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

O EFEITO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA TRANSMIGRAÇÃO DE TIMÓCITOS *IN VITRO*

ADALBERTO ALVES MARTINS NETO

MACEIÓ - AL
2009

ADALBERTO ALVES MARTINS NETO

O EFEITO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA TRANSMIGRAÇÃO DE TIMÓCITOS *IN VITRO*

Dissertação 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: Profª. Drª. Salete Smaniotto

MACEIÓ - AL

2009

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale

M382e Martins Neto, Adalberto Alves
O efeito do hormônio do crescimento na transmigração de timócitos *in vitro* / Adalberto Alves Martins Neto. – 2009.
xii, 86 f.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 75-86.

1. Hormônio do crescimento. 2. Timo. 3. Timócitos. 4. Migração Transendotelial. 5. Neuroimunomodulação. I. Título.

CDU: 577.175.76

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a todos que esperaram ou que esperam na ciência dias melhores para suas vidas, e incrivelmente pela razão, compreenderam que o construir é uma das finalidades que nos mantêm vivos neste mundo cheio de surpresas.

Dedico, ainda, a minha família, em especial aos meus pais, Maria Leusa Alves Barbosa Martins e Cícero Argemiro Martins (*in memorian*), pelos seus esforços constantes e pela oferta de um ambiente sempre agradável e reflexivo, mesmo em momentos difíceis. Neste exato momento, é magistral falar de uma mulher e de um homem, que em união, conseguiu me ensinar às coisas mais importantes, apenas por olhares serenos.

Dedico, a todos os meus professores, por fazerem de suas vidas uma verdadeira doutrina. Homens e mulheres virtuosos, cheios de esperanças para com seus alunos. Verdadeiros prismas, que não escolhem a luz incidente que precisa condensar, e que hoje, através de suas ações, percebo em minha vida várias cores, idênticas as mais belas cores do arco-íris.

Por sentir que estou vivo, persisto lutando.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bem mais precioso e melhor amigo (**Deus**), por conduzir tão bem a minha vida, reservando-me este momento especial. É por saber que Deus é Pai, que numa mistura entre o humano com o divino, superei muitos desafios e aqui não foi diferente. É por saber que Deus é capaz, que consegui forças durante todo este tempo de minha história, para chegar até aqui, num sonho que me recordo, que quando pequeno lia nos livros a descrição profissional dos autores e por ousadia queria ser igual. Hoje, venho dar graças ao Pai, por ter permitido o início de mais uma etapa, que sem dúvidas irei persistir e conseguir tudo àquilo que me foi reservado.

Agradeço, ainda, aos idealizadores deste Programa de Pós-Graduação, por firmarem um compromisso sério e de alto padrão. Também, as instituições de fomento à pesquisa, Fapeal (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de mestrado durante este período e por acreditar no potencial de pesquisa em Alagoas.

Ao Dr. Luiz Antônio e sua equipe, em especial ao amigo Benísio Filho, pela colaboração e pelas reais condições que nos foram proporcionadas no Laboratório de DNA Forense.

Ao Dr. Wilson Savino e sua equipe (Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, FIOCRUZ/RJ), pelo vínculo e também por nos oferecer um amplo suporte que foi utilizado para atendermos aos objetivos propostos neste trabalho.

Aos amigos de longas datas, e aos novos amigos recém conquistados durante este mestrado, pelo companheirismo e pelos ensinamentos surpreendentes revelados a cada encontro diante da fragilidade ou fortaleza de cada um de vocês.

Por fim, a todos que fazem parte da minha história no Laboratório de Imunohistologia da UFAL.

Agradeço a professora Drª. Theresinha Carvalho Calado, por ter-me revelado durante as aulas de Histologia básica, a unidade mais perfeita e complexa da vida: a célula; e que hoje, consegui avançar com seus ensinamentos.

À Delma, uma senhora impressionante, que tenho prazer de ter encontrado em minha vida, um verdadeiro anjo.

Aos companheiros iniciais de laboratório: Lucyana, Fabiane, Diego, Maíra e Amanda. Por serem valentes, corajosos, verdadeiros guerreiros. Pelos momentos alegres, por nossas inseguranças, por tudo que vivi ao lado de vocês.

Aos companheiros recentes de laboratório: Danielma, Fagner, Raysa, Larissa, Iana. Por novas emoções e por saber que um novo ciclo começou.

Ao Fernando Wagner e Andréa Aragão, dois jovens mestres, que puderam reconhecer em nossos trabalhos uma lição de vida, impressionando a todos com sua garra.

À professora Drª. Silvana Ayres, pelo carinho e certeza que me encontrei como profissional da educação, em suas ações unicamente corretas e dedicadas.

E em foco, a minha orientadora Salete Smaniotto, que neste momento, prefiro não usar títulos ou qualquer outra formalidade, para reconhecê-la como humano em todas as suas qualidades. Ao certo não sei como te conheci, mas durante esses quase cinco anos, reconheço que sob seus ensinamentos pude crescer e conviver num lugar corretamente coordenado. Sou e estou muito feliz por realizarmos este trabalho, em união, com garra, com boas preocupações, visando sempre à verdade. Agradeço por ser luz em meu caminho, sempre me ofertando sonhos para recomeçar. Por confiar e depositar responsabilidades, que tentei solucionar da melhor maneira. É por ter aprendido a reconhecer que o verso tem reverso, que me projeto para o futuro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas _____ ix

Resumo _____ xii

Abstract _____ xiii

1. Introdução _____ 1

1.1 Neuroimunomodulação _____ 2
1.2 O timo _____ 5
1.2.1 Embriologia e morfologia do timo _____ 6
1.2.2 Microambiente tímico e migração intratímica de células T _____ 9
1.3 A célula endotelial e a migração transendotelial de células T ___ 11
1.3.1 Interações entre as células endoteliais e os leucócitos _____ 13
1.3.2 A transmigração de leucócitos através da parede vascular ___ 17
1.3.3 Entrada e saída de células T no timo _____ 18
1.4 Hormônio do crescimento: Um agente imunomodulador _____ 21

2. Objetivos _____ 27

3. Material e Métodos _____ 28

3.1 Animais _____ 28
3.2 Reagentes _____ 28
3.3 Anticorpos _____ 28
3.4 Cultura de células _____ 29
3.5 Obtenção de timócitos _____ 29
3.6 Ensaio de transmigração endotelial de timócitos _____ 30
3.7 Citometria de fluxo _____ 32
3.8 Real time (RT)-PCR _____ 33
3.8.1 Iniciadores de oligonucleotídeos _____ 33
3.8.2 Extração do RNA total das preparações de células endoteliais tEnd.1 _____ 34
3.8.3 Transcrição reversa e RT-PCR _____ 35
3.9 Análise estatística _____ 35

4. Resultados _____ 36

4.1 GH modula a transmigração *in vitro* de timócitos murinos através de células endoteliais tEnd.1 _____ 36
4.2 GH mantêm seu efeito imunomodulador na transmigração de timócitos por células endoteliais tEnd.1 nas diferentes subpopulações CD4/CD8 quando em conjunto com CXCL12 _____ 41
4.3 GH em adição a CXCL12 aumenta a passagem de células DP e CD4SP através de barreiras endoteliais _____ 47
4.4 A expressão de VCAM-1 e CXCL12 por células endoteliais tEnd.1 é mantida pelo efeito do GH _____ 52
4.5 Expressão de CXCR4 é diminuída por timócitos tratados com GH e sob influência da CXCL12 após transmigração endotelial _____ 54
4.6 Expressão de VLA-4 é mantida em timócitos CD4/CD8 transmigrados mesmo sob ação conjunta do GH e CXCL12 _____ 58
4.7 Expressão de CXCR4 é diminuída no compartimento celular DP após transmigração endotelial de timócitos tratados com GH e sob influência da CXCL12 _____ 61

5. Discussão _____ 65

6. Conclusão _____ 73

7. Perspectivas _____ 74

8. Referências bibliográficas _____ 75

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
CD	Grupos de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CD4SP	Timócitos simples positivo CD4 ($CD4^+CD8^-$)
CD8SP	Timócitos simples positivo CD8 ($CD4^-CD8^+$)
CD62E	E-selectina
CD62L	L-selectina
CD62P	P-selectina
dim	(do inglês: luz fraca = baixa expressão)
DN	Timócitos duplo negativo ($CD4^-CD8^-$)
DP	Timócitos duplo positivo ($CD4^+CD8^+$)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Enzima sintetase do óxido nítrico endotelial
EPM	Erro padrão da média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxn1	Fator-1 de transcrição *forkhead*
GH	Hormônio do crescimento
GHR	Receptor do GH
GHRH	Hormônio de liberação do GH
HIV-1	Vírus-tipo-1 da imunodeficiência humana
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina

IgGs	Imunoglobulinas
Igs	Superfamília de imunoglobulinas
IL	Interleucina
INCAM	Molécula de adesão celular induzível
JAK	Enzima Janus-quinase
JAM	Molécula de adesão juncional
KDa	Quilodálton
LFA	Antígeno associado à função leucocitária
MAC	Complexo de ataque à membrana
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP	Proteína inflamatória do macrófago
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NK	Células "matadoras" naturais
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de base
PBS	Solução salina com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial a plaqueta
PercP	Proteína clorofila peridinina
PIT	Fator de transcrição pituitária-específico
PSGL	Ligante glicoproteína para P-selectina
rpm	Rotações por minuto
RTEs	Emigrantes recentes tímicos
$S1P_1$	Receptor-1 de esfingosina-1-fosfato
SBF	Soro fetal bovino

SCID	Síndrome de imunodeficiência severa combinada
SDF	Fator derivado de célula estromal
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TECK	Quimiocina expressa no timo
TCR	Receptor de célula T
TNF	Fator de necrose tumoral
TREC	Círculo de excisão do TCR
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLA	Antígeno de aparecimento tardio

