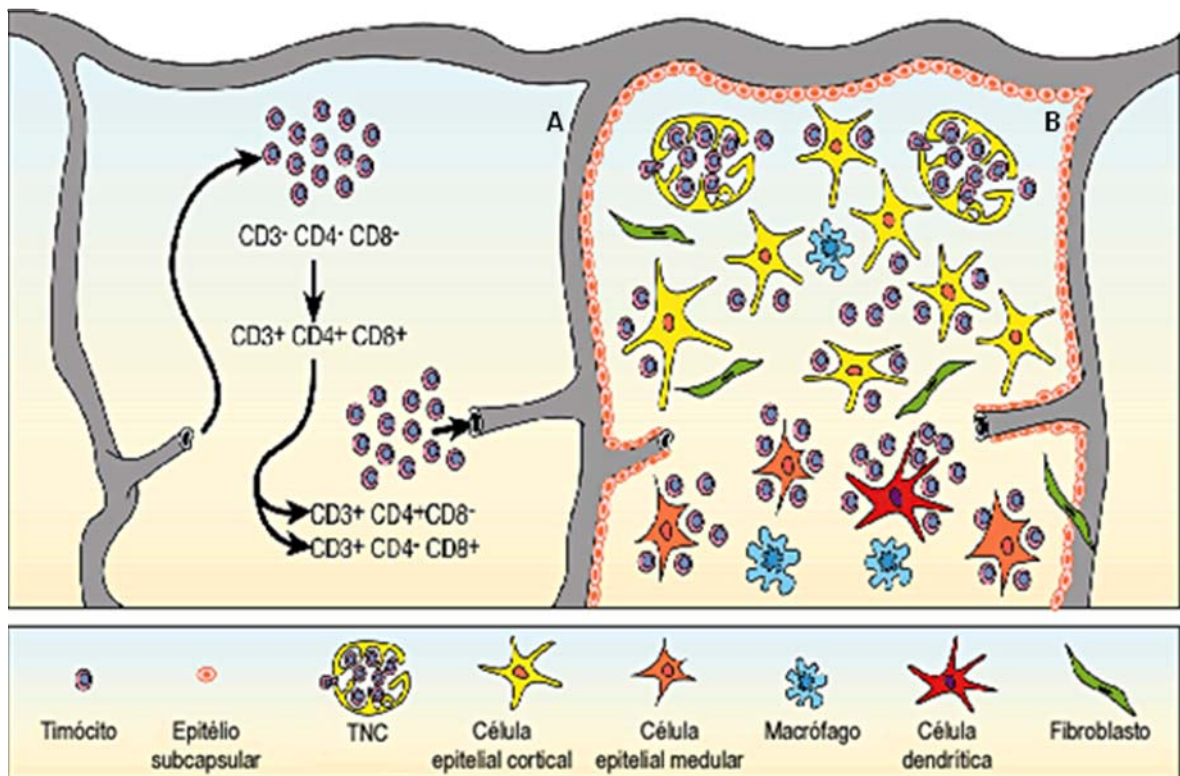


Figura 2. Migração intratímica de células T e o microambiente tímico.

A. Esquema de migração de timócitos, mostrando a entrada de precursores de células T através de vasos sanguíneos dentro do timo. Após entrarem no timo, durante o processo de diferenciação, os timócitos migram para o córtex e, posteriormente, para a medula. **B.** Esquema de um lóbulo tímico onde estão ilustrados os vários componentes celulares do microambiente tímico que interagem com os timócitos (SAVINO *et al.*, 2002a).

1.5 Célula endotelial

A célula endotelial compõe o revestimento mais interno da parede dos vasos. A superfície luminal deste revestimento apresenta saliências que correspondem aos núcleos celulares proeminentes, enquanto que a superfície tecidual, oposta à luz, repousa sobre uma lâmina basal, cujos principais constituintes são a laminina e o colágeno tipo IV. Esta lâmina, quando digerida pela collagenase, permite o isolamento de células endoteliais para seu estudo e cultura *in vitro* (MOHAMMAD & BOS, 1990).

A célula endotelial tem a forma alongada, com o núcleo proeminente, sendo repleta de organelas intracelulares. A estrutura da célula endotelial é a de uma célula que possui atividade metabólica intensa. A característica estrutural típica de uma célula endotelial adulta é a presença de invaginações submicroscópicas na membrana citoplasmática, denominadas cavéolas. Independentemente do tipo de vaso que o endotélio recobre, ele modula ativamente a coagulação, o transporte de substâncias, solutos e moléculas através das junções intercelulares. Os mediadores e/ou fatores produzidos pelo endotélio podem ser inutilizados dentro da própria célula, difundir-se para o sangue ou atravessar a membrana do músculo liso vascular (MICHEL, 1998).

O conhecimento sobre a função da célula endotelial vascular mudou muito nas últimas décadas, quando Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que a célula endotelial modula o tônus vascular. A célula endotelial controla ativamente o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular e a resposta inflamatória e imune. A presença da célula endotelial recobrindo todo o leito vascular pode significar, em um primeiro momento, que o endotélio forma uma extensa rede de proteção entre os componentes do sangue e os tecidos para

permitir melhor fluidez e evitar a coagulação do sangue. Contudo, a forma pela qual é montada a estrutura e a organização da rede requer o contato íntimo entre as células endoteliais. Em qualquer situação de quebra de continuidade da rede ou perda do contato, as células se organizam e procuram, novamente, refazer a conexão intercelular (FENSTERMACHER *et al.*, 1988; STOLTZ *et al.*, 2007).

A célula endotelial, ao formar o endotélio, mantém relacionamentos não só entre si, por junções celulares (STAEHELIN & HELL, 1976), como também com células musculares lisas que existem na túnica íntima, junções mioendoteliais (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1988) e, por meio de filamentos de ancoragem, com a lâmina basal sobre a qual repousa (MOHAMMAD & BOS, 1990).

Estes relacionamentos da célula endotelial participam da função física do endotélio - a da barreira entre o sangue e a camada subendotelial altamente trombogênica - permitindo uma maior resistência aos estresses provocados sobre o vaso, devido a estiramentos e à circulação dos elementos figurados do sangue; também participam da função de filtro desempenhada pela camada endotelial ao regular a passagem seletiva de moléculas, por difusão, da luz para o interior da parede vascular. Tanto a função de barreira quanto a de filtro se fazem por conta principalmente das junções celulares (MILLER & BURNETT, 1990).

A necessidade de uma conexão integrada se deve ao fato de que os produtos liberados pelo endotélio, como o óxido nítrico (NO), possuem uma meia-vida menor do que 50 segundos e, evidentemente, não conseguem percorrer vários diâmetros celulares livremente dentro da corrente sanguínea (FENSTERMACHER *et al.*, 1988).

A relação íntima entre o endotélio e todos os componentes do sangue surge já na fase embrionária de formação dos vasos sanguíneos. A célula endotelial prolifera, na fase embrionária, por meio da divisão celular e da formação

de brotos. Os brotos, à medida que se formam, são preenchidos pelos componentes do sangue, dando origem ao vaso. O tecido conjuntivo e as células do músculo liso são incorporados, posteriormente, sob influência da célula endotelial, completando a formação do vaso (WOLINS, 2000).

Agressões mecânicas, químicas ou metabólicas ao vaso podem levar à disfunção da célula endotelial. Ocorrendo a morte de uma célula endotelial, a célula mais próxima da área desnuda entra em processo de divisão e migração, que somente cessa quando uma célula entra em contato com a outra, restabelecendo a rede celular. A disfunção endotelial observada no curso das doenças vasculares crônicas está, geralmente, associada a fatores ambientais que aceleram a lesão vascular e levam a perda da função ou perda do órgão (PLANTE, 2002; HAMET & TREMBLAY, 2002).

Ao longo da investigação sobre o funcionamento do endotélio vascular, a partir da década de 1980, foi descrito um fenômeno denominado vasodilatação dependente do endotélio. Mudou-se, desde então, o conceito de que se tratava de um tecido epitelial com funções passivas de revestimento dos vasos para o conceito de órgão com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas nos diversos leitos vasculares. Além disso, a maior parte do endotélio encontra-se na microcirculação, e uma pequena parte em grandes artérias de condutância. Também é importante lembrarmos que as células endoteliais de diferentes leitos vasculares apresentam características próprias e se comportam de modo específico frente a um determinado estímulo (FISHMAN, 1982; SUMPIO *et al.*, 2002).

O cultivo das células endoteliais em monocamada pode ser feito utilizando-se células endoteliais originárias de diversos tecidos, como veias de cordão umbilical humano, aorta bovina, coronária de porco, veia safena humana, que são

mantidas em placas ou garrafas com meio de cultura (solução-tampão com sais e nutrientes) em estufas a 37°C e com a atmosfera com 5% de CO₂. Quando estas células são extraídas diretamente destes tecidos, através de explante ou através de métodos de digestão enzimática e dispersão, é possível promover a proliferação seletiva das células endoteliais utilizando-se substrato adequado para a sua adesão (fibronectina, por exemplo), além de um estímulo para sua proliferação como: soro fetal bovino (SFB) ou outros estímulos mais específicos como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Uma vez proliferadas pode-se realizar um número limitado de “passagens”, de 10 a 20 em geral, em que estas células mantêm suas características após tornarem-se senescentes (MORGAN, 1998).

O uso de técnicas de seleção de populações de células permite a obtenção de linhagens de células endoteliais com maior capacidade de proliferação, que podem ser mantidas com o fenótipo próximo ao das células originais por um número maior de "passagens" (variando de 15 a 250). Uma vez estabelecida, a cultura pode-se testar uma série de estímulos de diferentes naturezas sobre a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, ECAM-1) e sobre vias de sinalização celular (TAKANO *et al.*, 2002). A formação de novos vasos capilares por estruturas vasculares preexistentes é de importância fundamental na manutenção da integridade vascular, no reparo do tecido danificado, na cicatrização de ferimentos e na formação garantida de vasos em resposta à isquemia (ZIMRIN & MACIAG, 1996; FOLKMAN, 2007).

A angiogênese é um processo complexo que é orquestrado por citocinas e fatores de crescimento, iniciando-se com a estimulação de células endoteliais em quiescência, evoluindo para o estado de rápida proliferação e migração, terminando com a re-diferenciação de células endoteliais ativadas em tubos

vasculares. Foi constatado que citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e, mais recentemente, E-selectina solúvel, promovem a migração das células endoteliais e a dissolução da matriz, fenômenos essenciais para iniciação da formação do tubo capilar (ZIMRIN & MACIAG, 1996; FOLKMAN, 2007).

Os primeiros trabalhos publicados por Ziche et al. (1994) estabeleceram as bases para o entendimento do papel do NO como mediador de proliferação de células endoteliais. Vários estudos em pacientes com aterosclerose e fatores de risco têm demonstrado que a alteração da função endotelial ocorre não só nas coronárias, mas também na circulação periférica, sugerindo que a disfunção endotelial é um processo sistêmico generalizado (DOMINIK & GANS, 2002).

As células endoteliais, bem como as células dendríticas, macrófagos, linfócitos B, astrócitos, células de Kupffer ou de Langerhans, podem iniciar a resposta imune, como célula apresentadora de antígenos. Tanto o seu potencial de modificação fenotípico, quanto a polarização de formas das células endoteliais, espelham uma diversidade funcional que determina o seu papel na resposta imune. No entanto, o endotélio não pode ser considerado como um elemento imutável, pois as células endoteliais exibem características específicas e diversificadas em cada órgão que variam de acordo com alguns fatores, tais como: diâmetro, tipo e localização do vaso nos quais se encontram. Com isso, a célula endotelial controla as interações das células imunocompetentes com a parede do vaso (BECHARD et al., 2001).

A célula endotelial está capacitada para exercer uma função básica da resposta imune que é a apresentação de antígenos. Esta apresentação ocorre não só via moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I, como nas

demais células nucleadas, mas também via moléculas de classe II e outros HLA (STEIMLE *et al.*, 1994, 1996).

As moléculas de adesão celular (CAM) são glicoproteínas expressas na superfície celular, que medeiam o contato entre duas células ou entre células e a matriz extracelular. O processo de adesão é essencial e ocorre em vários eventos biológicos como: morfogênese, crescimento, organização e estabilidade teciduais, inflamação, cicatrização e resposta imune. Elas são responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação. A seletividade depende do mediador e do tipo de célula envolvida. As moléculas de adesão estão divididas em quatro superfamílias, dependendo de características moleculares comuns: integrinas, selectinas, superfamília das imunoglobulinas e caderinas (STOLTZ *et al.*, 2007).

1.6 Interações imunoneuroendócrinas

Estudos sobre as interações entre o cérebro e o sistema imunológico revelam conexões bidirecionais entre os sistemas neural e neuroendócrino e o sistema imunológico. O sistema nervoso central regula tais sistemas por meio das vias neuronais e neuroendócrinas que, por sua vez, sinaliza o cérebro por meio das rotas neurais e humorais. O sistema imunológico é innervado pelo sistema nervoso simpático. Células do sistema imunológico expressam receptores para neurotransmissores, tais como catecolaminas e neuropeptídeos, como também para hormônios provenientes de diversos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal, hipotálamo-hipófise-gonadal, hipotálamo-hipófise-tireóide e hipotálamo-hipófise-GH (SAVINO & DARDENNE, 1995; BESEDOVSKY & DEL-REY, 2001; MARQUES-DEAK *et al.*, 2005).

Além disso, o sistema parassimpático, via o nervo vago, contribui para a conexão bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico. Por meio dessas vias, os sistemas nervoso e endócrino podem exercer um efeito direto sobre o sistema imunológico, sendo que o mesmo pode sinalizar para o SNC por meio de citocinas (ESKANDARI *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, a crescente compreensão sobre a interação entre o sistema imunológico e o sistema neuroendócrino demonstrou que essa interação desempenha um papel em muitas doenças, como septicemia, doenças reumáticas, outras doenças auto-imunes, doenças cardíacas, doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos (CARNEY & FEEDLAND, 2003; RAMASAWMY *et al.*, 2007).