RESUMO

A transmigração endotelial é um processo essencial no trânsito de linfócitos. É sabido que o hormônio do crescimento (GH) está envolvido na migração intratímica de células T, e que influencia direta ou indiretamente a biologia das células endoteliais e dos timócitos. Neste contexto, avaliamos a ação do GH na migração transendotelial de timócitos, frente ou não à quimiocina CXCL12. Para o estudo, utilizamos a linhagem endotelial tEnd.1 e timócitos recém isolados de camundongos machos C57BL/6 de 4-6 semanas. Através do ensaio de transmigração endotelial *in vitro* de timócitos, e análise por citometria de fluxo, verificamos uma redução estatisticamente significativa no número de timócitos transmigrados, principalmente nas subpopulações $CD4^+CD8^+$, frente a barreiras endoteliais tratadas com GH [100 ng/ml], por 8 horas. Este efeito foi revertido quando os timócitos foram tratados com GH [100 ng/ml], por 1 hora. Efeitos similares na transmigração foram notados pela ação do GH frente a CXCL12. Apesar de todas as subpopulações CD4/CD8 terem sido afetadas, observamos um aumento estatisticamente significativo no número de timócitos transmigrados, principalmente das células $CD4^+CD8^+$ e $CD4^+CD8^-$, quando foram tratados com GH e colocados para migrar em presença da CXCL12, em relação ao grupo controle não tratado e em presença da quimiocina. Demonstramos, ainda, por RT-PCR, que o GH na concentração de 100 ng/ml, não modulou a expressão de VCAM-1 e CXCL12 por células tEnd.1 tratadas, por 8 horas. Além disso, verificamos por análise citofluorimétrica, que o GH sozinho não alterou a expressão dos receptores VLA-4 e CXCR4 nos timócitos transmigrados. Pela ação conjunta do GH e CXCL12, foi registrado aumento na expressão de VLA-4 sobre células $CD4^-CD8^+$ no grupo experimental em que os timócitos foram tratados com GH, quando comparamos aos grupos onde as células endoteliais foram tratadas. Quanto à expressão de CXCR4, verificamos que o GH/CXCL12 diminuiu a expressão deste receptor sobre timócitos transmigrados, principalmente em células $CD4^+CD8^+$, nos grupos experimentais em que os timócitos foram tratados. Em conclusão, nossos dados fortalecem o postulado de que o GH influencia a fisiologia do timo, e modula a biologia das células endoteliais e dos timócitos, com efeitos diferenciais no processo de transmigração endotelial de timócitos murinos.

ABSTRACT

Transendothelial migration is a key process in lymphocyte trafficking. It is known that growth hormone (GH) modulates intrathymic T cell migration and that directly or indirectly influences the biology of endothelial cells and thymocytes. In this context, we evaluated the effect of GH on the transendothelial migration of thymocytes, in the presence or absence the chemokine CXCL12. For the study, we applied the murine thymic endothelial cell line (tEnd.1) and thymocytes freshly isolated from male C57BL/6 mice aged 4-6 weeks. Through *in vitro* studies of transendothelial migration of thymocytes, and analyses by flow cytometry, we observed a statistically significant reduction in the numbers of transmigrated thymocytes, mainly seen for $CD4^+CD8^+$ cells, across endothelial barriers treated with GH [100 ng/ml], for 8 h. Importantly, this effect was reverted when thymocytes were treated with GH [100 ng/ml] for 1 h. Similar effects were noted in transmigration through joint action of GH and CXCL12. Despite the fact that all the CD4/CD8-defined subsets have been affected, we observed a statistically significant increase in the number of transmigrated thymocytes, mainly of $CD4^+CD8^+$ and $CD4^+CD8^-$ cells, when they were treated with GH and allowed to migrate in response to CXCL12, when compared to untreated controls in response to CXCL12. We demonstrated, by real-time PCR, that GH at 100 ng/ml did not modulate the expression of VCAM-1 and CXCL12 by tEnd.1 cells treated for 8 h. Furthermore, we found by cytofluorimetric assay that GH alone did not change the membrane expression of VLA-4 and CXCR4 receptor in transmigrated thymocytes. Through joint action of GH and CXCL12, was observed increase in expression of VLA-4 on $CD4^-CD8^+$ cells from the group of GH-treated thymocytes, when compared to groups in which endothelial cells were treated. As for expression of CXCR4, we found that the GH/CXCL12 decreased the expression of this receptor on transmigrated thymocytes, mainly in $CD4^+CD8^+$ cells from the group in which the thymocytes were treated. In conclusion, our results reinforce that GH influence the thymus physiology and modulate the biology of endothelial cells and thymocytes, with differential effects in the process of endothelial transmigration of murine thymocytes.

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central e o sistema imune são as duas principais unidades adaptativas do corpo, relevantes para a sensação de perigo e contra-ataque às suas ameaças, tendo o sistema endócrino como um de seus principais elos de comunicação. Por muitos anos, neurociência e imunologia desenvolveram seus conhecimentos independentemente, e muitos imunologistas acreditavam que o sistema imune fosse inteiramente autônomo (Spector, 1996).

Em 1936, Hans Selye ao descrever a Síndrome de Adaptação Geral, sugeriu que os sistemas neuroendócrino e imune interagem durante o estresse (Selye, 1998). Hoje, sabe-se que os neurotransmissores e hormônios adenohipofisários produzidos e secretados pelo eixo hipotálamo-hipófise influenciam diretamente os órgãos linfóides primários (Barnard *et al*., 2008).

O timo, órgão linfóide primário e glândula endócrina, a fonte de células T virgens, fornecendo um microambiente necessário à sinalização, onde ocorrem à diferenciação e a maturação dos progenitores, que periodicamente entram neste órgão através das vênulas pós-capilares localizadas principalmente na junção córtico-medular (Scollay *et al*., 1980). O movimento ativo dos progenitores pós-natal multipotentes, da medula óssea para o timo, e das células T simples positivas, deste órgão para a circulação periférica, deve ser o resultado de uma combinação complexa de sinais bioquímicos que atuam permitindo ou restringindo o movimento celular (Yin *et al*., 2006).

Na migração direcional, como ocorre no timo, o movimento celular é polarizado por um gradiente quimioatraente e facilitado por uma matriz extracelular protéica regionalmente dispersa. Por exemplo, a interação entre a integrina α4β1 expressa por timócitos em diferenciação com uma rede de células estromais positivas para VCAM-1, é um dos eventos necessários para que ocorra a migração dos progenitores imaturos através do córtex tímico; enquanto, sinais quimiotáticos, como a quimiocina

CXCL12 e seu receptor CXCR4 estão envolvidos na entrada de progenitores para o timo e na migração intratímica dos timócitos nos estágios iniciais de maturação, bem como, mediando à repulsão de células T maduras (Petrie, 2003).

Evidências sobre influência de hormônios hipofisários sobre a fisiologia do timo e a diferenciação de células T são crescentes. Esta relação foi observada em camundongos anões *Snell-Bagg*, que apresentam uma alteração estrutural e funcional no timo provocada por distúrbios endócrinos, como perda da produção de certos hormônios hipofisários (Fabris *et al*., 1971). Neste sentido, o hormônio do crescimento exerce efeitos timopoiéticos, aumenta a função endócrina do timo e estimula a migração intratímica de células T em desenvolvimento (Dardenne *et al*., 2009). Porém, o entendimento de seus possíveis efeitos sobre a entrada de progenitores e a saída de células maduras deste órgão não está claro. É neste contexto que desenvolvemos a presente dissertação, em que examinamos o efeito imunomodulador do hormônio do crescimento no processo de transmigração endotelial de timócitos murinos *in vitro*.

1.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A neuroimunomodulação, termo empregado em 1987 por Novera Herbert Spector para nomear uma nova disciplina, dedica-se ao estudo das interações em diferentes aspectos morfológicos e funcionais entre os sistemas imune, nervoso e endócrino (Conti, 2000). Esta área de estudo da pesquisa biomédica surgiu da concepção que a homeostasia orgânica a desafios endógenos ou exógenos seja o produto de uma ampla rede de controle (Alves & Palermo-Neto, 2007). Neste entendimento, os sistemas que evoluíram para executar uma função especializada estão integrados, influenciando-se mutuamente (Spector, 1996).

Nas últimas décadas, foram fornecidas evidências que informações derivadas do sistema neuroendócrino são capazes de modular processos

imunes, e que, o sistema nervoso central recebe mensagens provenientes do sistema imune, estabelecendo e consolidando um diálogo funcionalmente relevante entre esses sistemas, sendo a homeostasia sua principal função (Kelley *et al*., 2007). Tais comunicações sugerem um papel imunomodulatório para o cérebro e uma função sensorial para o sistema imune, o qual capacitaria o sistema nervoso central para receber e processar estímulos que, de outro modo, não seriam percebidos pelas vias sensoriais clássicas (Blalock, 1984).

Trabalhos pioneiros de Hugo Besedovsky e colaboradores mostraram que o sistema imune sinaliza para o sistema nervoso central através de citocinas (Besedovsky & del Rey, 2001; Ziemssen & Kern, 2007). Por outro lado, as duas principais vias de conexão pelo qual o cérebro sinaliza para o sistema imune, são o sistema nervoso autônomo, via influência neural direta, e o sistema neuroendócrino através da hipófise (Ziemssen & Kern, 2007). A base molecular do diálogo imuno-neuroendócrino envolve ligantes e receptores similares para estabelecer um circuito de comunicação intra-e intersistemas (Weigent & Blalock, 1987; Savino & Dardenne, 1995).

Na década de 70, foi descrito funcionalmente, o primeiro receptor de hormônio sobre linfócitos, no mesmo período que foi relatado que agentes adrenérgicos são capazes de modular a proliferação destas células (Revisado em Ziemssen & Kern, 2007). É conhecida a existência de ricas conexões neurais com os órgãos linfóides, bem como, a presença de receptores para vários neurotransmissores sobre células do sistema imune (Webster *et al*., 2002).

A primeira indicação que hormônios hipofisários possuem um papel sobre o sistema imune, foi fornecida por experimentos usando roedores com deficiência na hipófise, como exemplo, ratos hipofisectomizados. A hipofisectomia provoca uma deficiência combinada em todos os hormônios hipofisários, com prejuízos no desenvolvimento de diferentes compartimentos do sistema imune, bem como, nas funções efetoras de leucócitos, que foram restauradas pela administração de hormônios

produzidos pela adenohipófise (prolactina e hormônio do crescimento) (Kelley *et al*., 2007).

Um dos reconhecidos moduladores neuroendócrino da função imune são os hormônios glicocorticóides, produzidos e secretados pelas células adrenocorticais como resultado da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Webster *et al*., 2002). Os glicocorticóides endógenos podem influenciar a atividade do sistema imune devido aos seus efeitos anti-inflamatório sobre diferentes tipos de células imunes, afetando a produção de muitas citocinas (Besedovsky & del Rey, 2000).