1.7 O Hormônio de Crescimento e o sistema imune

Estruturalmente, o Hormônio de Crescimento (GH) é um polipeptídeo de 191 aminoácidos em cadeia única que possui peso molecular de 22,000 daltons. Esse hormônio é secretado, principalmente, pelas células somatotróficas da hipófise anterior ou adenohipófise e suas ações estão relacionadas à síntese de proteínas, diferenciação e proliferação celular e, conseqüentemente, crescimento tecidual (PATTON *et al.*, 1989). A secreção do GH, mediante o seu fator de liberação, é regulada pelo hipotálamo. Esse fator é carregado para a hipófise anterior pelo sistema porta-hipofisário e, quando presente, estimula a secreção do GH. Adicionalmente, células do sistema imune são capazes de produzir GH (VENTERS *et al.*, 2001). O receptor de GH (GHR) é uma proteína transmembranar pertencente à superfamília de receptores associados à tiroquinase. Outros representantes desta superfamília dos receptores incluem os receptores de prolactina, eritropoetina, trombopoetina,

múltiplas interleucinas, fatores de crescimento, oncostatina M e interferons- α , - β e - γ (VENTERS *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2001).

O GHr é composto por 620 aminoácidos, sendo expresso em altos níveis no fígado e em tecidos adiposos. Entretanto, pode ser detectado em outros tecidos, incluindo: intestino, cérebro, testículo, coração e músculo esquelético (KELLY *et al.*, 1993). A expressão do GHr foi também demonstrada em células do sistema imune. É encontrado em níveis variados em todas as linhagens hematopoéticas da medula óssea. No timo, este receptor é expresso em timócitos de camundongos e humanos, principalmente em CD4⁻CD8⁻, incluindo também CD4⁺CD8⁺ e CD4⁻CD8⁺ e em células epiteliais tímicas. Nos tecidos linfóides secundários, o GHr é encontrado nas células B, células T CD4⁺ e CD8⁺ e em macrófagos. Além disso, a ativação de células T, como uma das conseqüências, expressa GHr (BAN *et al.*, 1991; GAGNERAULT *et al.*, 1996; de MELLO-COELHO *et al.*, 1998; DARDENNE *et al.*, 1998; HATTORI *et al.*, 2001; WELNIAK *et al.*, 2002).

O GH não atua apenas nos tecidos do organismo para exercer seus efeitos no crescimento; este estimula fatores de crescimento conhecidos como somatomedinas, sendo o mais importante deles o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Quanto à secreção, o fígado é a principal fonte de IGF-1, a qual é estimulada, principalmente, pelo GH (MURPHY *et al.*, 1987; GIBNEY, 2004).

Várias evidências sugerem que o eixo GH/IGF-I pode ter um importante efeito imunomodulatório, e foi documentado que pacientes com deficiência de GH têm níveis aumentados de marcadores inflamatórios (SESMILO *et al.*, 2000). Dessa forma, GH e IGF-I têm sugerido estar envolvidos na patogênese de doenças cardiovasculares. Entretanto, o papel do GH é complexo porque a deficiência dele em pacientes que sofrem um aumento na incidência de doenças cardiovasculares e

baixas concentrações de IGF-I estão relacionadas ao aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardíacas isquêmicas (FRYSTYK, 2002; JUUL *et al.*, 2002).

Vários dados têm demonstrado que o GH é uma molécula imunomodulatória. Por exemplo, o GH aumenta a sobrevivência de ratos e camundongos infectados com bactérias, *Salmonella typhimurium* e *E. coli*, respectivamente (EDWARDS *et al.*, 1991; INOUE *et al.*, 1998). Ele também estimula a produção de interferon- γ , induzindo uma resposta imune do tipo Th1 (VENTERS *et al.*, 2001). Em harmonia com tais dados, o GH exibe um efeito proliferativo sinérgico sobre células T derivadas do baço estimuladas com concanavalina A ou anti-CD3 (POSTEL-VINAY *et al.*, 1997).

A influência de hormônios hipofisários sobre o sistema imune foi também demonstrada em estudos com animais geneticamente deficientes de células hipofisárias, os camundongos anões Snell-Bagg e Ames, os quais são imunologicamente deficientes por apresentar diminuição de células DP no timo (PIERPAOLI & SORKIJ, 1968; FABRIS *et al.*, 1971). Esses animais apresentam timo, baço e outros órgãos linfóides atrofiados, além de decréscimo de celularidade na medula óssea e falta de reação enxerto-versus-hospedeiro. A reconstituição desses camundongos com GH foi capaz de estimular a linfopoese e restaurar a imunidade celular e humoral. Kelley *et al.* (1986) verificaram que administração de células GH3 em ratos velhos reverteu o tamanho do timo para quase o equivalente ao de animais jovens e promoveu aumento no número de timócitos corticais. Efeito proliferativo foi também observado em timócitos tratados com sobrenadante de culturas de células epiteliais tímicas pré-tratadas com GH (LIN *et al.*, 1997). Além disso, o timo de animais velhos inoculados com células GH3, apresentou aumento

de timócitos $CD4^+CD8^+$ e diminuição no número de $CD4^-CD8^-$ no timo (LI *et al.*, 1992). A influência pleiotrópica que o GH exerce sobre as células tímicas foi demonstrada, ainda, por Savino *et al.* (2002b), como ilustrado na figura 3.

Estudos de migração *in vitro*, mostraram que o GH pode modular a expressão de ligantes de matriz extracelular como fibronectina e laminina e seus respectivos receptores, VLA-5 e VLA-6 e conseqüente adesão timocitos/TEC. O mesmo grupo também demonstrou que o GH foi capaz de acelerar a liberação de linfócitos T de complexos linfo-epiteliais e, também, a reconstituição de tais complexos com timócitos fetais (de MELLO COELHO *et al.*, 1997).

O GH, *in vivo*, mostrou-se capaz de influenciar a migração de timócitos murinos de camundongos singênicos para o timo de camundongos SCID, os quais são deficientes de células T maduras (MURPHY *et al.*, 1992). O mesmo grupo demonstrou que células T de sangue periférico humano migravam para o timo de camundongos SCID somente se fossem pré-tratadas com GH. Essa migração poderia ainda ser inibida por anticorpos específicos para a cadeia $\beta 1$ das integrinas (TAUB *et al.*, 1994). Estudos sobre o timo em dois modelos murinos: animais transgênicos para o gene de GH bovino (Tg-GH) e camundongos BALB/c que sofreram injeção intratímica de GH recombinante bovino, mostraram um aumento no número de timócitos, e também da deposição de laminina e seu receptor VLA-6 no microambiente tímico, tanto em animais Tg-GH quanto em camundongos tratados com GH. Além disso, os timócitos obtidos destes animais apresentaram adesão aumentada à laminina, migração aumentada em câmaras de *transwell* pré-tratadas

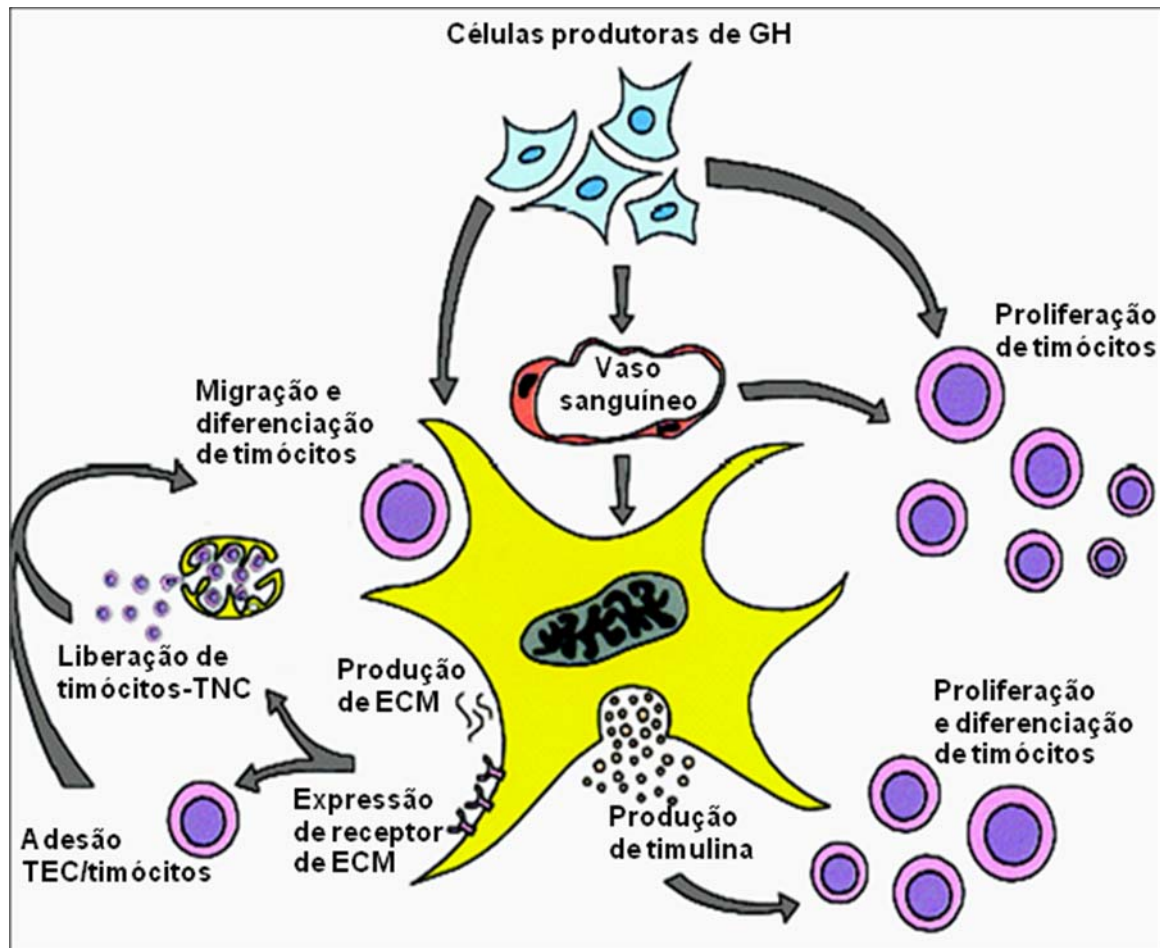


Figura 3. Efeitos pleiotrópicos do GH sobre células tímicas.

Representação esquemática mostrando que o GH produzido pela hipófise ou por células extra-hipofisárias pode agir sobre as células tímicas de maneira endócrina e/ou parácrina (SAVINO *et al*, 2002b).

com laminina e também frente às quimiocinas CXCL12/SDF-1 α ou CCL19/MIP-3 β . Quando combinamos laminina com a quimiocina CXCL12, a migração *ex-vivo* de timócitos resultou num somatório dos dois estímulos e este efeito foi observado em animais controles, Tg-GH e tratados com GH (SMANIOTTO *et al.*, 2005).

Outro estudo demonstrou o papel do GH sobre a migração dos chamados recentes emigrantes tímicos para os órgãos linfóides periféricos, demonstrando que o GH modula *in vivo* a saída de timócitos, com aumento significativo de células T CD4⁺CD8⁻FITC⁺ nos linfonodos (SMANIOTTO *et al.*, 2004).

1.8 A atuação do GH nas células endoteliais

O GH desempenha um papel importante na biologia cardiovascular, pois a deficiência do hormônio de crescimento está associada ao risco para doença cardiovascular e resistência vascular periférica aumentada. A diminuição da produção de GH em pacientes, leva à diminuição dos níveis sistêmicos de NO e progressão acelerada da arteriosclerose. Conseqüentemente, o tratamento de pacientes com GH resulta em resistência periférica total reduzida, débito cardíaco aumentado, como também concentrações de colesterol plasmático reduzidos (ROSEN & BENGTSSON, 1990; BOGER *et al.*, 1996; NAPOLI *et al.*, 2002).

Pacientes com acromegalia ou gigantismo, que têm altos níveis plasmáticos de GH e IGF-1, geralmente sofrem de aterosclerose grave (IOANITIU *et al.*, 1982). A aceleração da aterosclerose é também um tópico recente em estudos de adultos com deficiência de GH (PFEIFER *et al.*, 1999). Em adição a isso, a estimulação da produção do potente IGF-1 no fígado, aumenta diretamente a proliferação celular, até mesmo nos sítios aterogênicos (ISAKSSON *et al.*, 1991; KASUYA *et al.*, 1994). Diante disso, geralmente, são considerados processos complexos, consistindo de lesão de células endoteliais (RUSCHITZKA *et al.*, 1997), a transformação de

macrófagos e células musculares, com uma eventual formação de ateroma. Durante o processo de aterogênese, a migração da célula endotelial também ocorre (WALL *et al.*, 1981), o que pode ser importante na iniciação da angiogênese e vasculogênese no sítio da isquemia e da lesão da célula endotelial (STOUT, 1990).

O GH também regula a síntese de IGF-1, que por sua vez aumenta a liberação de NO (TSUKAHARA *et al.*, 1994). Já os pacientes com baixos níveis de GH têm uma disponibilidade reduzida de NO (ROSEN & BENGTSSON, 1990; BOGER *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a ativação do IGF-1 contribui para o aumento da liberação de NO em culturas de células endoteliais, embora não tenha sido detectada a transcrição de IGF-1 α e/ou IGF-1 β em culturas de células endoteliais. O efeito do GH parece ser mediado pela produção local de IGF (THOMAS *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar o envolvimento do GH na função endotelial e morfologia dos vasos sangüíneos, onde, por exemplo, a deficiência ou excesso de GH, estão associados com disfunção endotelial, principalmente no que se refere à produção de moduladores do crescimento endotelial, fatores de crescimento angiogênico e mudanças na morfologia dos vasos sangüíneos (SILHA *et al.*, 2005). Injeção de GH estimula o crescimento de vasos sangüíneos no córtex cerebral de ratos velhos quando comparados aos animais não tratados (SONNTAG *et al.*, 1997). O GH e IGF-I podem estimular ou inibir vários estágios da formação ou remodelação de novos vasos sangüíneos, incluindo proliferação, migração, produção de proteases e apoptose em células endoteliais (CORBACHO *et al.*, 2002).