Um ponto interessante na estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal é o envolvimento potencial da prolactina com aumento em sua secreção. Embora não totalmente compreendido, o papel fisiológico deste aumento pode ser explicado como sendo para conter os efeitos que os glicocorticóides exercem sobre o sistema imune (Davis, 1998). Um dos estudos que indiretamente suporta a hipótese dos efeitos estimulatórios da prolactina em diferentes componentes do sistema imune, é o relato que a prolactina aumenta a secreção de timulina, um peptídeo tímico envolvido no aumento da atividade de linfócitos (Dardenne & Savino, 1994).

Além disso, hormônios tireóideos exercem efeitos imunomodulatórios, sendo mostrado que o tratamento com tiroxina restaurou defeitos imunológicos em camundongos anões *Snell-Bagg*, resultando em aumento na celularidade da medula óssea (Kelley *et al*., 2007). Também, foi descrito que triiodotironina influencia a fisiologia do timo, estimulando a diferenciação de timócitos, através da modulação positiva na secreção hormonal tímica e na expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular por células epiteliais tímicas (Villa-Verde *et al*., 1993).

Embora classicamente envolvidos na diferenciação sexual e reprodução, atualmente, os hormônios sexuais são reconhecidos por sua influência pleiotrópica, por atuarem sobre múltiplos alvos, incluindo o sistema nervoso central e o sistema imune. Estes hormônios podem atuar diretamente sobre células imunes, alterar os sítios do desenvolvimento de

linfócitos e modificar o perfil de citocinas, como ilustrado pelo aumento na secreção das interleucinas- (IL)-6 e IL-10 em camundongos C57BL/6 após tratamento com estrógeno. Os hormônios sexuais influenciam o desenvolvimento, maturação, ativação e morte das células imunes (Verthelyi, 2001).

Evidências crescentes colocaram os hormônios e/ou neuropeptídeos entre os potentes imunomoduladores, participando em vários aspectos da função do sistema imune. A fisiologia do timo é modulada por uma variedade de circuitos biológicos incluindo estas moléculas (Savino & Dardenne, 2000). Sabe-se que neste órgão do sistema imune, foram encontradas moléculas tipicamente descobertas no sistema nervoso, por exemplo, neuropilina-1 inicialmente identificada por mediar à atividade quimiorepulsiva das semaforinas durante o desenvolvimento embrionário do cérebro, está também envolvida na formação da sinapse imunológica e durante o desenvolvimento de linfócitos no timo humano, por meio do controle na migração celular, sendo estas moléculas constitutivamente expressas no timo (Lepelletier *et al*., 2007).

1.2 O TIMO

O timo é encontrado em todos os vertebrados mandibulados e possui a plasticidade para gerar um diverso e autocompatível repertório de células T, que eventualmente deixam este órgão para povoarem os órgãos linfóides periféricos (Boehm & Bleul, 2006). A primeira demonstração do seu crucial papel em estabelecer o desenvolvimento de um sistema imune normal foi fornecida em 1961, quando foi mostrado que camundongos timectomizados imediatamente após o nascimento tinham tecidos linfóides mal desenvolvidos, respostas imunes prejudicadas e suscetibilidade anormal a infecções recorrentes (Revisado em Miller, 2002).

A função endócrina tímica é sustentada pela atividade secretora das células do microambiente, particularmente do epitélio tímico subcapsular e medular. Além da produção de citocinas, as células epiteliais tímicas

secretam timosina-α1, timopoietina e timulina, que podem atuar sobre o processo de maturação dos timócitos (Hadden, 1998).

1.2.1 Embriologia e Morfologia do Timo

A localização do rudimento tímico no endoderma da terceira bolsa faringeal é definida pela célula epitelial tímica, um componente residente no estroma tímico contribuindo para a formação do timo funcional. O marcador molecular precoce sugerido por delinear a região de ontogenia do timo é *Foxn1*, um fator de transcrição codificado pelo locus *nude* e absolutamente requerido para o desenvolvimento das células epiteliais tímicas (Boehm & Bleul, 2006).

No camundongo, os eventos morfológicos da organogênese inicial do timo ocorrem entre os dias 10 e 13.5 do desenvolvimento embrionário, desenvolvendo-se bilateralmente como resultado das interações entre o endoderma da terceira bolsa faringeal e o mesênquima da crista neural circundante. A etapa inicial da organogênese culmina na formação de dois primórdios, que pelo dia 13.5 atingem suas posições aproximadas dentro do embrião, correspondendo ao timo e as glândulas paratireóides (Manley & Blackburn, 2003).

O timo é um órgão situado no mediastino pericárdico anteriormente aos grandes vasos do coração, e consiste de dois lobos distintos conectados através de tecido conjuntivo. Uma fina cápsula de tecido conjuntivo reveste cada lobo, e desta partem septos incompletos dividindo parcialmente o parênquima tímico em múltiplos lóbulos (Figura 1). Anatomicamente e funcionalmente, cada lóbulo apresenta quatro regiões: subcapsular mais externa, córtex, junção córtico-medular, e medula (Pearse, 2006).

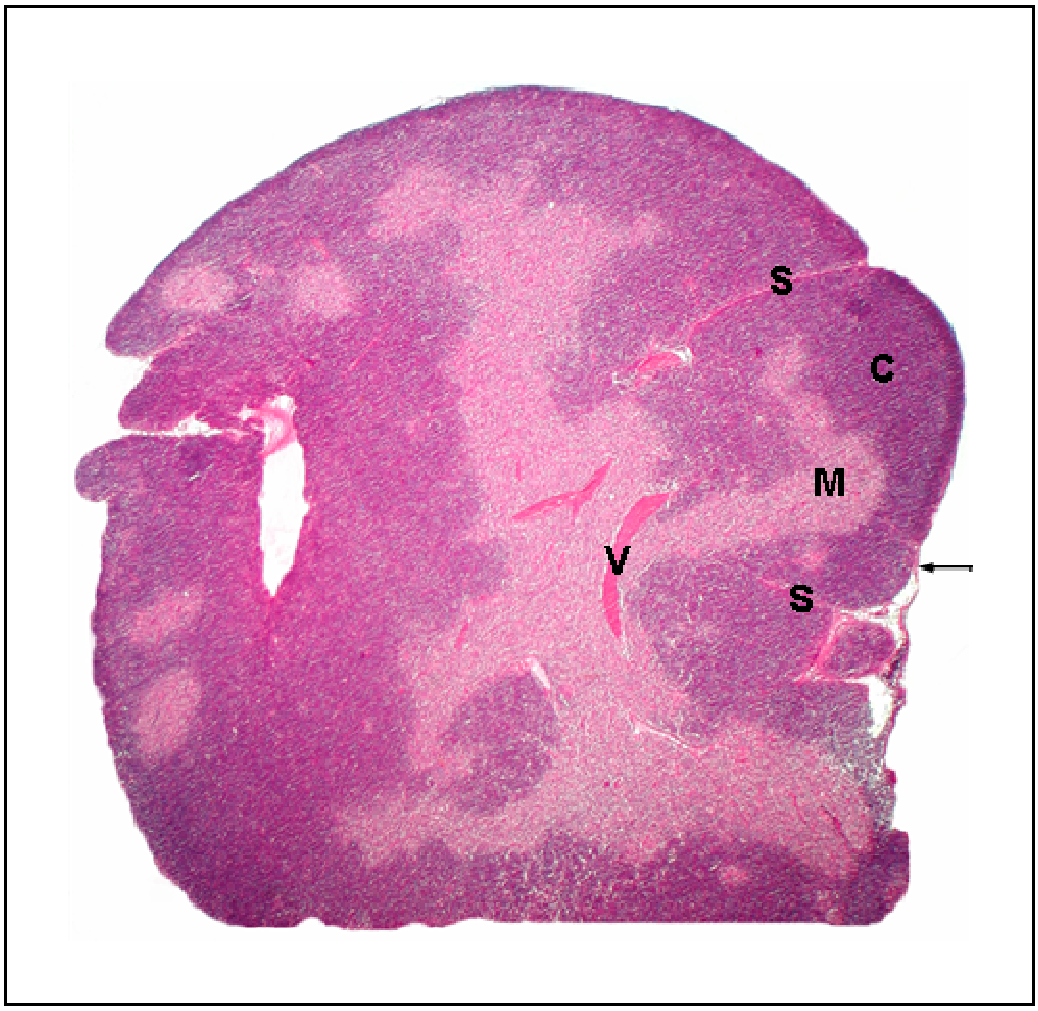

Figura 1. Aspectos morfológicos do timo. Fotomicrografia de um lobo do timo de camundongo C57BL/6, onde podemos observar um lóbulo demarcado pelos septos (S), com as regiões cortical (C), bastante densa em timócitos, e medular (M), menos densa em timócitos. V= vaso sanguíneo; e seta= cápsula de tecido conjuntivo. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento: 100x (Fotomicrografia produzida no Laboratório de Imunohistologia- ICBS/UFAL, por Adalberto Alves Martins Neto).

Dados da literatura mostram que o timo é o primeiro dos órgãos linfóides a ser formado, e cresce consideravelmente, imediatamente após o nascimento em resposta a estimulação aos antígenos pós-natal e a demanda para grandes números de células T maduras (Pearse, 2006). Ao nascer, o timo pesa aproximadamente 15 a 20 g e alcança o maior tamanho em relação ao peso corpóreo nos primeiros meses de vida (Aspinall & Andrew, 2000). A partir da puberdade, existe um declínio gradual na integridade e função do órgão que continua ao longo da vida. A regressão no tamanho, peso e celularidade são conhecidos como involução tímica, um processo que está associado com alterações no desenvolvimento dos timócitos, decorrente da degeneração acelerada da matriz extracelular tímica e dos vasos sanguíneos em resposta a diversos fatores, dentre eles as citocinas (Li *et al*., 2004).

O suprimento vascular tímico é feito pela distribuição dos vasos intralobulares que são representados por arteríolas, capilares e vênulas. As artérias tímicas seguem o curso do septo de tecido conjuntivo intralobular, e penetram no parênquima deste órgão. As arteríolas correm no limite entre o córtex e a medula, ramificando-se em capilares, que ascendem ao córtex formando uma rede de ramificação e anastomoses colaterais e retornam em direção ao interior do lobo. Neste percurso recorrente através do córtex, os capilares se reúnem para formar grandes vasos e na junção córtico-medular e na medula eles fundem-se em vênulas pós-capilares. Além disso, a medula é suprida por um pequeno número de capilares originando-se diretamente das arteríolas da junção córtico-medular (Raviola & Karnovsky, 1972; Pearse, 2006).

As vênulas pós-capilares são definidas como grandes vasos, cujo diâmetro varia de 10 a 50 μm. Suas paredes consistem de endotélio, lâmina basal e adventícia de tecido conjuntivo. Este é o provável sítio de entrada e saída dos linfócitos no timo, onde às paredes das vênulas apresentam arquitetura notavelmente distorcida e são revestidas por um endotélio cúbico e irregular, permitindo que um grande número de linfócitos infiltre o órgão, após migração destas células através dos

espaços intercelulares estabelecidos entre células endoteliais adjacentes (Raviola & Karnovsky, 1972).

1.2.2 Microambiente tímico e migração intratímica de células T

O parênquima tímico é composto de células linfóides e de células não linfóides. O compartimento não linfóide do microambiente tímico é formado, principalmente, por uma rede tridimensional de células epiteliais, além de células não epiteliais, como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais, como também, proteínas de matriz extracelular (Boyd *et al*., 1993; Milićević & Milićević, 2004).

Ao entrarem no timo, os precursores de células T seguem uma rota migratória já estabelecida, direcionando-se para o córtex e em seguida para a medula. Da entrada dos precursores de células T no timo à saída de células maduras deste órgão, são estabelecidos vários tipos de interações entre linfócitos T e células do microambiente. As células não linfóides do timo governam o complexo processo de diferenciação dos timócitos, dando sinais de maturação através do contato célula-célula, bem como, pela produção local de fatores solúveis (Savino *et al*., 2003; Ladi *et al*., 2006).

Uma interação chave durante o desenvolvimento dos timócitos envolve o receptor de célula T (TCR), que na membrana dessas células está fisicamente associado com o complexo molecular CD3. O complexo TCR/CD3 interage com um peptídeo endógeno apresentado por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) expressas principalmente nas membranas de células não linfóides. Esta ligação é favorecida pelas moléculas acessórias CD8 e CD4, que são glicoproteínas expressas principalmente na superfície dos timócitos e que interage com moléculas MHC classe I e classe II, respectivamente. A avidez resultante desta interação é um determinante para os eventos de seleções positiva e negativa, cruciais para a diferenciação normal dos timócitos (Savino & Dardenne, 2000; Delves & Roitt, 2000).

A migração fisiológica de timócitos deve ser entendida como um vetor resultante de múltiplos, simultâneos e/ou sequenciais estímulos envolvendo citocinas, quimiocinas, hormônios tímicos, proteínas de matriz extracelular, metaloproteinases, bem como, receptores de membrana celular para todas essas moléculas. Tais interações ocorrem durante todo o processo de diferenciação/maturação de timócitos (Savino, 2007).

A população de timócitos pode ser dividida em três subtipos de acordo com seu estágio de diferenciação, que podem ser analisados através de mudanças na expressão dos co-receptores CD4 e CD8 (Figura 2).

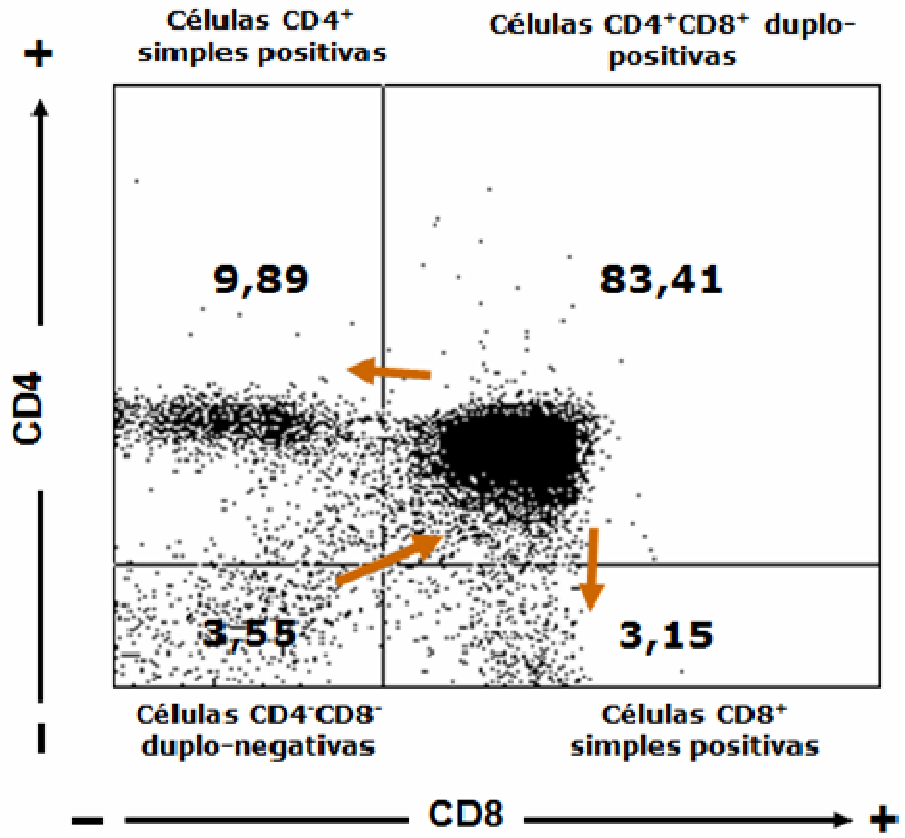

Figura 2. Expressão dos co-receptores CD4 e CD8 por timócitos oriundos do timo de camundongos C57BL/6 de 4-6 semanas, a partir de uma análise por citometria de fluxo, usando anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. As percentagens de todos os timócitos contribuindo para cada uma das subpopulações são mostradas nos quatro quadrantes. As setas indicam a sequência de amadurecimento.

Estágio I $CD4^-CD8^-$ (timócitos duplo-negativo ou DN): São os timócitos mais imaturos e não expressam o complexo TCR e nem as moléculas acessórias CD4/CD8; estas células estão localizadas na região mais externa do córtex tímico, notadamente na região subcapsular, e todo este compartimento representam aproximadamente 5% do total de timócitos. Estágio II $CD4^+CD8^+$ (timócitos duplo-positivo ou DP): Estas células desenvolvem-se a partir dos timócitos do estágio I adquirindo ambos marcadores CD4/CD8 e rearranja os genes relacionados às cadeias do TCR; elas ocupam as regiões cortical média e profunda, e compreendem 80% do total de timócitos, tendo um tempo de vida de 3-4 dias, e uma substituição diária de 25-33%. Estágio III $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-$ $CD8^+$ (timócitos simples positivo ou SP): São as células que sucessivamente passam através do estágio II do desenvolvimento e escapam do programa de morte celular; elas ocupam a medula, expressam altos níveis do TCR, e compreendem 15% do total de timócitos, com células $CD4^+CD8^-$ sendo predominantes sobre células $CD4^-$ $CD8^+$ (Scollay & Godfrey, 1995; Milićević & Milićević, 2004; Ladi *et al*., 2006).

1.3 A CÉLULA ENDOTELIAL E A MIGRAÇÃO TRANSENDOTELIAL DE CÉLULAS T

As células endoteliais vasculares originam-se do folheto mesodérmico esplancnopleura, a partir da célula bipotencial, o hemangioblasto. Na fase embrionária, a célula endotelial prolifera, por meio da divisão celular e da formação de brotos, que 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 (do Nascimento *et al*., 2003).

Num adulto, o endotélio consiste de aproximadamente (1-6) x 10^{13} células endoteliais formando uma camada monocelular que reveste internamente os vasos sanguíneos com uma massa estimada de 1 - 1,5 kg (Sumpio *et al*., 2002; Stoltz *et al*., 2007).

A célula endotelial possui a forma alongada com o núcleo proeminente e é repleta de organelas intracelulares, como exemplo, os corpos de Weibel-Palade, que são as únicas organelas secretoras dentro destas células, armazenando uma variedade de moléculas bioativas, incluindo o fator von Willebrand, endotelina, P-selectina e IL-8, necessárias para montar uma resposta rápida as variações ambientais (Romani *et al*., 2004; Metcalf *et al*., 2008).

A posição estratégica na parede do vaso e a conexão integrada de toda a rede endotelial permitem considerar o endotélio como um perfeito sensor biológico, capaz de detectar variações de pressão arterial, fluxo sanguíneo, mediadores químicos e alterações metabólicas que possam ocorrer em qualquer local do organismo. A superfície apical da célula endotelial apresenta várias macromoléculas ligadas à membrana que constituem o glicocálix, um mecano-sensor e distribuidor da força que o fluxo sanguíneo exerce na parede do vaso (Tarbell & Ebong, 2008).

Funcionalmente, o endotélio está envolvido em várias funções vitais do sistema cardiovascular, sendo normalmente anti-trombótico e anti-adesivo, para assegurar a fluidez sanguínea. Essas ações são garantidas pela versatilidade e múltiplas propriedades de síntese e metabolismo das células endoteliais, como exemplo, o controle na liberação de componentes vasoativos (endotelina-1, prostaciclina e óxido nítrico); expressão de proteoglicanas sobre a superfície destas células, bem como, de outros fatores com função anticoagulante e também, a expressão de moléculas de adesão. Como uma barreira, o endotélio é semipermeável e controla a transferência de moléculas pequenas e grandes. Além disso, as células endoteliais possuem um papel chave nas reações imune e inflamatória através da regulação no processo de transmigração de leucócitos (Sumpio *et al*., 2002; Stoltz *et al*., 2007).

1.3.1 Interações entre as células endoteliais e os leucócitos

A migração transendotelial é um processo essencial para o trânsito de leucócitos, e seu descontrole está associado com muitas doenças, por exemplo, em desordens inflamatórias crônicas e em metástases (Hordijk, 2006).

Durante o processo de transmigração, os leucócitos sofrem uma série orquestrada de adesão e de-adesão às células endoteliais, através de uma variedade de interações moleculares, em que eles são capturados, rolam e aderem firmemente junto ao endotélio e finalmente extravasam através da parede vascular (Springer, 1994), conforme ilustrado resumidamente na figura 3.

Experimentalmente, o processo de transmigração é mostrado em três etapas sucessivas, onde cada fase é mediada primariamente por uma família diferente de moléculas de adesão (selectinas, integrinas, e moléculas da superfamília de imunoglobulinas (Igs)) e seus contra-receptores (Muller *et al*., 1993; Muller, 1995).