Entretanto, no que se refere ao possível papel do GH na fisiologia do timo e, em particular, sobre as células endoteliais envolvidas na transmigração de células T neste órgão, faz-se necessário um estudo mais detalhado.

2 OBJETIVOS

A análise crítica dos dados publicados na literatura sobre os efeitos do GH sobre o microambiente tímico e a migração de linfócitos T durante o desenvolvimento, mostram que questões relevantes para o entendimento da fisiologia tímica e da entrada e saída de células T, ainda não haviam sido respondidas. Interessados em contribuir para o estudo do controle neuroendócrino sobre o timo, para um melhor delineamento de estratégias terapêuticas baseadas em GH, que poderão ser utilizadas em condições de imunodeficiência, investigamos a influência *in vitro* desse hormônio sobre a linhagem de células endoteliais derivada de timo murino (tEnd.1), nesse sentido, buscou-se:

- Analisar os efeitos do GH na proliferação e morfologia das células endoteliais tímicas;
- avaliar a ação do GH na expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular em tEnd.1;
- verificar a ação do GH em interações tEnd.1/timócitos;
- observar o efeito do GH na migração transendotelial de timócitos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Em todos os experimentos, utilizamos camundongos machos da linhagem C57BL/6, adultos jovens, com idade média de 4 a 6 semanas. Os animais foram obtidos junto ao Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), foram mantidos em condições de água e alimentos *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo, cujo espaço e materiais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Wilson Savino.

3.2 Reagentes

GH humano recombinante, meio de cultura RPMI 1640, L-glutamina, tripsina, salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.2) e albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma Chemical (St Louis, USA); soro fetal bovino (SFB) inativado foi comprado da Cultilab (Campinas, SP); etanol, corante Giemsa e anti-fading foram obtidos da Merck (Campinas, SP).

3.3 Anticorpos

Para a imunocitoquímica, foram utilizados os anticorpos primários anti-laminina e anti-fibronectina (Sigma Chemical, St. Louis, USA) produzidos em coelho, anticorpos secundários produzidos em cabra anti-Ig de coelho (GAR) conjugado ao fluorocromo alexa-488 (padrão de fluorescência verde). Como controle negativo foi utilizada uma imunoglobulina não relacionada de mesma classe.

Para os ensaios de citometria de fluxo foram utilizados anticorpos primários conjugados diretamente a diferentes fluorocromos, sendo eles: CD49d (VLA-4)

FITC, CD49e (VLA-5) PE, CD49f (VLA-6) PE, CD4 FITC, CD4 PE e CD8 CY (Becton-Dickinson/PharMingen). Como controles negativos foram utilizadas imunoglobulinas não relacionadas, marcadas com fluorocromos correspondentes.

3.4 Tratamentos utilizados nos ensaios

No ensaio de proliferação, as células endoteliais tímicas foram tratadas, ou não, com GH nas concentrações de 2, 20 ou 200 ng/mL, por 8 ou 24 horas, em meio RPMI 1640 a 2% de SFB.

No ensaio de imunocitoquímica, as células foram tratadas, ou não, com GH na concentração de 20 ng/mL por 24 horas, em meio RPMI 1640 a 2% de SFB.

No ensaio de adesão entre timócitos/tEnd.1, nos ensaios de citofluorimetria e nos ensaios de migração transendotelial, as células foram tratadas, ou não, com GH na concentração de 20 ng/mL por 8 horas, em meio RPMI 1640 a 2% de SFB.

3.5 Cultura de células endoteliais tímicas

A linhagem de células endoteliais tEnd.1 derivadas de timo murino, foram cultivadas de acordo com os protocolos experimentais em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SFB, em frascos de cultura de 25 cm² (Corning Glass Works, NY, USA), câmaras lab-tek de vidro com 8 poços, placas de petri para cultura de tecido de 35 mm de diâmetro, placas de 24, placas de 6 poços, insertos com membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 µm (Nunc, Roskilde, Denmark). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa cuja atmosfera continha 5% de CO₂. A passagem das células, por tratamento com solução de tripsina/EDTA livre de cálcio e magnésio pH 7.2, foi feita quando estas alcançavam o estado de semiconfluência.

3.6 Ensaio de proliferação de células endoteliais tímicas

Para a realização desse ensaio, 2.5×10^4 tEnd.1 foram cultivadas triplicatas, em placas de seis poços, por 16 horas na presença de SFB a 10%. Após lavagem com PBS, as células foram tratadas, ou não (controle), com GH nas concentrações de 2, 20 ou 200 ng/mL, por 8 ou 24 horas, em meio RPMI 1640 a 2% de SFB.

Em seguida, utilizou-se uma solução de tripsina/EDTA, para que as células fossem desprendidas da placa, lavadas com o próprio meio e contadas em câmara de Neubauer por dois diferentes observadores.

3.7 Ensaio de imunocitoquímica

Após o tratamento, ou não, com GH em câmaras lab-tek de vidro com 8 poços, as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Posteriormente, as células foram hidratadas com PBS e, após 10 minutos, foi feito um bloqueio com PBS-BSA a 1%, a fim de bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos primários às diferentes preparações. Após um período de 30 minutos, foram incubados em câmara úmida em diluições adequadas com anticorpos primários específicos para laminina ou fibronectina por 1h à temperatura ambiente seguida de três lavagens de 5 minutos com PBS. As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário GAR-alexa-488 durante 45 minutos. Na seqüência, lavou-se com PBS e as lâminas foram montadas com anti-fading para uma posterior análise em microscópio confocal LSM 510-Zeiss (Oberkochen, Alemanha).

3.8 Ensaio de adesão timócitos/tEnd.1

A linhagem de células endoteliais tEnd.1 foi plaqueada com meio RPMI suplementado com SFB a 10%, em frascos de 25 cm² na densidade de 10^5

células/mL, e deixados por 16 horas em estufa de CO₂ a 37°C para aderirem. Em seguida foram lavadas com PBS e tratadas ou não com GH. Após o tratamento, tEnd.1 foram lavadas com PBS e então realizada co-cultura por 1 hora a 37°C das células endoteliais com timócitos frescos (na proporção de 50 timócitos/célula endotelial) obtidos de camundongos C57BL/6 de 4-6 semanas de idade.

Em seguida, os timócitos não aderentes foram delicadamente retirados, por lavagem com PBS. Nos experimentos delineados com objetivo de determinar o fenótipo dos timócitos aderidos, estes foram recolhidos, quantificados e submetidos à marcação para citofluorimetria. Em outros experimentos, após a lavagem, as co-culturas foram fixadas por 10 minutos em etanol e coradas por 15 minutos com Giemsa. A adesão dos timócitos às tEnd.1 foi avaliada por dois observadores, por contagem ao microscópio óptico, para posterior realização do índice de adesão (IA).

Para obtermos o IA aplicamos a seguinte fórmula (LANNES-VIEIRA *et al.*, 1993; VILLA-VERDE *et al.*, 1993):

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

3.9 Ensaio de migração transendotelial

Os ensaios de migração transendotelial de timócitos *ex-vivo* foram desenvolvidos utilizando o sistema de “transwell”, empregando insertos com membranas de policarbonato 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 µm. Primeiramente, foi colocado 500µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB em cada poço em placas de 24 poços e as células tEnd.1 foram cultivadas sobre a membrana dos insertos: 2 x 10⁵ tEnd.1/inserto em 500µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB.

Após 40 horas de cultivo, as células tEnd.1 foram tratadas, ou não, com GH na concentração de 20 ng/mL por 8 horas em meio de cultura RPMI suplementado com 2% de SFB. Após as 48 horas de cultivo, formou-se uma monocamada de células tEnd.1 na membrana. No desenvolvimento da migração, no poço inferior de uma nova placa, foram adicionados 500 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e nos insertos contendo a monocamada de células foram adicionados 2×10^6 timócitos frescos, obtidos de camundongo C57BL/6 de 4-6 semanas de idade em 500 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB. A migração celular foi desenvolvida por 18 horas em estufa de 5% CO₂ a 37°C. Posteriormente, os timócitos que migraram para a câmara inferior foram recolhidos, contados em câmara de Neubauer e marcados para posterior análise citofluorimétrica.

3.10 Análise por citofluorimetria

Para a avaliação fenotípica nos ensaios de adesão e migração, os timócitos foram colocados em microplacas de fundo em “U” e incubados durante 20 minutos a 4°C com uma mistura de anti-CD4-FITC e anti-CD8-Cy mAbs, sendo que em alguns experimentos foram utilizadas as misturas anti-CD4-PE e anti-CD8-Cy, diluídos adequadamente em PBS. Para avaliar a expressão das integrinas na superfície das células endoteliais tratadas, ou não com GH na concentração de 20ng/mL por 8 horas, foram incubadas durante 20 minutos a 4°C com CD49d (VLA-4) FITC ou CD49e (VLA-5) PE ou anti-CD49f (VLA-6) PE, diluídos adequadamente em PBS.

Após a lavagem, as células foram recolhidas e fixadas em solução de PBS-azida sódica 0,05% contendo 1% de formaldeído, em volume final de 200 µl por amostra, sendo posteriormente analisadas por citometria de fluxo no aparelho FACScalibur (Becton & Dickinson, CA, USA) equipado com programa CellQuest.

Aproximadamente 10.000 células foram obtidas por amostra e as análises processadas no *software* WinMid versão 2.8. As células foram selecionadas a partir dos parâmetros de tamanho x granulosidade já determinados para os tímócitos e para as células endoteliais.

3.11 Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t de Student, e o teste *one-way* ANOVA . Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o *software* GradPad Prism vs 3.00. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do GH na proliferação e morfologia de células endoteliais tímicas

Em um primeiro grupo de experimentos, avaliamos a influência do GH, em diferentes concentrações, na proliferação e morfologia das células endoteliais tímicas. Detectamos um discreto aumento no número de células após tratamento nas concentrações de 2 ng/mL e 200 ng/mL quando comparadas as células não tratadas com GH (controle), isso ocorreu tanto após 8 horas como após 24 horas de tratamento. No entanto, tais diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 4A e 4B).

Quando analisamos, o número de células tEnd.1 após elas terem sido submetidas a 8 horas ou 24 horas de tratamento na concentração de 20 ng/mL, nos tempos estudados, apresentaram um aumento estatisticamente significativo, quando comparado ao número de células das culturas não tratadas com GH (Figura 4A e 4B).

Ocorrida a modulação pelo GH na proliferação das células tEnd.1, avaliamos, em seguida, se a morfologia das células apresentavam alterações quando submetidas ao tratamento na concentração de 20 ng/mL. Observamos, através da microscopia de contraste de fase e microscopia óptica, que as células tratadas com GH, apresentavam-se vacuoladas, além de serem evidenciadas ramificações citoplasmáticas quando comparadas às células não tratadas (Figura 5).

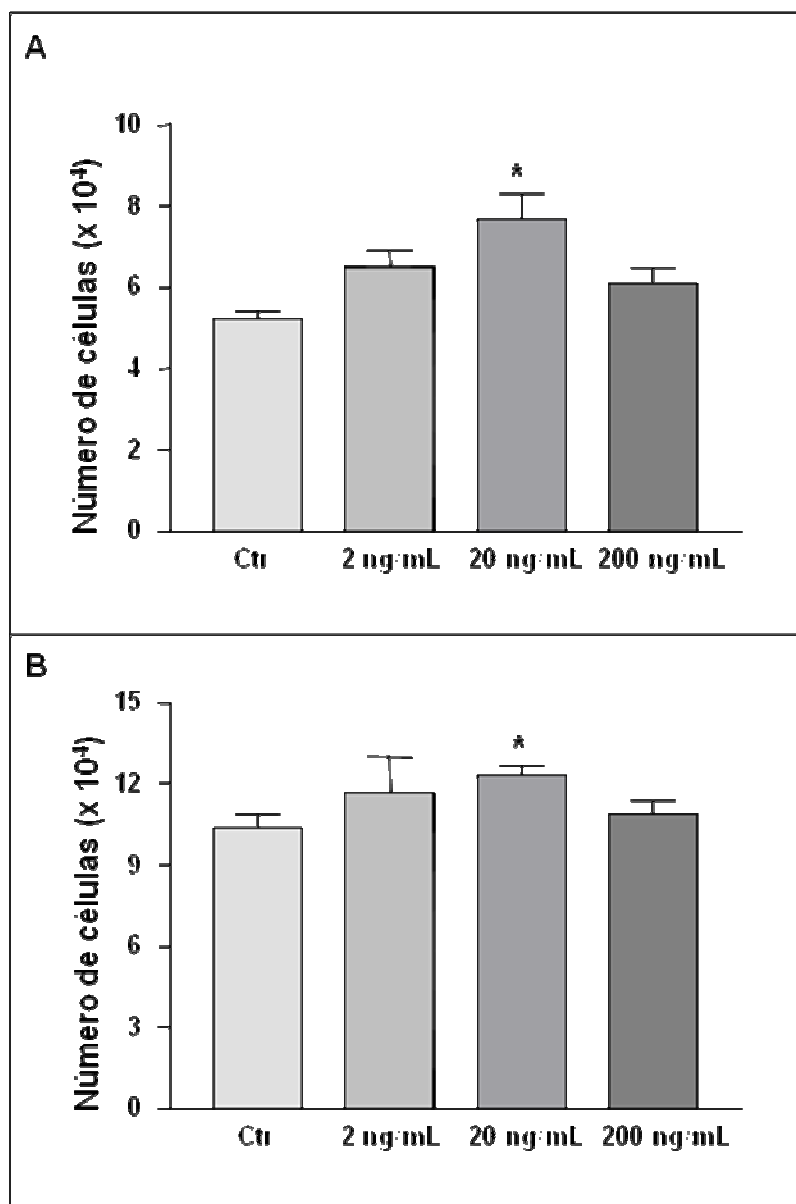


Figura 4. Efeitos do GH na proliferação das células da linhagem tEnd.1. Em **A**, observa-se o número de células endoteliais tímicas após 8 horas de tratamento nas diferentes concentrações e, em **B**, após 24 horas de tratamento. As barras representam médias com correspondente erro padrão, sendo $n=9$. A análise estatística foi feita através do teste *one-way* ANOVA. * $p<0,05$ em relação ao controle.