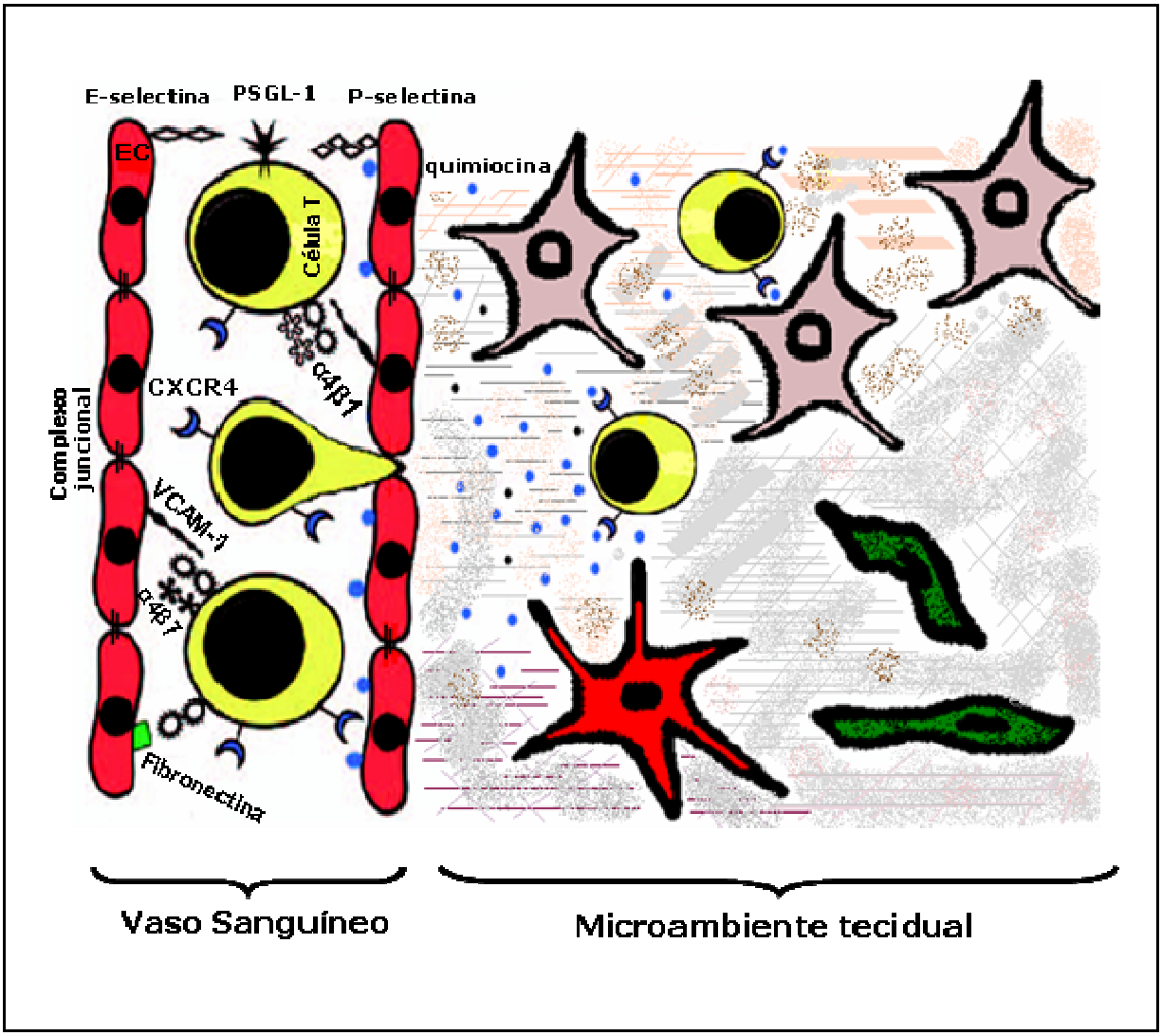

Figura 3. Transmigração endotelial de linfócitos. Moléculas de adesão celular na superfície de células T se ligam a uma variedade de ligantes sobre as células endoteliais (EC), permitindo que a transmigração ocorra. As células T depois que transmigram, seguem um gradiente de moléculas quimioatraentes e estabilizam uma variedade de interações moleculares com a rede celular residente no microambiente tecidual (Modificado a partir de Chute, 2006).

Inicialmente, interações de baixa afinidade mediadas por selectina e seus ligantes carboidratos causam a captura e o rolamento de leucócitos sobre as células endoteliais. A família selectina, um grupo de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, consiste de três moléculas de superfície celular com expressão diferencial para leucócitos (L-selectina, CD62L), plaquetas (P-selectina, CD62P), e endotélio vascular (E-selectina, CD62E; e P-selectina) (Tedder *et al*., 1995; Ley & Tedeer, 1995; Kansas, 1996).

Os eventos de adesão inicial, dependentes de selectina, promovem uma rápida ativação das integrinas dos leucócitos via receptores acoplados à proteína G, aumentando a afinidade de ligação destas células com o endotélio (Hordijk, 2006).

As integrinas compreendem uma grande família de receptores de superfície celular, sendo encontradas em várias espécies animais, desde esponjas até os mamíferos. Cada integrina é um heterodímero formado por duas subunidades, α e β, e cada combinação αβ ligada não covalentemente tem a sua própria especificidade de ligação e propriedades de sinalização. Dados mostram que, já foram identificadas 18 subunidades de cadeia α e 8 subunidades de cadeia β em mamíferos, permitindo a formação de pelo menos 24 integrinas. Dependendo da cadeia β nos heterodímeros, estas moléculas são classificadas em várias subfamílias, e muitas delas pertencem ao subtipo β1 ou VLA (antígeno de aparecimento tardio) (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Kinashi, 2005).

Funcionalmente, as integrinas permitem a adesão firme dos leucócitos ao endotélio, através de sua ligação a membros da superfamília Igs, bem como, a proteínas de matriz extracelular sobre a superfície das células endoteliais. Além disso, participam da resposta inflamatória, do crescimento, diferenciação e proliferação celular, como também, direcionam as células à vida ou à morte (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Dentre as principais moléculas da superfamília Igs envolvidas na adesão estável entre o leucócito/célula endotelial via integrinas, a

molécula-1 de adesão das células vasculares (VCAM-1) é o ligante importante para integrina β1 (Stoltz *et al*., 2007).

Também chamada de INCAM-1, VCAM-1 foi inicialmente encontrada sobre células endoteliais de veia umbilical humana e definida por sua capacidade de mediar à adesão de linhagens celulares de melanoma metastático. Atualmente, sabe-se que esta molécula é pouco ou não é expressa em células em repouso, mas altamente expressa por estímulo inflamatório. Ela atua como um receptor para linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, e células tumorais, e que o contra-receptor nos linfócitos para esta molécula é a integrina VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ ou CD49d/CD29), que também medeia outros processos de adesão, incluindo adesão celular a fibronectina bem como interações homotípica e heterotípica entre linfócitos. É possível que VCAM-1 seja importante não somente como uma molécula adesiva, mas também atue na regulação da diferenciação e atividade de células imunes (Bereta *et al*., 1993).

Em células T, a interação VLA-4/VCAM-1 pode gerar um contato adesivo estável ao endotélio, resistente à força de cisalhamento do fluxo sanguíneo. Essa interação adesiva é capaz de mediar todas as etapas da emigração dos linfócitos, dependendo da afinidade da integrina VLA-4 que pode ser rapidamente e transitoriamente aumentada por fatores quimiotáticos, bem como, regulada por proteínas adaptadoras do citoesqueleto (Chan *et al*., 2001; Manevich *et al*., 2007).

Além de participar na migração transendotelial de linfócitos, a integrina VLA-4 e seu ligante VCAM-1 medeiam adesão intercelular entre células endoteliais e células murais durante a angiogênese, permitindo que ambos os tipos celulares recebam sinais de sobrevivência dos fatores de crescimento secretados (Garmy-Susini *et al*., 2005).

1.3.2 A transmigração de leucócitos através da parede vascular

Após os eventos de adesão inicial e adesão firme, ocorre a diapedese, onde a célula migrante cruza o endotélio através do complexo juncional interendotelial e sua membrana basal perivascular associada (Hordijk, 2006).

Nesta etapa, a interação das moléculas juncionais da célula endotelial com seus contra-receptores em leucócitos, pode induzir mudanças fenotípicas e funcionais nos leucócitos transmigrantes. Linfócitos T após a migração transendotelial expressam elevados níveis da integrina VLA-4 e de proteases, facilitando a sua migração através da membrana basal, bem como, aumentando as suas funções celulares no tecido extravascular (Choi *et al*., 2004). Entre as moléculas juncionais da célula endotelial envolvidas nesta etapa, recentemente, foi identificado um novo membro da superfamília Igs, chamada de molécula-2 de adesão juncional (JAM-2) que é altamente expressa durante a embriogênese e é restrita às subpopulações endoteliais em tecidos adultos, notavelmente em vênulas de endotélio alto nos linfonodos de camundongos (Martìn-Padura *et al*., 1998; Aurrand-Lions *et al*., 2001).

Foi observado que JAM-2 é um importante regulador da migração transendotelial de linfócitos, como avaliado em ensaio de migração de linfócitos através de monocamadas endoteliais expressando altos níveis de JAM-2 (Johnson-Léger *et al*., 2002).

Outro membro da superfamília Igs, que atuam no processo de transmigração de leucócitos através das junções intercelulares das células endoteliais vasculares é a molécula 1 de adesão celular endotelial a plaqueta (PECAM-1, CD31) (Newman *et al*., 1990). Esta molécula é expressa na superfície de células hematopoiéticas e células endoteliais, e nestas últimas, concentra-se nos pontos de contato célula-célula. PECAM-1 parece ser capaz de induzir ativação de integrinas β1 na superfície dos leucócitos, aumentando a motilidade destas células através da membrana basal (Muller *et al*., 1993; Muller, 1995).

A membrana basal perivascular consiste de pericitos mergulhados dentro de uma rede de proteínas de matriz extracelular, e fornece uma barreira para os leucócitos migrantes. Ao contrário da migração dos leucócitos através das células endoteliais que pode durar 5-10 min, a migração dos leucócitos através da membrana basal pode durar 20-30 min *in vivo*. Essa estrutura gera um substrato adesivo suficiente para regular o comportamento e funções celulares dos leucócitos (Nourshargh & Marelli-Berg, 2005).

1.3.3 Entrada e saída de células T no timo

O modelo de múltiplas etapas da migração transendotelial aplica-se aos eventos de entrada de precursores hamatopoiéticos no timo e a saída de células T maduras deste órgão. Durante o início da embriogênese (dia 11.5 em camundongos e oitava semana da gestação em humanos), progenitores linfóides começam a migrar para o rudimento tímico avascular através do envoltório mesenquimal, e este processo de colonização do timo fetal independente dos vasos é regulado pela ação de membros da família de quimiocinas (Takahama, 2006; Boehm & Bleul, 2006).

As quimiocinas são polipeptídeos pequenos (8-10 KDa) de 67 a 127 aminoácidos, sendo geralmente secretadas e exibindo resíduos de cisteína em suas sequências de aminoácidos. Com base na localização das últimas duas cisteínas, elas foram classificadas em: CXC ou alfa, CC ou beta, C ou gama, e CX3C ou delta. Elas possuem capacidade quimioatraente sendo importantes moduladores não somente no controle da migração celular, mas também, de outros processos fisiológicos e patológicos, como reparo tecidual, inflamação, angiogênese, metástase e no desenvolvimento de órgãos linfóides, através da interação com receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana. Todos esses receptores possuem um peso molecular individual de aproximadamente 40 KDa, e são também classificados em quatro famílias – CXCR, CCR, CR e CX3CR –

de acordo ao tipo de quimiocina no qual eles se ligam (Rollins, 1997; Rossi & Zlotnik, 2000; Rodríguez-Frade *et al*., 2001).

Particularmente, várias quimiocinas são expressas no timo, e são capazes de atrair células T imaturas e subtipos de timócitos com variada eficácia, explicando a localização específica de subtipos de timócitos dentro do timo. Por exemplo, CXCL12 que é expressa principalmente na junção córtico-medular do timo, representa um importante fator quimiotático para progenitores hematopoiéticos. A interação entre CXCL12 e seu receptor CXCR4 é importante na migração intratímica de timócitos imaturos, com as células duplo-negativas ($CD4^-CD8^-$) e duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) sendo as mais responsivas (Rossi & Zlotnik, 2000; Norment & Bevan, 2000). Foi observado que a atividade quimiotática de CXCL12 para timócitos corticais pode ser aumentada por proteínas da matriz extracelular, indicando que as quimiocinas, junto com outras moléculas, podem controlar a compartimentalização vista dentro dos órgãos linfóides e coordenar o desenvolvimento de células T (Yanagawa *et al*., 2001).

Uma vez o timo vascularizado no final da gestação, por um processo em que o fator de crescimento endotelial vascular - (VEGF) expresso por células epiteliais tímicas possui um importante papel, progenitores linfóides entram no timo pós-natal por transmigração, principalmente, através do endotélio das vênulas pós-capilares localizadas na junção córtico-medular (Raviola & Karnovsky, 1972; Takahama, 2006).

Curiosamente, a entrada de células progenitoras linfóides no timo não é um evento contínuo, mas um evento intermitente que ocorre em ondas durante a embriogênese e na idade adulta (Coltey *et al*., 1989).

A colonização do timo adulto é regulada dentre outras interações, por VLA-4/VCAM-1. VCAM-1 é expressa pelos vasos córtico-medular do timo (provável sítio de entrada dos progenitores linfóides), e, em combinação com VLA-4, medeia a parada dos progenitores rolando na superfície do endotélio tímico. De fato, inibição de VCAM-1 e/ou VLA-4 reduziu o endereçamento de progenitores linfóides para o timo em 70±5% (Scimone *et al*., 2006).

Quanto à saída dos timócitos maduros do parênquima tímico à circulação, recentemente foi mostrado ser um processo controlado pelo receptor-1 de esfingosina-1-fosfato ($S1P_1$). Este dado é suportado pela observação que células simples positivas adquirem a expressão de $S1P_1$, ou que, a carência deste receptor impede a saída destas células, que se acumulam na medula tímica. Além disso, a concentração de esfingosina-1-fosfato parece ser mais elevada no soro do que em muitos tecidos. Estes resultados indicam que a quimioatração dos timócitos maduros expressando - $S1P_1$ à esfingosina-1-fosfato regula a saída destas células do timo pós-natal (Cyster, 2005; Takahama, 2006).

Outra molécula reconhecida por apresentar um papel potencial na emigração de timócitos é o marcador de ativação inicial, CD69. Esta molécula é uma glicoproteína transmembrana do tipo II, que contém um domínio extracelular de ligação a lectina tipo C e é transitoriamente expressa no timo sobre timócitos sendo selecionados positiva e negativamente, e sobre células T maduras. Foi demonstrado que, camundongos transgênicos para CD69 exibiram um fenótipo de acumulação de timócitos simples positivo no timo, e redução no número de células T CD4SP e CD8SP na periferia, mas nenhuma alteração da arquitetura tímica, no que se refere à demarcação cortical e medular normal, e ao padrão de localização dos timócitos dentro do timo (Hamann *et* al., 1993; Feng *et al*., 2002).

As quimiocinas também estão envolvidas no processo de exporte tímico, e deve-se notar que os seus sinais quimiotáticos atrativos e/ou repulsivos são responsáveis pelo posicionamento dos timócitos perto das vênulas pós-capilares facilitando este processo. Por exemplo, CXCL12 que é pouco expressa na medula tímica medeia repulsão das células T e em combinação com muitas outras quimiocinas direcionam a saída de células T maduras do timo (Petrie, 2003).

Além das moléculas de adesão e de quimiotaxia, evidências crescentes mostram que o trânsito de timócitos está sob um controle neuroendócrino. De acordo com esta ideia, foi demonstrado que o fator-1

de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) aumenta a entrada de precursores celular no timo, aumentando a celularidade deste órgão em camundongos velhos. Da mesma forma, trabalhos indicam que o hormônio do crescimento aumenta a entrada e a saída de timócitos no timo (Savino & Dardenne, 2000).

1.4 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO: UM AGENTE IMUNOMODULADOR

O hormônio do crescimento (GH), também conhecido como somatotrofina, é membro de uma família de fatores de crescimento evolutivamente relacionados que inclui a prolactina, lactógenos placentários, proliferinas, e somatolactina. Ele é produzido principalmente pelas células somatotróficas da hipófise anterior, sendo um polipeptídeo contendo 191 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto, secretado como um monômero tendo uma massa teórica de 22-25 KDa e geralmente não é glicosilado. O GH é também produzido em outros locais, como evidenciado por estudos anteriores mostrando expressão do gene do GH em mórula, blastocisto e em tecidos linfóides e suas células (Pantaleon *et al*., 1997; Recher *et al*., 2001; Welniak *et al*., 2002; Zhan *et al*., 2005).

A produção hipofisária do GH é pulsátil, principalmente noturna, e regulada por uma série de fatores: Regulação positiva: (1) hormônio hipotalámico de liberação do GH (GHRH), que nos mamíferos é o mais importante fator neuroendócrino que promove a liberação do GH pré-sintetizado; (2) PROP1 e PIT1, fatores de transcrição que regulam a diferenciação de células hipofisárias em somatotróficas; (3) proteína de ligação do GH, que deriva da porção extracelular da molécula receptora do GH, estabiliza e transporta GH na circulação. Regulação negativa: (1) inibição da liberação do GH, mas não de sua síntese, dependente de

somatostatina; (2) regulação de retroalimentação negativa por IGF-1 (Zhan *et al*., 2005).

O GH exerce efeitos diversos, diretamente ou através de fatores de crescimento semelhante à insulina, incluindo: efeito diabetogênico, lipólise, aumento do transporte de aminoácidos nas células, aumento da síntese protéica, aumento do crescimento ósseo, aumento da massa magra do corpo, regulação na transcrição de genes específicos (por exemplo, na expressão do gene de IGF-1, no fígado), estimulação do metabolismo intermediário e modulação do sistema imune (Ray & Melmed, 1997; Chen *et al*., 1997; Murphy & Longo, 2000; Welniak *et al*., 2002).

Sobre o sistema imune, foi mostrado *in vitro* e *in vivo* que o GH é pleiotrópico em suas ações, influenciando na biologia de várias células do sistema linfo-hematopoiético. Num modelo de peritonite murino letal, o pré-tratamento dos animais com GH humano recombinante reduziu a contagem de bactérias peritoneal e aumentou os números de neutrófilos exsudativos com alta expressão do receptor de opsonina CD11b (Inoue *et al.*, 1998). Também, demonstrou-se que este hormônio promoveu a diferenciação de células pré-B em culturas de medula óssea, quando tratadas com GH (10 µg/L) por um dia (Sumita *et al*., 2005).

Várias alterações no sistema imune associadas com a deficiência de GH têm sido descritas. Essas alterações incluem defeitos profundos na imunidade de célula T, atividade e números reduzidos das células NK (matadoras naturais), produção de anticorpo reduzida, hipoplasia tímica, desenvolvimento de célula B anormal. Também, em pacientes adultos com hipopituitarismo, foi demonstrada uma elevação da concentração plasmática dos marcadores de ativação de monócitos, TNFα (Fator-α de necrose tumoral) e da IL-6, bem como, aumento *in vitro* na adesão de monócitos isolados daqueles pacientes a monocamadas confluentes de células endoteliais aórtica bovina (Serri *et al*., 1999).

Estudos têm mostrado que a fisiologia do timo é modulada pelo GH, como por exemplo, a atrofia tímica com o envelhecimento é

correlacionada ao declínio dos níveis de GH (Welniak *et al*., 2002). Ainda, a secreção de timulina, um hormônio tímico produzido por células epiteliais tímicas, é regulada positivamente pelo GH em várias espécies, incluindo humanos (Timsit *et al*., 1992).

Em linhagens epiteliais derivadas de células estromais tímicas, o tratamento com GH aumentou a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular com consequente modulação das interações entre células epiteliais tímicas/timócitos. Além disso, no contexto do complexo celular linfoepitelial (célula "nurse" tímica), a presença do GH afetou positivamente a migração de timócitos, evidenciados pelo aumento na entrada ou saída dos timócitos desses complexos (de Mello-Coelho *et al*., 1997).