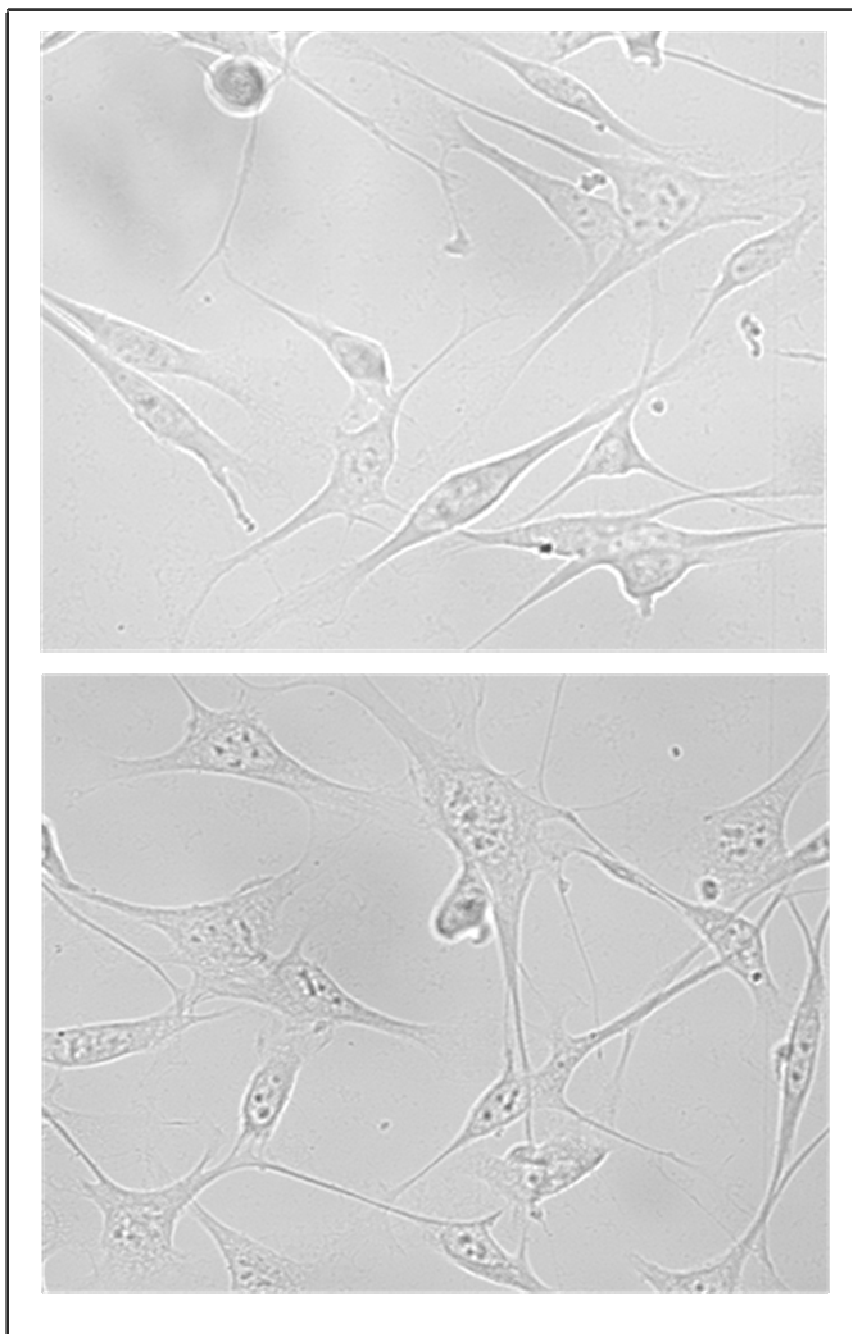


Figura 5. Efeitos do GH na morfologia das células tEnd.1. O painel superior, mostra células não submetidas ao tratamento, no painel inferior as células foram submetidas ao tratamento por 24 horas com GH na concentração de 20 ng/mL, onde se observa, por microscopia de contraste de fase, alterações na morfologia das células tratadas. Aumento 400X.

4.2 Efeitos do GH sobre a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular por células endoteliais tímicas

Considerando a modulação positiva na proliferação de células endoteliais pelo GH e, por ser estatisticamente significativa, na concentração de 20 ng/mL, procuramos avaliar se a produção de moléculas de ECM também estaria modificada. Para tal, realizamos ensaios imunocitoquímicos utilizando marcadores específicos para laminina e fibronectina.

Nossos resultados mostraram que o GH, na concentração de 20 ng/mL por 24 horas, foi capaz de induzir a um aumento na produção das glicoproteínas laminina (Figura 6) e fibronectina (Figura 7), pelas células endoteliais tEnd.1, em relação ao controle, como demonstrado pela densidade da fluorescência analisada em microscópio confocal.

Tendo em vista os efeitos do GH, relatados acima, sobre as tEnd.1, procuramos determinar se este hormônio poderia, também, apresentar efeitos sobre a expressão de receptores de ECM. Vimos que o GH foi capaz de aumentar a expressão de receptores para fibronectina, VLA-4 e VLA-5, na superfície das células tEnd.1 após tratamento por 8 horas na concentração de 20 ng/mL. O mesmo efeito não foi observado na expressão do receptor para laminina e para a integrina VLA-6, em relação ao controle, como demonstrado pela análise citofluorimétrica (Figura 8).

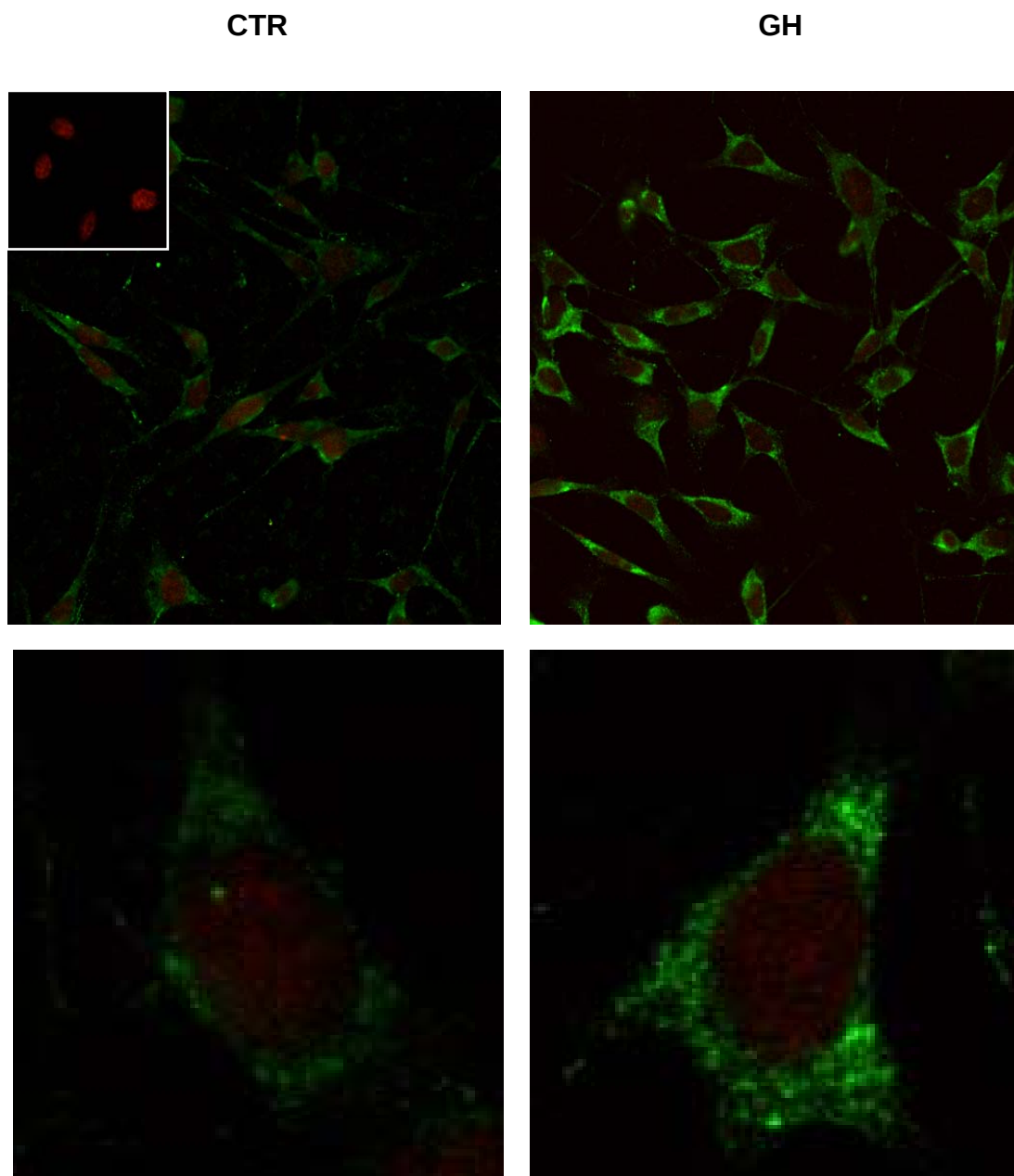


Figura 6. Ação do GH na produção de laminina por células endoteliais tímicas. As células foram cultivadas, na ausência (Ctr) ou presença do GH, na concentração de 20 ng/mL por 24 horas. Detecção feita por imunofluorescência com anticorpo específico, representado na micrografia pela fluorescência verde. Os resultados foram confirmados em três experimentos. Painel superior (200X); painel inferior (1000X). O Inserto no painel superior representa o controle negativo.

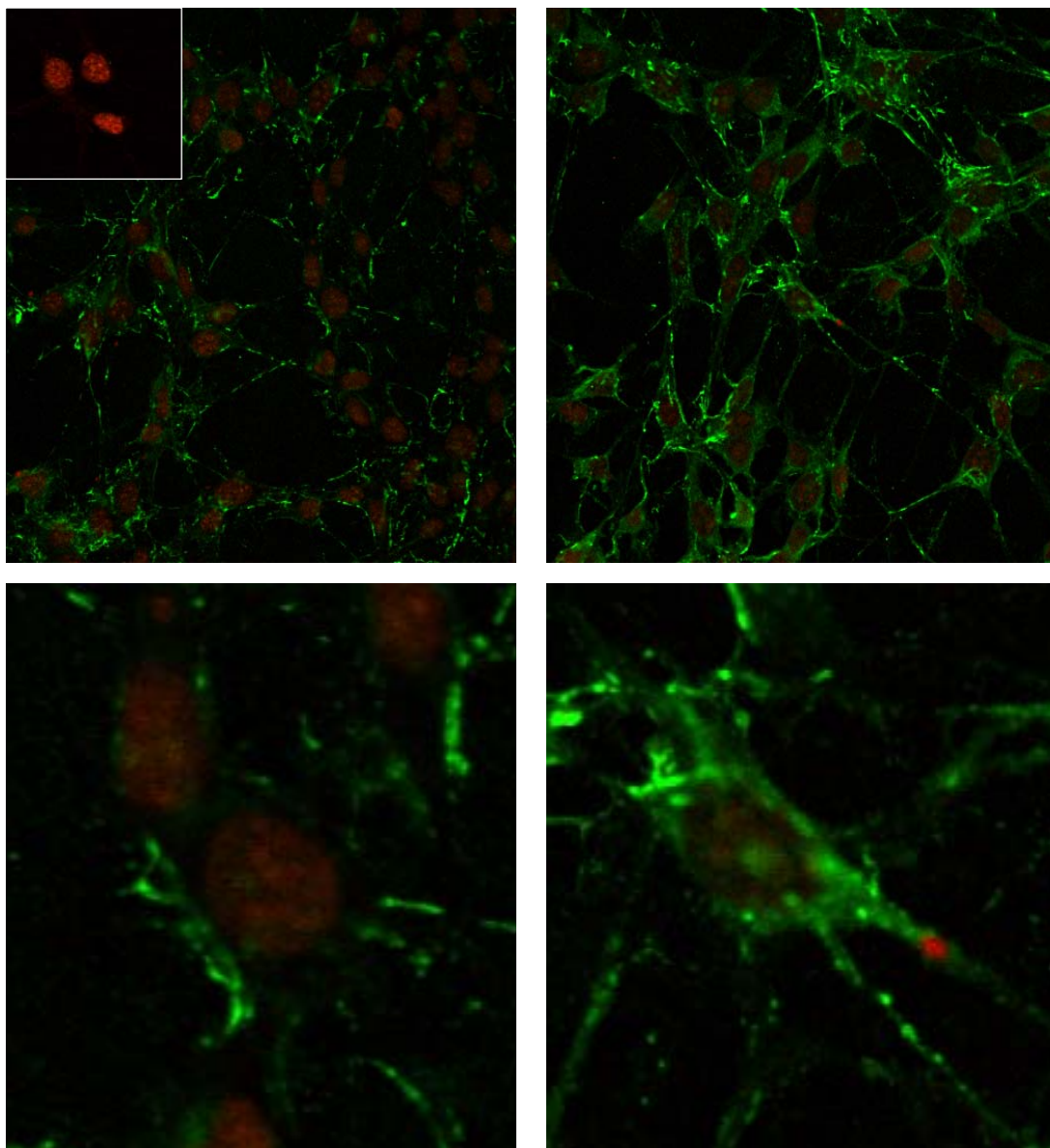


Figura 7. Ação do GH na produção de fibronectina por células endoteliais tímicas. As células foram cultivadas, na ausência (Ctr) ou presença do GH, na concentração de 20 ng/mL por 24 horas. Detecção feita por imunofluorescência com anticorpo específico, representado na micrografia pela fluorescência verde. Os resultados foram confirmados em três experimentos. Painel superior (200X); painel inferior (1000X). O Inserto no painel superior representa o controle negativo.

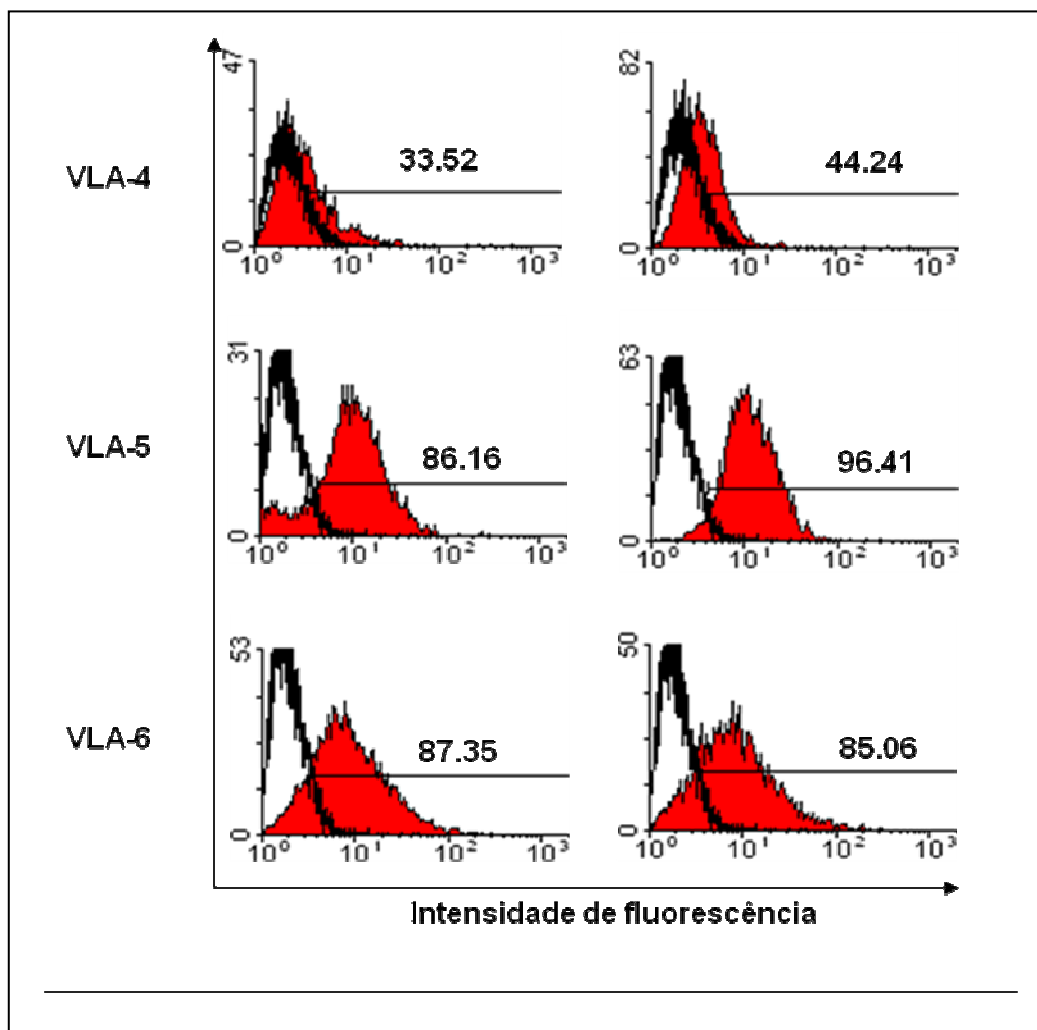


Figura 8. Expressão de receptores de ECM em tEnd.1. O painel mostra, por citofluorimetria, a detecção de VLA-4 e VLA-5, receptores para fibronectina, e VLA-6, receptor para laminina, na superfície das tEnd.1. As células endoteliais foram cultivadas, na ausência (Ctr) ou na presença de GH, na concentração de 20 ng/mL por 8 horas. O traço citofluorimétrico, em preto, representa a marcação obtida com imunoglobulinas não-relacionadas. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

4.3 Adesão de timócitos às tEnd.1 previamente tratadas com GH

Como havíamos verificado em tEnd.1 que o GH aumenta a expressão de ligantes e receptores de ECM, procuramos verificar se esse hormônio poderia estar envolvido em processos intratímicos modulados por ECM.

O GH, na concentração de 20 ng/mL, num período de 8 horas, induziu a um aumento da adesão tEnd.1/timócitos conforme apresentado por percentagem do IA entre esses dois tipos celulares (Figura 9). Este aumento também foi verificado pela contagem do número total de timócitos aderidos às tEnd.1 previamente tratadas com GH (Figura 10A).

Quando analisamos os timócitos aderidos às tEnd.1 após um hora de co-cultura, através da citofluorimetria, verificamos que o fenótipo CD4/CD8 permaneceu similar nos timócitos aderidos às tEnd.1, quando comparamos os grupos tratados com GH, na concentração de 20 ng/mL por 8 horas, com os não-tratados (Figura 10B).

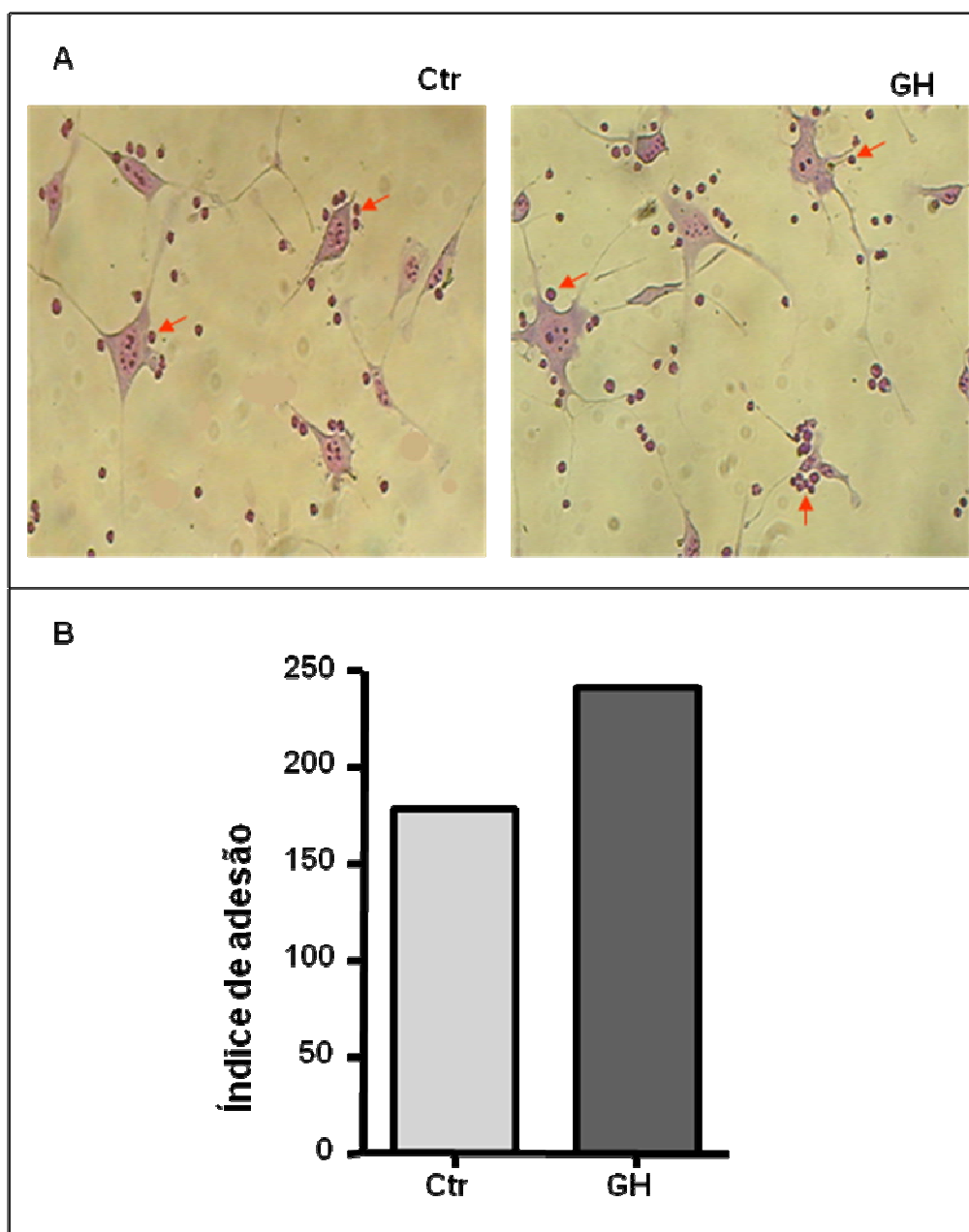


Figura 9. Efeito do GH sobre a adesão dos timócitos à linhagem de células endoteliais. Após 8 horas de tratamento das tEnd.1 com este hormônio, na concentração de 20 ng/mL, houve um aumento na adesão. O painel superior, mostra a fotomicrografia de células endoteliais co-cultivadas com timócitos, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. No painel inferior, os resultados estão expressos como índice de adesão. Estes dados representam a média de três experimentos independentes. As setas indicam timócitos ligados as tEnd.1. Painel superior (100X).

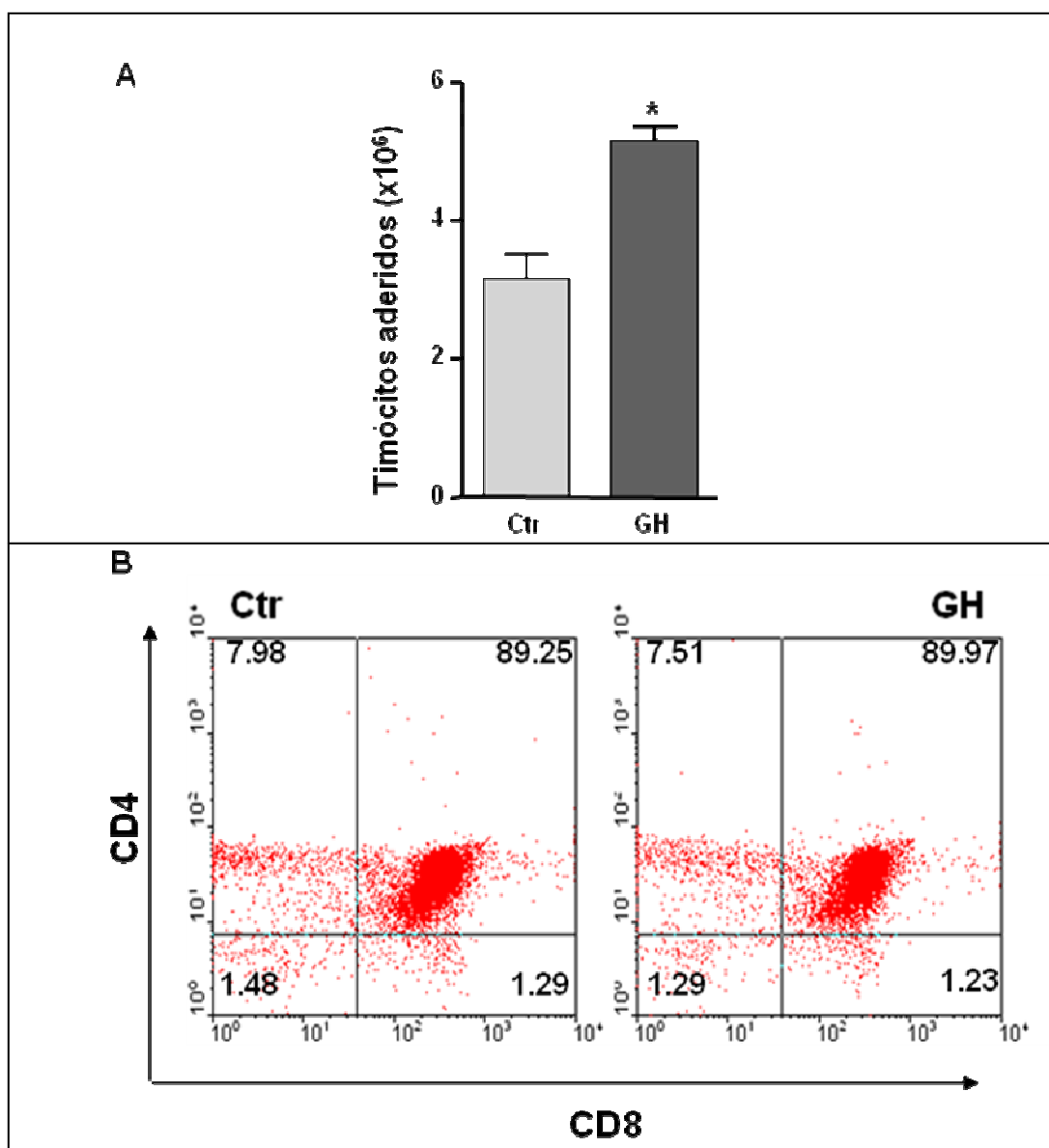


Figura 10. Efeitos do GH sobre os timócitos aderidos. As células tEnd.1 foram tratadas ou não com GH na concentração de 20 ng/mL por 8h. O painel A, mostra o número total de timócitos aderidos às tEnd.1. No painel B, a citofluorimetria mostra que a percentagem das subpopulações de timócitos aderidos às tEnd.1, definidos pela expressão das moléculas CD4/CD8, não foi modulada pelo GH. Perfil representativo de quatro experimentos independentes. As barras representam a média $\pm$ erro padrão, sendo $n=4$. A análise estatística foi feita através do teste t. * $p<0,05$

4.4 Efeitos do GH na migração transendotelial

Considerando-se que o GH modula positivamente ligantes e receptores de ECM nas células tEnd.1, e que ensaios de adesão de timócitos co-cultivados com tEnd.1 sofreram influência desse hormônio, fenômenos importantes para a migração celular, decidimos estudar os efeitos do GH sobre a migração transendotelial de timócitos.