No que se refere aos estudos sobre reconstituição imune, GH possui um papel importante na timopoiese em mamíferos, exercendo efeitos antiapoptóticos, estimulando a proliferação e ampliando outros sinais fisiológicos para a expansão de células T em tempos de estresse. Neste sentido, investigando os efeitos do GH sobre timopoiese em indivíduos adultos infectados com o vírus-tipo-1 da imunodeficiência humana (HIV-1), Napolitano *et al*., (2002) demonstraram aumento do tecido tímico em todos os pacientes após seis meses de terapia com GH, e que esta mudança no padrão de atrofia tímica foi acompanhada com um aumento nos números de células T $CD4^+$ virgens circulantes. Polgreen *et al*., (2007) mostraram hiperplasia tímica, sem alteração da microarquitetura do órgão, em crianças após três meses de tratamento com GH. Também, foi observado em crianças infectadas com HIV e deficientes para o GH, que terapia antiretroviral por longo período não foi efetiva na reconstituição imune; pois, naqueles pacientes, o volume tímico foi menor, a concentração de IL-7 foi reduzida, a produção de linfócitos T virgens foi diminuída, e que a deficiência do GH se associou com vias pós-tímicas alteradas (Vigano *et al*., 2004).

Recentemente, Napolitano *et al*., (2008) confirmaram e ampliaram seus estudos iniciais, usando fenotipagem de célula T e análise do número

de círculo de excisão do TCR (TREC). TREC é uma molécula de DNA circular episomal gerada durante o evento de recombinação dos segmentos gênicos, variável (V) e constante (J), da cadeia α do TCR, que em uma célula T permite uma estimativa do tempo desde que emigra do timo, definindo a célula que o apresenta, como uma emigrante recente tímica (RTE, do inglês) (Kong *et al*., 1999).

Examinando os efeitos do GH sobre o sistema imune de adultos infectados com HIV-1, durante os primeiros seis meses de terapia, o GH esteve envolvido no surgimento de massa tímica e aumento no número de células T $CD4^+$ virgens verdadeiras ($CD4^+CD45RA^+CD62L^+CD11a^{dim}$) e células T $CD4^+$ totais, apesar de não ter sido observado aumento no número TREC em células T virgens. Além dos efeitos do GH sobre células T, nenhuma mudança foi detectada em outras linhagens hematopoiéticas (linfócitos B, células NK, hemácias, neutrófilos, plaquetas, ou células $CD34^+$ circulantes) (Napolitano *et al*., 2008).

Em relação aos efeitos do GH sobre o sistema cardiovascular, tem sido relatado que deficiência ou excesso de GH está associado com risco aumentado para doenças cardiovasculares, notavelmente por disfunção endotelial, como relatado através de reatividade vascular anormal, espessura e rigidez arterial aumentadas em pacientes com deficiência de GH, bem como, prejuízo na resposta vasodilatadora para acetilcolina em camundongos transgênicos para GH bovino. Além disso, foram demonstradas perturbações nos níveis de vários fatores de crescimento vascular, principalmente na angiogenina, que correlacionou com o estado do GH (Capaldo *et al*., 2001; Irving *et al*., 2002; Silha *et al*., 2005; Andersson *et al*., 2006).

No geral, os dados sugerem que uma atividade normal do GH apresenta uma função antiaterogênica. Investigando o papel do GH na biologia da célula endotelial, particularmente na produção de óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), Thum *et al*., (2003) demonstraram que o tratamento *in vitro* com GH não provocou mudanças morfológicas ou qualquer sinal de

anormalidade em cultura endotelial EAhy926 confluente, apesar de terem verificado um aumento na expressão e atividade da enzima sintetase do NO endotelial (eNOS) e aumento na biodisponibilidade de NO. O óxido nítrico é considerado um importante mediador antiaterosclerótico capaz de conferir o fenótipo saudável do endotélio. Além disso, administração aguda com GH em indivíduos saudáveis estimulou a vasodilatação endotelial mediada pela ativação da via do óxido nítrico (Napoli *et al*., 2003).

Mudanças morfológicas causadas pela deficiência do GH, tal como, aumento na espessura íntima-média em artéria carótida comum, foi diminuída após três meses de tratamento com GH e este efeito benéfico foi mantido por dois anos alcançando valores similares ao grupo controle saudável (Pfeifer *et al*., 1999).

Os efeitos atribuídos ao GH são mediados pelo receptor de GH (GHR) na superfície das células alvo e já foi demonstrado, que em primatas o GH pode atuar também via receptor de prolactina. GHR é um membro da família de receptores citocinas tipo I, e para tanto, aciona vias de transdução de sinais que envolvem a enzima Janus-quinase (JAK2) e os fatores de transcrição STAT1, 3 e 5 (STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição) (Murphy & Longo, 2000).

O GHR é amplamente expresso em tecidos hematopoiéticos, incluindo a medula óssea em todas as linhagens hematopoiéticas e, no timo murino e humano em ambos os compartimentos, linfóide e não linfóide. Investigação sobre a expressão do GHR em células T murina, revelou as células imaturas DN e DP, e as células maduras $CD8^+$, como as subpopulações de timócitos com maior expressão. Quanto à expressão diferencial do GHR nas subpopulações de timócitos humano, as frequências mais elevadas de células GHR^+ foram encontradas dentro da população imatura, especificamente em células $CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ $CD19^-$ $CD34^+$ $CD2^+$ (um fenótipo caracterizando os progenitores de células T

mais imaturos no timo) (Gagnerault *et al*., 1996; de Mello-Coelho *et al*., 1998; Hattori *et al*., 2001).

Além disso, a expressão do GHR foi observada em células endoteliais de vasos ovarianos bovino durante a vida fetal, em capilares de tecido tumoral e em linhagem de célula endotelial humana (Kölle *et al*., 1998; Temmim *et al*., 2000; Thum *et al*., 2003).

Em conjunto essa introdução mostra que o GH participa da complexa rede de interações intersistemas, fundamental para a homeostasia do organismo, onde atua de forma pleiotrópica, como um imunomodulador, tendo o timo como um de seus órgãos alvo. Considerando a ação do GH sobre os processos de maturação e migração intratímica de células T, decidimos investigar o papel deste hormônio sobre a transmigração endotelial de timócitos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Interessados em contribuir para o estudo do controle neuroendócrino sobre o timo, investigamos o efeito imunomodulador do hormônio do crescimento no processo de transmigração endotelial de timócitos murinos *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingirmos a proposta geral, buscamos:

a) Avaliar se o GH modula a passagem de timócitos murinos por barreiras endoteliais;

b) Verificar o papel do GH na transmigração endotelial de timócitos frente à quimiocina CXCL12;

c) Determinar a influência do GH na expressão da molécula de adesão VCAM-1 e da quimiocina CXCL12 em células endoteliais tEnd.1;

d) Avaliar o controle do GH na expressão de receptores envolvidos na transmigração celular, tais como: a integrina VLA-4 e o receptor de quimiocina CXCR4 na superfície de timócitos transmigrados;

e) Analisar se o GH altera a expressão de receptores envolvidos na transmigração celular, tais como: a integrina VLA-4 e o receptor de quimiocina CXCR4 na superfície de timócitos transmigrados frente à quimiocina CXCL12.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 de 4-6 semanas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas e do Centro de Criação de Animais do Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 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 Imunohistologia – ICBS/UFAL e no Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo – IOC/Fiocruz, cujo espaço e materiais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Wilson Savino.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Alagoas, tendo sido aprovado (Processo nº 010323/2008-18).

3.2. Reagentes

Foram utilizados meio de cultura RPMI 1640, L-glutamina, solução salina com fosfato (PBS), solução tripsina-EDTA para células endoteliais em cultura e hormônio do crescimento humano recombinante (hGH), todos adquiridos da Sigma (St. Louis); a quimiocina CXCL12, obtida da R&D Systems; soro fetal bovino (SBF) (Cultilab); formaldeído (MERCK); clorofórmio e etanol (J.T. Baker).

3.3. Anticorpos

Foram utilizadas diluições apropriadas dos seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromo: anti-CD4/PercP, anti-CD8/APC, anti-CXCR4/PE e anti-CD49d (subunidade α4 da integrina VLA-4)/FITC. Como controle negativo de mesmo isotipo, foram usadas as seguintes imunoglobulinas (IgGs) monoclonais de rato: IgG2b/PE e IgG2b/FITC (todos os anticorpos foram adquiridos da Becton-Dickinson/PharMingen).

3.4. Cultura de células

As células endoteliais da linhagem tEnd.1 derivadas de endotelioma tímico murino (Figura 4), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 ou 75 cm^2, mantidas em condição estéril em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e 1% de L-glutamina a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de gás carbônico (CO_2). A passagem das células tEnd.1, por tratamento com solução tripsina-0,25% / EDTA-0,02% em solução livre de Ca^{2+} / Mg^{2+} por 5 minutos, foi feita quando estas alcançavam o estado de semiconfluência.

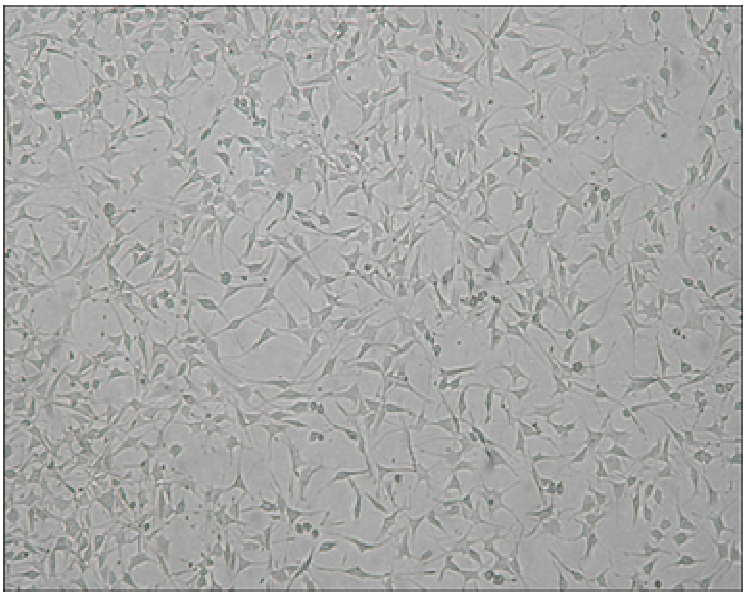

Figura 4. Fotomicrografia da cultura semiconfluente de células endoteliais tEnd.1. Linhagem de células endoteliais tEnd.1 derivadas de endotelioma tímico murino (isolada e caracterizada por Williams *et al.*, 1988). Aumento: 100x (Fotomicrografia produzida no Laboratório de Imunohistologia - ICBS/UFAL, por Adalberto Alves Martins Neto).