Para isso, foi utilizado o sistema de *transwell*, onde foram empregados insertos com membranas de 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 μm , nos quais verificamos que a migração, quando desenvolvida por 18 horas, em insertos contendo monocamada de células tEnd.1 tratadas previamente por 8 horas com GH na concentração de 20 ng/mL, diminuiu significativamente o número de timócitos migrantes quando comparado ao controle (Figura 11A). Ao analisarmos, por citofluorimetria, o fenótipo CD4/CD8 das células migrantes, observamos que a modulação negativa ocorreu principalmente nas células de fenótipo CD4⁺CD8⁺ (Figura 11B).

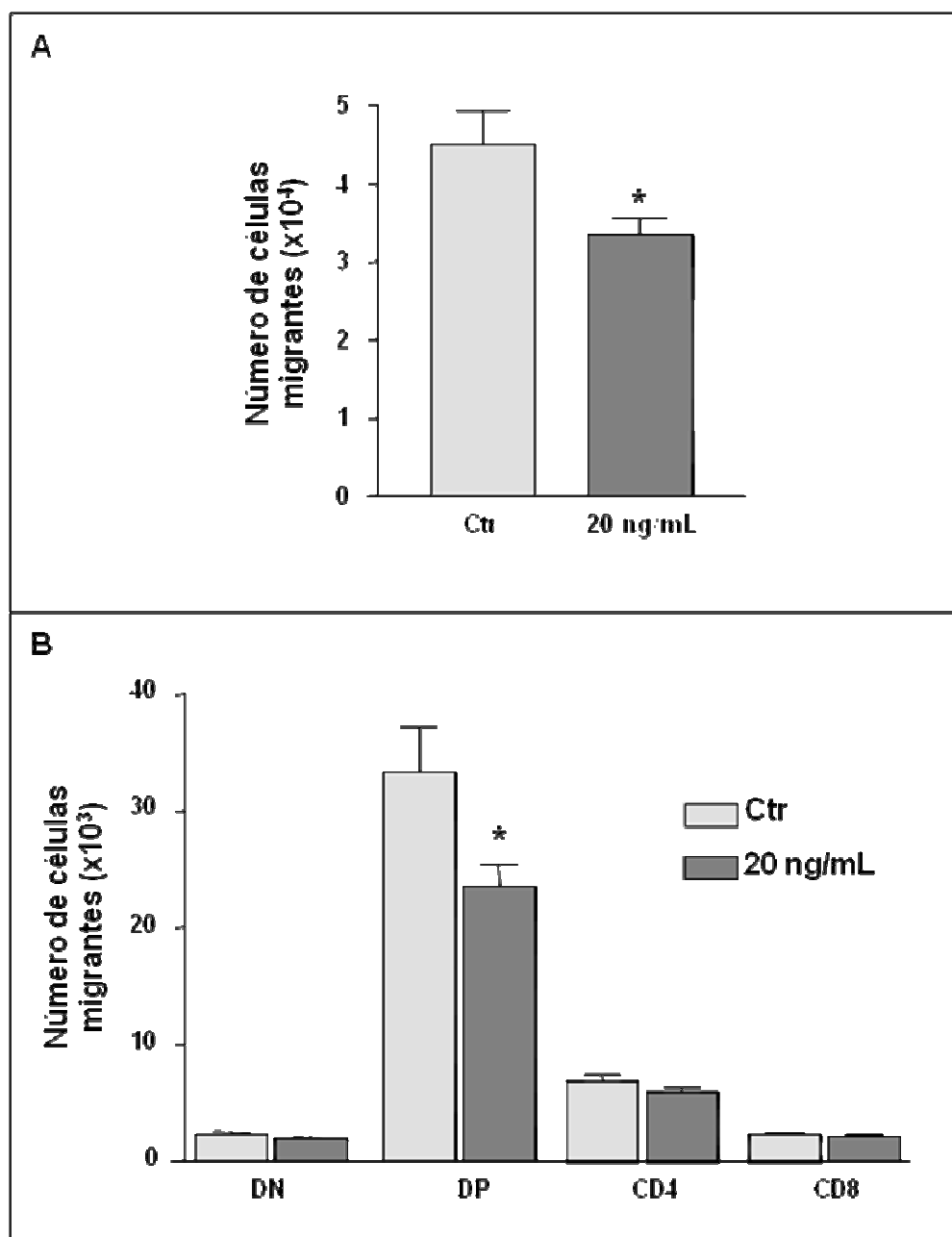


Figura 11. Ação do GH na migração transendotelial de timócitos. As células da linhagem tEnd.1 foram tratadas com este hormônio, na concentração de 20 ng/mL, por 8 horas. O painel A, mostra o número total de timócitos migrantes. No painel B, está representado o número absoluto das subpopulações CD4/CD8. As barras representam médias com correspondente erro padrão, sendo $n=10$. A análise estatística foi feita através do teste *t*. * $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em nosso trabalho, tivemos como objetivo estudar os efeitos de um hormônio hipofisário, o GH, sobre as células endoteliais de um órgão primário do sistema imune, o timo. O GH é secretado pelas células somatotróficas da adenohipófise e suas ações clássicas estão relacionadas à síntese de proteínas, proliferação e diferenciação celular e, conseqüentemente, pelo crescimento tecidual.

Influenciados por trabalhos anteriores, os quais demonstraram efeitos do GH sobre vários aspectos morfológicos e funcionais do timo (LI *et al.*, 1992; MURPHY *et al.*, 1992; TAUB *et al.*, 1994; de MELLO COELHO *et al.*, 1997; SAVINO *et al.*, 2002b; SMANIOTTO *et al.*, 2005), já descritos na introdução deste trabalho, interessamo-nos em estudar a ação desse hormônio sobre células endoteliais tímicas, as quais estão envolvidas nos processos de entrada de células pré-T oriundas da medula óssea e na saída de linfócitos T maduros.

Efeitos do GH sobre células endoteliais foram observados quando Silha *et al.* (2005) demonstraram o envolvimento deste hormônio na função endotelial, principalmente no que se refere à produção de moduladores do crescimento tecidual, fatores de crescimento angiogênico e mudanças na morfologia dos vasos sangüíneos. Sonntag *et al.* (1997) demonstraram que a injeção de GH estimula o crescimento de vasos sangüíneos no córtex cerebral de ratos velhos quando comparados aos animais não tratados. Corbacho *et al.* (2002) mostraram que o GH pode estimular ou inibir vários estágios da formação ou remodelação de novos vasos sangüíneos, incluindo a proliferação de células endoteliais, migração celular, produção de proteases e apoptose.

Inicialmente, verificamos que o GH foi capaz de aumentar significativamente o número de células endoteliais tímicas (tEnd.1) após tratamento por 8 horas ou por

24 horas, na concentração de 20 ng/mL, quando comparamos com as células não tratadas (controle). Isto sugere que o GH atue estimulando a proliferação e/ou apresente um efeito anti-apoptótico nestas células. Mitsunaka *et al.* (2001), demonstraram o papel do GH como um agente anti-apoptótico em linhagens de células T humanas. Dados similares foram descritos por Rymaszewski *et al.* (1991), quando afirmaram que o GH aumenta, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais da retina humana, demonstrando assim uma ação desse hormônio na biologia de células endoteliais. Ainda, foi demonstrado que o antagonista do hormônio liberador do hormônio do crescimento (MZ-4-71), inibe a secreção de VEGF e a proliferação de células endoteliais murinas (SIEJKA *et al.*, 2003).

Para Timsit *et al.* (1992), o GH melhora consistentemente a proliferação *in vitro* de TEC humanas, efeito que foi confirmado utilizando-se linhagens de TEC derivadas de rato (TSUJI *et al.*, 1997). Curiosamente, a somatostatina, o inibidor da liberação de GH, bloqueia significativamente a proliferação de culturas de TEC humanas (FERONE *et al.*, 1999). Efeitos proliferativos também foram observados em timócitos de camundongos transgênicos para o GH (SMANIOTTO *et al.*, 2005).

Tendo em vista a modulação do GH na proliferação das células endoteliais, avaliamos, em seguida, a ocorrência, ou não, de alterações na morfologia destas células, sob as mesmas condições utilizadas na proliferação. Observamos, através da microscopia de contraste de fase, que as células tratadas com GH apresentaram-se vacuoladas e com prolongamentos citoplasmáticos evidenciados quando comparadas ao controle, o que pode sugerir que o GH possa estar atuando na ativação destas células. Entretanto, estudos futuros sobre o efeito do GH na ativação de tEnd.1 serão necessários para verificar se tal hipótese se confirma ou não.

A fim de estudarmos os efeitos do GH sobre a interação tEnd.1/timócitos, verificamos a influência desse hormônio na expressão de ligantes e receptores de ECM pelas células endoteliais. Vimos assim que o GH, na concentração de 20 ng/mL por 24 horas, intensificou a produção das glicoproteínas adesivas, fibronectina e laminina, por estas células. Observamos, também, que o GH foi capaz de aumentar a expressão de receptores para fibronectina (VLA-4 e VLA-5) na superfície das tEnd.1 após tratamento por 8h na concentração de 20 ng/mL. O mesmo efeito não foi observado na expressão do receptor para laminina (VLA-6).

Neste contexto, Savino *et al.* (2000; 2002a) demonstraram que a laminina e a fibronectina, no timo, são produzidas por TEC, células fagocitárias do retículo tímico e fibroblastos. Por outro lado, células do microambiente tímico e timócitos expressam receptores para laminina (VLA-3 e VLA-6), bem como receptores para fibronectina (VLA-4 e VLA-5). Em humanos, foi evidenciado que timócitos mais imaturos usam VLA-4 para aderir e migrar sobre fibronectina, enquanto que células maduras aparentemente usam VLA-4 e VLA-5 para migrar (SALOMON *et al.*, 1994; CRISA *et al.*, 1996; DALMAU *et al.*, 1999). Culturas de TEC tratadas com GH aumentam a produção de laminina e fibronectina, bem como seus correspondentes receptores VLA-5 e VLA-6 (de MELLO-COELHO *et al.*, 1997). Ainda, o GH induziu o aumento de laminina e de seu receptor VLA-6 no microambiente tímico de camundongos transgênicos (SMANIOTTO *et al.*, 2005).

Vale dizer que ligantes e receptores de matriz extracelular são importantes para os processos de adesão e migração de timócitos. Lannes *et al.* (1993) e Villa-Verde *et al.* (1994) mostraram, anteriormente, que a adesão de timócitos em culturas de TEC é reforçada pela presença de componentes de ECM, enquanto anticorpos

contra estas moléculas, ou seus respectivos receptores, promovem um efeito oposto.

Em nossos resultados, também observamos que o GH induziu o aumento na adesão de timócitos às tEnd.1 tratadas por 8 horas com esse hormônio. Entretanto, ao analisarmos os timócitos aderidos às tEnd.1, através da citofluorimetria, observamos que o fenótipo CD4/CD8 permaneceu similar nos timócitos aderidos as tEnd.1, quando comparamos os grupos tratados com GH aos não-tratados. Somando esses dados de adesão, ao fato de que este hormônio modula positivamente a expressão de ligantes e receptores de ECM por tEnd.1, não é surpreendente pensar que, pelo menos, um mecanismo de atuação do GH nesse processo envolvam tais moléculas. Foi demonstrado por de Mello-Coelho *et al.* (1997; 2002) que o GH, assim como o IGF-1, foram capazes de aumentar a adesão TEC/timócitos, e que anticorpos específicos para GH, IGF-1 ou seus receptores inibiram tais efeitos. Estudos realizados *in vitro* mostraram que o GH humano aumentou a ligação de linfócitos humanos CD4⁺ e CD8⁺, ativados ou em repouso, as moléculas ICAM-1, VCAM-1, fibronectina e colágeno tipo IV (TAUB *et al.*, 1994).

Sabendo-se que os ligantes e receptores de ECM são importantes para a migração celular, é possível imaginar que este hormônio fosse capaz de atuar na migração. Os resultados revelaram que a migração transendotelial, quando desenvolvida em insertos contendo tEnd.1 tratadas previamente com GH, diminuiu significativamente o número de timócitos migrantes quando comparados ao controle. Ao analisarmos, através de citofluorimetria, o fenótipo CD4/CD8 das células migrantes, observamos que a modulação negativa ocorreu, principalmente, nas células de fenótipo CD4⁺CD8⁺. Esse resultado nos leva a sugerir que o aumento na produção de laminina e fibronectina pelas tEnd.1 e o aumento da expressão dos

receptores VLA4 e VLA5 na superfície das células, tenham dificultado a migração transendotelial dos timócitos. É conhecido que as metaloproteinases estão envolvidas em interações intratímicas mediadas por ECM e são produzidas por timócitos humanos (SAVINO *et al.*, 2003). No entanto, futuras investigações serão necessárias para o entendimento dos efeitos do GH e as moléculas envolvidas nos fenômenos da migração transendotelial.

Wiedermann *et al.* (1991) foram os primeiros a demonstrar que GH poderia estar envolvido em processos de migração de leucócitos polimorfonucleares. Neste estudo de migração, realizado em câmara de Boyden, o GH não estimulou a locomoção de leucócitos humanos quando adicionado diretamente sobre as células. Os autores explicam que esta inibição da migração é devido a de-adesão dos leucócitos polimorfonucleares a superfície artificial e sugere que o GH possa modular a adesão destas células via moléculas de adesão.

Num sistema completamente distinto, o GH mostrou-se *in vivo* capaz de influenciar a migração de timócitos murinos de camundongos singênicos para o timo de camundongos SCID, os quais são deficientes de células T maduras (MURPHY *et al.*, 1992). O mesmo grupo demonstrou que células T de sangue periférico humano migravam para o timo de camundongos SCID somente se fossem pré-tratadas com GH e essa migração poderia ser inibida por anticorpos específicos para a cadeia $\beta 1$ das integrinas (TAUB *et al.*, 1994). Além disso, o GH humano atua sobre células T *in vivo* fortalecendo a hipótese de que esse hormônio possa aumentar a aderência de células mononucleadas ao endotélio e, conseqüentemente, a migração para os tecidos linfóides (MURPHY *et al.*, 1992).

Timócitos obtidos de camundongos transgênicos para o gene de GH, apresentam *ex-vivo* migração aumentada em câmaras de *transwell* pré-tratadas com

laminina e também frente a quimiocina CXCL12 (SMANIOTTO *et al.*, 2005). Verificou-se que o GH modulou, *in vivo*, a saída de timócitos, com aumento significativo de células T CD4⁺CD8⁻ nos linfonodos (SMANIOTTO *et al.*, 2004).

É importante salientar que células T CD4⁺ recém emigrantes do timo aumentam significativamente em pacientes infectados com HIV-1 quando tratados com GH (NAPOLITANO *et al.*, 2002). Também foi mostrado que a entrada no timo de progenitores derivados da medula óssea, são parcialmente mediados por VCAM-1/VLA-4 (SCIMONE *et al.*, 2006).

Em conclusão, o conjunto de dados apresentados neste trabalho, reforça a hipótese de que o GH exerce efeitos sobre as células endoteliais. Neste estudo, demonstrado *in vitro*, utilizando linhagem de células endoteliais tímicas (tEND.1), o GH foi capaz de aumentar a proliferação; atuar sobre a morfologia das células; aumentar a expressão de ligantes e receptores de ECM, determinando uma modulação positiva de adesão tEnd.1/timócitos e, conseqüentemente, nos levam a sugerir que estes fatores possam ter contribuído para a diminuição do número de timócitos migrantes (Figura 12).

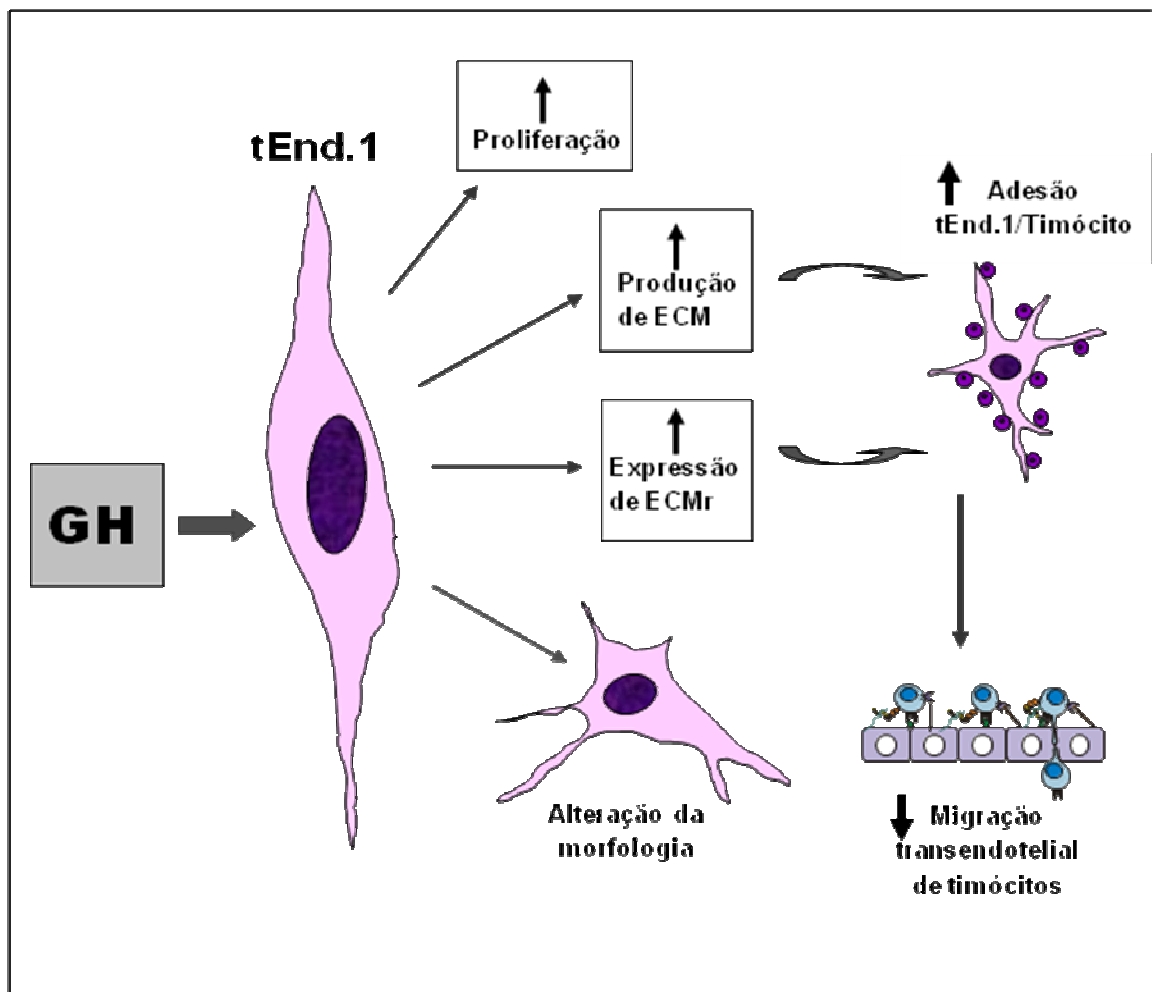


Figura 12. Representação esquemática da influência do GH sobre as células endoteliais tímicas *in vitro*. O GH é capaz de aumentar a proliferação e alterar a morfologia das células; aumentar a produção de ligantes de ECM e a expressão dos seus receptores, o que leva um aumento da adesão de timócitos às tEnd.1. Efeito oposto é observado na migração transendotelial, onde ocorre diminuição no número de timócitos migrantes.

6 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev* 1:31-40. 2001.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, P.; COSMI, L.; LAZZERI, E.; ROMAGNANI, S. Chemokines and lymphopoiesis in the thymus. *Trends Immunol* 22: 277-281. 2001.
- BAN, E.; GAGNERAULT, M. C ; JAMMES, H.; POSTEL-VINAY, M. C.; HAOUR, F.; DARDENNE, M. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci* 48: 2141-2148. 1991.
- BANKS, J. W. Sistema linfático e imunitário. In: _____. *Histologia veterinária aplicada*. 2. ed. São Paulo: Editora Manole, 370-390. 1991.
- BECHARD, D.; SCHERPEREEL, A.; HAMMAD. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD1a/CD18(LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J immunol* 167: 3099-3106. 2001.
- BENOIT, C., MATHIS, D. T-lymphocyte differentiation and biology. In Paul W. *Fundamental immunology*. 4th ed. Lippincott-Revan Publ. Philadelphia, p. 367-409. 1999.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REI, A. Cytokines as mediators of central and peripheral immune-neuroendocrine interactions. In. Ader R, Felten DL, Cohen N. (Editors) *Psychoneuroimmunology* 3rd Ed. Academic Press, San Diego, Ca. Volume 1 pp 1-17. 2001.
- BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Philos Trans R Soc Lond* 239B:357-412. 1956.

- BOEHM, T.; BLEUL, C. C. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol* 27: 477-484. 2006.
- BOGER, R. H.; SKAMIRA, C.; BODEBOGER, S. M.; BRABANT, G.; VON-ZUR-MUHLEN, A.; FROLICH, J. C. Nitric oxide may mediate the hemodynamic effects of recombinant growth hormone in patients with acquired growth hormone deficiency. A double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Invest* 98: 2706-2713. 1996.
- BOYD, R. L.; TUCEK, C. L.; GODFREY, D. I.; IZON, D.J.; WILSON, T. J.; DAVIDSON, N. J.; BEAN, A. G. D.; LADYMAN, H. M.; RITTER, M. A.; HUGO, P. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 14: 445-459. 1993.
- CARNEY, R. M.; FREEDLAND, K. E. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol Psychiatry* 54: 241-247. 2003.
- CHAFFIN, K. E.; PERLMUTTER, R. M. A pertussis toxin-sensitive process controls thymocyte emigration. *Eur J Immunol* 10: 2565-2573. 1991.
- CORBACHO, A. M.; MARTÍNEZ, DE-LA-ESCALERA, G.; CLAPP, C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 173: 219-238. 2002.
- CRISA, I., CIRULLI, V., ELLISMAN, M. H., ISHII, J.K., ELICES, M. J., AND SALOMON, D. R. Cell development: the roles of fibronectina, VLA-4 and VLA-5. *J Exp Med* 184: 215-228. 1996.
- 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: 974-990. 1999.

- DARDENNE, M.; MELLO-COELHO, V.; GAGNERAULT, M. C.; POSTEL-VINAY, M. C. Growth hormone receptors and immunocompetent cells. *Ann N Y Acad Sci* 840: 510-517. 1998.
- de MELLO-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: 39-49. 1997.
- de MELLO COELHO, V.; SAVINO, W.; POSTEL-VINAY, M. C.; DARDENNE, M. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 139: 3837-3842. 1998.
- de MELLO-COELHO, V.; VILLA-VERDE, D. M. S.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; BRITO, J. M.; DARDENNE, M.; BRITO, J. M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Functional insulin-like growth factor-1/insulin-like growth factor-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. *Neuroendocrinology* 75: 139-150. 2002.
- DIDIO, J. A. Sistema endócrino. In: _____. *Tratado de anatomia sistêmica aplicada*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2: 583-603. 2002.
- DOMINIK, B.; GANZ, P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 90: 40-48. 2002.
- EDWARDS, C. K. 3RD; YUNGER, L. M.; LORENCE, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. The pituitary gland is required for protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2274-2277. 1991.
- ESKANDARI, F.; WEBSTER, J. I.; STERNBERG, E. M. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5: 251-265. 2003.

- FABRIS, N.; PIERPAOLI, W.; SORKIN, E. Hormones and the immunological capacity. IV. Restorative effects of developmental hormone or of lymphocytes on the immunodeficiency syndrome of the dwarf mouse. *Clin Exp Immunol* 9: 227-240. 1971.
- FAUSTO N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39: 1477-1487. 2004.
- FENSTERMACHER, J.; GROSS, P.; SPOSITO, N. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann of New York Acad of Science* 529: 21-30. 1988.
- FERONE, D.; VAN-HAGEN, P. M.; COLAO, A.; ANNUNZIATO, L.; LAMBERTS, S. W.; HOFLAND, L. J. Somatostatin receptors in the thymus. *Ann Med* 2: 28-33. 1999.
- FISHMAN, P. H. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol* 69: 85-97. 1982.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6: 273-286. 2007.
- FRYSTYK, J. et al. Cardiovascular disease and insulin-like growth factor I. *Circulation* 106:893-895. 2002.
- FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. V. B. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376. 1980.
- GAGNERAULT, M. C.; POSTEL-VINAY, M. C.; DARDENNE, M. Expression of growth hormone receptors in murine lymphoid cells analyzed by flow cytometry. *Endocrinology* 137: 1719-1726. 1996.

- GIBNEY, J.; JOHANSSON, G. Long-term monitoring of insulin-like growth factor I in adult growth hormone deficiency: a critical appraisal. *Horm Res* 62: 66-72. 2004.
- GILL, J.; MALIN, M.; SUTHERLAND, J.; GRAY, D.; HOLLANDER, G.; BOYD, R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 195: 28-50. 2003.
- GORDON, J.; WILSON, V. A.; BLAIR, N. F.; SHERIDAN, J.; FARLEY, A.; WILSON, L.; MANLEY, N. R.; BLACKBURN, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol* 5: 546-553, 2004.
- GOWANS I.L., GESNER, B.M., MCGREGOR, D.D. The immunological activities of lymphocytes. In: Wolstenholme G.E.W., O'Connor M., eds *Biological activity of leucocyte*. CIBA Foundation Study Group. London: Churchill; 32-34. 1961.
- HAMET, P.; TREMBLAY, J. Genetic determinants of the stress response in cardiovascular disease. *Metabolism* 51: 25-30. 2002.
- HARE, K. J., JENKINSON, E. J., ANDERSON, G. CD69 expression discriminates MHC-dependent and independent stages of thymocyte positive selection. *J Immunol* 162: 3978-3983. 1999.
- HATTORI, N.; SAITO, T.; YAGYU, T.; JIANG, B. H.; KITAGAWA, K.; INAGAKI, C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cell, B cell, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4284-4291. 2001.
- 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.

- INOUE, T., *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factor augment bactericidal capacity of human polymorphonuclear neutrophils. *Shock* 10: 278-284. 1998.
- IOANIȚIU, D.; BARTOC, R.; ISPAS, I.; AUGUSTIN, M.; DIMITRIU, V.; POPOVICI, D.; DINULESCU, E.; MARINESCU, I.; MARINESCU, L.; GIURCĂNEANU, M.; MAZILU, M. The dyslipemic syndrome in acromegaly. *Endocrinologie* 20: 25-36. 1982.
- ISAKSSON, O. G.; OHLSSON, C.; NILSSON, A.; ISGAARD, J. LINDAHL, A. Regulation of cartilage growth hormone and insulin-like growth factor I. *Pediatr Nephrol* 4: 451-453. Review. 1991.
- ITOI, M.; KAWAMOTO, H.; KATSURA, Y.; AMAGAI, T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int Immunol* 13: 1203-1211. 2001.
- JULIANO, R. L.; HASKILL, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120: 577-85. 1993.
- JUUL, A.; SCHEIKE, T.; DAVIDSEN, M.; GYLLENBORG, J.; JORGENSEN, T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation* 106: 939-944. 2002.
- KASUYA, H.; WEIR, B. K.; SHEN, Y. J.; TREDGET, E. E.; GHAHARY, A. Insulin-like growth factor-1 in the arterial wall after exposure to periarterial blood. *Neurosurgery* 35: 99-105. 1994.
- KATO, S. Thymic microvascular system. *Microsc Res tech* 38: 287-299. 1997.
- KELLEY, K. W.; BRIEF, S.; WESTLY, H. J. NOVAKOFSKI, T.; BECHTEL, P. J.; SIMON, J.; WALKER, E. B. GH3 pituitary adenoma cells can reverse thymic aging in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5663-5667. 1986.

- KELLY, P.; ALI, S.; ROZAKIS, M.; GOUJON, L.; NAGANO, M.; PELLEGRINI, I.; GOULD, D.; DJIANE, J.; EDERY, M.; FINEDORI, J. The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res* 48: 123-164. 1993.
- KIM, C. H.; PELUS, L. M.; WHITE, J. R.; BROXMEYER, H. E. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* 19: 4434-4443. 1998.
- LANNES-VIEIRA, J.; CHAMMAS, R.; VILLA-VERDE, D. M.; VANNIER-DOS-SANTOS, M. A.; MELLO-COELHO, V.; DE SOUZA, S. J.; BRENTANI, 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: 1421-1430. 1993.
- LI, Y. M.; BRUNKE, D. L.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Pituitary epithelial cell implants reverse the accumulation of CD4_CD8_ lymphocytes in thymus glands of aged rats. *Endocrinology* 130: 2703-2711. 1992.
- LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema immune. *Pediatrics* 29: 33-42. 2007.
- LIN, B.; KINOSHITA, Y.; HATO, F.; TSUJI, Y. Enhancement of DNA synthetic activity of thymic lymphocytes by the culture supernatant of thymus epithelial cells stimulated by growth hormone. *Cell Mol Biol* 43: 351-359. 1997.
- LIND, E. F.; PROCKOP, S. E.; PORRIT, H. E.; PETRIE, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194): 127-134. 2001.

- MARQUES-DEAK, A.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry* 10: 239-250. 2005.
- MASUDA, K.; ITOI, M.; AMAGAI, T.; MINATO, N.; KATSURA, Y.; KAWAMOTO, H. Thymic anlage is colonized by progenitors restricted to T, NK, and dendritic cell lineages. *J Immunol* 174: 2525-2532. 2005.
- MICHEL, C. C. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2541-2546. 1998.
- MILLER, J. F. Immunological function of the thymus. *Lancet* 30: 748 -749. 1961.
- MILLER, J. F. The Croonian Lecture. The key role of the thymus in the body's defence strategies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 337: 105-124. 1992.
- MILLER J. F. A. P. The Discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* 185:7-14. 2002
- MILLER, W. L.; BURNETT Jr., J. C. Blood vessel physiology and pathophysiology. In: Conn, D.L. (ed.) - Vasculitic syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 16: 251-260. 1990.
- MITSUNAKA, H.; DOBASHI, H.; SATO, M.; TANAKA, T.; KITANAKA, A.; YAMAOKA, G.; TOKUDA, M.; MATOBA, K.; HIRAISHI, T.; ISHIDA, T. Growth hormone prevents Fas-induced apoptosis in lymphocytes through modulation of Bcl-2 and caspase-3 *Neuroimmunomodulation* 9: 256-262. 2001.
- MOHAMMAD, S. F.; BOS, W. J. W. Physiology of the vessel blood interface. In: Bunt, T.J. (ed.) - Iatrogenic vascular injury. A Discourse and surgical technique. New York, Futura Publishing, p. 1-14, 1990.
- MORGAN, D. M. L. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cell. In: JONE, F. E., ed. Methods in molecular medicine. Human Cell Culture Protocols, p. 101-109, 1998.

- 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 the thymic parenchyma. *Int Immunol* 19: 745-753. 2007.
- MURPHY, L. J.; BELL, G. I.; FRIESEN, H. G. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in adult rat. *Endocrinology* 120: 1279-1284. 1987.
- MURPHY, W. J.; DURUM, S. K.; LONGO, D. L. Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4481-4485. 1992
- NAPOLI, R.; GUARDASOLE, V.; MATARAZZO, M.; PALMIERI, E. A.; OLIVIERO, U.; FAZIO, S. Growth hormone corrects vascular dysfunction in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 3: 90-95. 2002.
- NAPOLITANO, L. A.; LO, J. C.; GOTWAY, M. B.; MULLIGAN, K.; BARBOUR, J. D.; SCHMIDT, D.; GRANT, R. M.; HALVORSEN, R. A.; SCHAMBELAN, M.; MCCUNE, J. M. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* 16: 1103-1111. 2002.
- PAKIANATHAN, D. R. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leukoc Biol*. 57: 699-702. 1995.
- PATEL, D. D.; HAYNES, B. F. Cell adhesion molecules involved in intrathymic T-cell development. *Semin Immunol* 5: 283–292. 1993.
- PATTON, H. D.; FUCHS, A. F.; HILLE, B.; SCHER, A. M.; STEINER, R. Textbook of Physiology: circulation, respiration, body fluids, metabolism, and metabolism – volume 2 WB Saunders Co (ed) New York. 1989.

- PETRIE, H.T. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol Rev* 189: 8-19. 2002.
- PFEIFER, M.; VERHOVEC, R.; ZIZEK, B. Growth hormone (GH) and atherosclerosis: changes in morphology and function of major arteries during GH treatment. *Growth Horm IGF Res* 9: 25-30. 1999.
- PIERPAOLI, W.; SORKIJ, E. Relationship between thymus and hypophysis. *Nature* 215: 834. 1968.
- PLANTE, G. E. Vascular response to stress in health and disease. *Metabolism* 51: 25-30. 2002.
- POSTEL-VINAY, M. C., MELLO-COELHO, V.; GAGNERAULT, M. C.; DARDENNE, M. Growth hormone stimulates the proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinology* 138: 1816-1820. 1997.
- RAMASAWMY, R.; FAÉ, K. C.; SPINA, G.; VICTORA, G. D.; TANAKA, A. C.; PALÁCIOS, S. A.; HOUNIE, A. G.; MIGUEL, E. C.; OSHIRO, S. E.; GOLDBERG, A. C.; KALIL, J.; GUILHERME, L. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever. *Mol Immunol* 44: 1873-1878. 2007.
- RAVIOLA, E. Timo. In: Bloom, W.; FAWCETT, D. *Tratado de histologia*, Rio de Janeiro: Interamericana p. 419-430. 1977.
- RAVIOLA, E.; KARNOVSKY, M. J. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med* 136: 466-98. 1972.
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; VACCA, A. Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity. *Clin Exp Immunol* 144: 371-375. 2006.
- RITTER, M. A.; PALMER, D. B. The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. *Semin Immunol* 11: 13-21.1999.

- ROSEN, T.; BENGTSSON, B. A. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism *Lancet* 336: 285-288. 1990.
- RUSCHITZKA, F. T.; LUSCHER, T. F. Is there a rationale for combining angiotensin-converting enzyme inhibitors and calcium antagonists in cardiovascular disease? *Am Heart J* 134: 31-47. Review. 1997.
- RYMASZEWSKI, Z.; COHEN, R. M.; CHOMCZYNSKI, P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 617-621. 1991.
- SALOMON, D. R. ; MOJCIK, C. F. ; CHANG, A. C. ; WADSWORTH, S.; ADAMS, D. H.; COLIGAN, J. E.; SHEVACH, E. M. Constitutive activation of integrin $\alpha_4\beta_1$ defines a unique stage of human thymocyte development. *J Exp Med* 179: 1573-1584. 1994.
- SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M., LANNES-VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today* 14: 158–161. 1993.
- SAVINO, W. ; DARDENNE, M. Immunoneuroendocrine interactions. *Immunol Today* 7: 318-322. 1995.
- SAVINO, W., DALMAU, S. R., COTTA-DE-ALMEIDA, V. Role of extracellular matrix-mediated interactions in the thymus. *Dev Immunol* 7: 279–291. 2000.
- SAVINO W.; DARDENNE M. Neuroendocrine control of the thymus physiology. *Endocrine Rev* 21: 412-443. 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: 305–313. 2002a.

- SAVINO, W.; POSTEL-VINAY, M. C.; SMANIOTTO, S.; DARDENNE, M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 55: 442-452. 2002b.
- SAVINO, W.; AYRES MARTINS, S.; NEVES-DOS-SANTOS, S.; SMANIOTTO, S.; OCAMPO, J. S.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; TERRA-GRANADO, E.; KUSMENOK, O.; VILLA-VERDE, D. M. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res* 36: 1015-1025. 2003.
- SAVINO, W.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SMANIOTTO, S.; SILVA-MONTEIRO, E.; VILLA-VERDE, D. M. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 75: 951-961. 2004.
- SCOLLAY, R.; GODFREY, D. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunology Today* 16: 268-272. 1995.
- SCIMONE, M. L.; AIFANTIS, I.; APOSTOLOU, I.; VON-BOEHMER, H.; VON-ANDRIAN, U. H. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2: 7006-7011. 2006.
- SESMILO, G.; BILLER, B. M. ; LLEVADOT, J.; HAYDEN, D.; HANSON, G.; RIFAI, N.; KLIBANSKI, A. Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk markers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 133:111-122. 2000.
- SIEJKA, A.; LAWNICKA, H.; KOMOROWSKI, J.; SCHALLY, A. V.; STEPIEŃ, T.; KRUPIŃSKI, R.; STEPIEŃ, H. GH-RH antagonist (MZ-4-71) inhibits VEGF secretion and proliferation of murine endothelial cells. *Life Sci* 72: 2473-2479. 2003.

- SILHA, J. V.; KRSEK, M.; HANA, V.; MAREK, J.; WEISS, V.; JEZKOVA, J.; ROSICKA, M.; JARKOVSKA, Z.; MURPHY L. J. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clin Endocrinol* 63: 79-86. 2005.
- SILVA, F. O. C. Suprimento arterial do timo em gatos sem raça definida. *Bioscience Journal* 17: 61-66. 2001.
- SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. The cardiovascular system. *In*; Weiss, L. Cell and tissue biology. A textbook of histology. 6. ed., Baltimore, Urban & Schwarzenberg, p. 354-400. 1988.
- SMANIOTTO, S.; RIBEIRO-CARVALHO, M. M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W.; MELLO-COELHO, V. Growth hormone stimulates the selective trafficking of thymic CD4_CD8_ emigrants to peripheral lymphoid organs. *NeuroImmunoModulation* 11: 299-306. 2004.
- SMANIOTTO, S.; de MELLO-COELHO, V.; VILLA-VERDE, D. M.; 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: 3005-3017. 2005.
- SONNTAG, W. E.; LYNCH, C. D.; COONEY, P. T.; HUTCHINS, P. M. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 138: 3515-3520. 1997.
- STAEHELIN, L. A.; HELL, B. E. Junctions between living cells. *Sci Am* 238: 141-152. 1976.

- STEIMLE, V.; SIEGRIST, C. A.; MOTTET, A. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265: 106-109. 1994.
- STEIMLE, V.; REITH, W.; MACH, B. Major histocompatibility complex class II deficiency: a disease of gene regulation. *Adv Immunol* 61: 327-340. 1996.
- STOLTZ, J. F.; MULLER, S.; KADI, A.; DECOT, V.; MENU, P.; BENSOUSSAN, D. Introduction to endothelial cell biology. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:5-8. 2007.
- STOUT, R. W. Insulin and atheroma. 20-yr perspective. *Diabetes* 13: 631-637. 1990.
- SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1508-1512. 2002.
- TAKANO, M.; MENESHIAN, A.; SHEIKH, E. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive Oxygen species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2054-H2061. 2002.
- TAUB, D.; TSARFATY, G.; LLOYD, A. R.; DURUM, S. K.; MURPHY, W. J. Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment. *J Clin Invest* 94: 293-300. 1994.
- THOMAS, M.; KERAMIDAS, M.; MONCHAUX, E.; FEIGE, J. J. Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* 61: 247-251. 2003.
- TIMSIT, J.; SAVINO, W.; SAFIEH, B.; CHANSON, P.; GAGNERAULT, M. C.; BACH, J. F.; DARDENNE, M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 183-188. 1992.

- TSUJI, Y.; KINOSHITA, Y.; HATO, F.; LIN, B. Marked differences in proliferative response to stimulation of growth hormone and insulin-like growth factor-I between thymoma- and normal thymus-derived epithelial cell lines. *Cell Mol Biol* 43: 149-56. 1997.
- TSUKAHARA, H.; GORDIENKO, D. V.; TONSHOFF, B.; GELATO, M. C.; GOLIGORSKY, M. S. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int* 45: 598-604. 1994.
- van EWIJK, W.; WANG, B.; HOLLANDER, G.; KAWAMOTO, 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* 11:57-64. 1999.
- van Ewijk, W; HOLLANDER, G.; TERHORST, C.; WANG, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127: 1583-1591. 2000.
- VENTERS H. D.; DANTZER, R.; FREUND, G. G.; BROUSSARD, S. R.; KELLEY, K. K. Growth hormone and insulin-like growth factor as cytokines in the immune system. *In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (EDITORS) Psychoneuroimmunology 3th ed. San Diego: Academic Press, v. 1. p. 339-362. 2001.*
- VILLA-VERDE, D. M.; LAGROTA-CANDIDO, 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: 659-664. 1994.

- VILLA-VERDE, D. M.; SILVA-MONTEIRO, E.; JASIULIONIS, 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: 1434-1444. 2002.
- WALL, R. T.; RUBENSTEIN, M. D.; COOPER, S. L. Studies on the cellular basis of atherosclerosis: the effects of atherosclerosis risk factors on platelets and the vascular endothelium. *Diabetes* 30: 39-43. 1981.
- WEIGENT, D. A.; BLALOCK, J. E. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol* 135:55-65. 1991.
- WELNIAK, L. A., SUN, R., MURPHY, W. J. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J Leukoc Biol* 71: 381-387. 2002.
- WIEDERMANN, C. J.; NIEDERMÜHLBICHLER, M.; GEISSLER, D.; BEIMPOLD, H.; BRAUNSTEINER, H. Priming of normal human neutrophils by recombinant human growth hormone *Br J Haematol* 78:19-22. 1991.
- WOLINS, M. S.; Interaction of oxidants with vascular signaling systems. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 20: 1430-1442. 2000.
- ZHU, T.; GOH, E. L. K. ; GRAICHEN, R. ; LING, L. ; LOBIE, P. E. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13: 599-616. 2001.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance. *P J Clin Invest* 94: 2036-2044. 1994.
- ZIMRIN, A. B.; MACIAG T. Progress toward a unifying hypothesis for angiogenesis. *J Clin Invest* 97: 1359. 1996.