3.5. Obtenção de timócitos

O timo foi retirado em condição estéril, de camundongos da linhagem C57BL/6 eutanasiados por deslocamento cervical e foram macerados individualmente em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, para liberação dos timócitos. As células em suspensão, sem estroma

tímico, foram recolhidas em tubos de 15 ml e centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os timócitos depositados no fundo do tubo foram resuspendidos em meio RPMI 1640/ 10% de SBF, homogeneizados e contados em câmara de Neubauer.

3.6. Ensaio de transmigração endotelial de timócitos

Para o ensaio *in vitro* de transmigração endotelial de timócitos murinos, foi utilizado o sistema de *transwell*, empregando membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8.0 µm (Nunc, USA) (Johnson-Léger *et al*., 2002). Inicialmente, foi colocado 500 µl de meio RPMI 1640/ 10% de SBF no poço inferior da placa de 24 poços e as células endoteliais da linhagem tEnd.1 (2×10^5 tEnd.1/inserto, em 500 µl de meio RPMI 1640/ 10% de SBF), foram cultivadas sobre a membrana dos insertos *transwell*, durante 40 h. Após este período, as células endoteliais foram tratadas ou não por 8 h, com hormônio do crescimento (hGH) na concentração de 100 ng/ml, em 500 µl de meio RPMI 1640/ 2% de SBF. O tratamento sempre foi realizado em ambos os lados da membrana, para garantir um tratamento homogêneo das células endoteliais cultivadas. Depois das 48 h, as células tEnd.1 formaram uma monocamada na membrana dos insertos, sobre a qual, foram adicionados os timócitos (2×10^6 timócitos/inserto, em 500 µl de meio RPMI 1640/ 10% de SBF) previamente tratados ou não com hGH [100 ng/ml], durante 1 h. Na câmara inferior, foi colocado previamente o mesmo volume do meio de cultura, ou meio de cultura com o fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. A transmigração celular foi desenvolvida por 18 h, em estufa regulada a 5% de CO_2 e a 37°C. Posteriormente, os timócitos transmigrados na câmara inferior foram recolhidos, contados em câmara de Neubauer e marcados com anticorpos de interesse para posteriormente serem analisados por citometria de fluxo (ver figura 5).

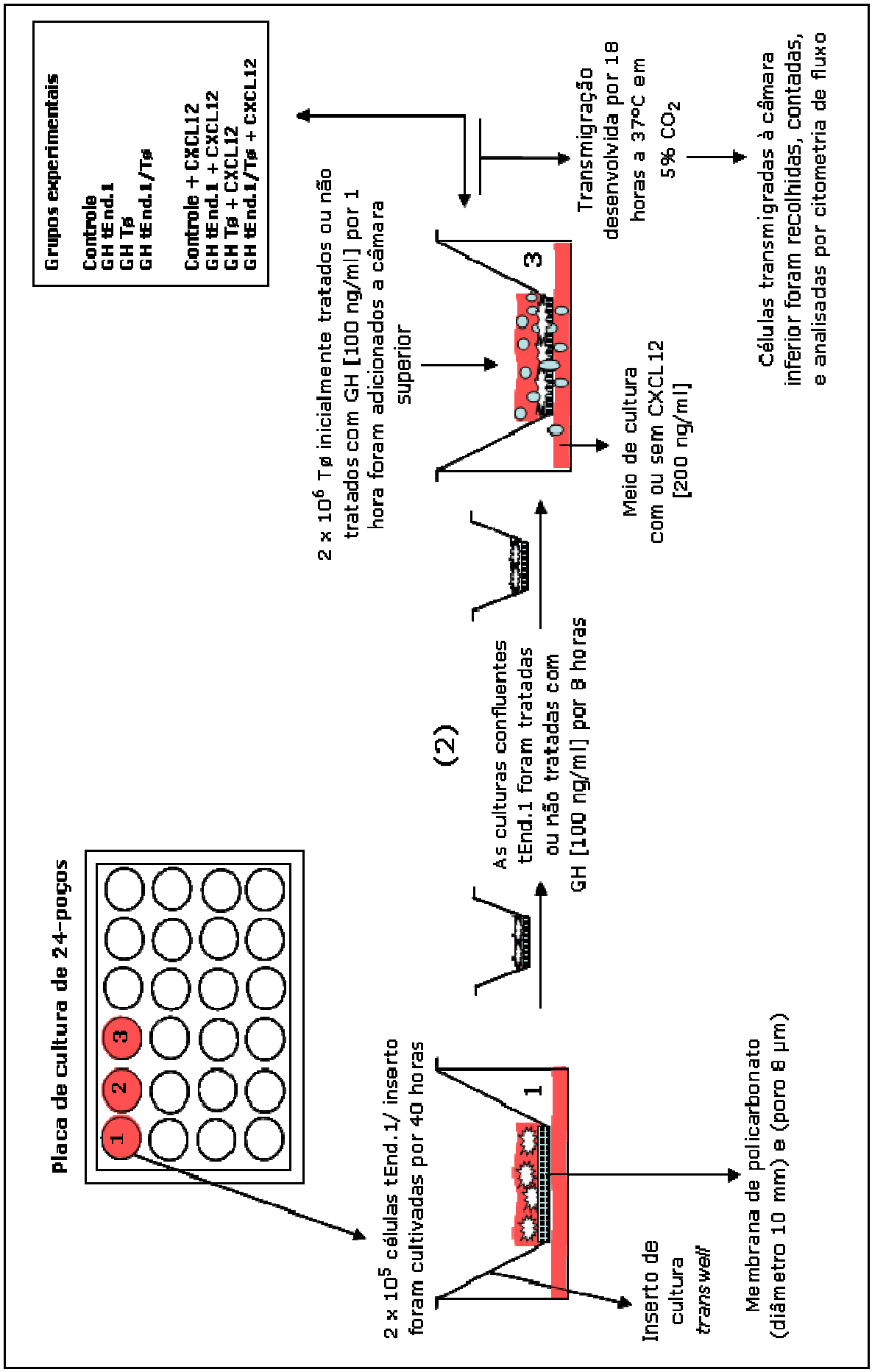

Figura 5. Representação esquemática do ensaio de transmigração endotelial de timócitos (Tø) sob efeito do hormônio do crescimento (GH) e/ou na presença da quimiocina CXCL12.

3.7. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite contar e analisar células individuais, identificadas por seus antígenos. O princípio básico dessa técnica consiste em aspirar as células em suspensão, previamente marcadas com corantes fluorescentes conjugados a anticorpos específicos para antígenos celulares. As células são forçadas a passar através de um fluxo contínuo de líquido, permitindo a interceptação individual por um ou mais *lasers* com comprimento de onda característico para excitar os fluorocromos (excitação e emissão de luz num determinado comprimento de onda). Os elementos óticos e eletrônicos coletam o grau e direção da luz dispersa, e os pulsos de fluorescência, e enviam os valores convertidos ao computador para análise.

Este recurso foi utilizado para avaliação do fenótipo definido pelos marcadores CD4 e CD8, e a expressão do receptor de quimiocina CXCR4 e da integrina VLA-4 na superfície dos timócitos transmigrados nas situações experimentais de transmigração descritas anteriormente. Para isso, os timócitos foram colocados em microplacas de fundo em "U" e incubados por 20 minutos a 4°C, na ausência de luz, com uma mistura dos seguintes anticorpos apropriadamente diluídos em PBS: anti-CD4/PercP, anti-CD8/APC, anti-CXCR4/PE e anti-CD49d/FITC. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, recolhidas e fixadas em formaldeído 1%, 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. Foi determinada uma região excluindo células não viáveis usando os parâmetros: tamanho x granulosidade. As imunoglobulinas IgG2b/PE e IgG2b/FITC foram utilizadas como controle negativo para definirmos as populações negativa e positiva, em relação à expressão de CXCR4 e VLA-4. Para as análises, foi utilizado o software WinMDI® versão 2.8.

3.8. Real time (RT)-PCR

3.8.1. Iniciadores de oligonucleotídeos

Inicialmente, foram desenhados iniciadores específicos para os genes de interesse: CXCL12, VCAM-1, β2-microglobulina (sequências dos oligonucleotídeos dos diferentes iniciadores utilizados são apresentadas na tabela 1, sintetizados por Alpha DNA – Notre Dame St. W), utilizando as seguintes sequências de referência encontradas no *Gen Bank*: CXCL12: **NM_013655.3**; VCAM-1: **NM_011693.2**; β2-microglobulina: **NM_009735.3**. Para o desenho daqueles iniciadores, foram utilizados os programas, gene runner (versão 3.05) e primer 3 (versão online 0.4.0), e tiveram eles as seguintes características: o iniciador direto hibridizando na junção de dois éxons, e o iniciador reverso hibridizando dentro do éxon e a 60 pares de base (pb) de distância do iniciador direto. Além disso, os iniciadores desenhados foram exclusivos para cDNA e os *amplicons* analisados tiveram o mesmo tamanho (100 pb).

Tabela 1

Iniciadores usados para a amplificação do cDNA

Nome	Sequência	Posição
VCAM-1 (direto)	**CACGTGGACATCTACTCTTTCC**	Éxon 2/3
VCAM-1 (reverso)	**TGTCTGGAGCCAAACACTTG**	Éxon 3
CXCL12 (direto)	**GCTCTGCATCAGTGACGGTA**	Éxon 1/2
CXCL12 (reverso)	**AGGATTTTCAGATGCTTGACG**	Éxon 2
β2-microglobulina (direto)	**GCTATCCAGAAAACCCCTCA**	Éxon 1/2
β2-microglobulina (reverso)	**GCGGGTGGAACTGTGTTA**	Éxon 2

3.8.2. Extração do RNA total das preparações de células endoteliais tEnd.1

As células endoteliais tEnd.1 ($2x10^5$ células/garrafa) foram cultivadas por um período de 40 h, em garrafas de cultura de 25 cm^2 em condição estéril com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e 1% de L-glutamina a 37°C, num ambiente umedificado com 5% de gás carbônico (CO_2). Após este período, as culturas tEnd.1 foram tratadas ou não com GH, na concentração de 100 ng/ml, em 4 ml de meio RPMI 1640/ 2% de SBF, durante 8 h. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e as células aderidas em cada garrafa foram homogeneizadas com 1 ml/garrafa de solução *Tri reagent* (*Applied Biosystems*), com o auxílio de um raspador em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo, o homogeneizado de cada garrafa foi transferido para um tubo de microcentrífuga devidamente rotulado, sendo adicionado a cada um deles, 200 µl de clorofórmio para a separação de fases por meio de centrifugação refrigerada (-3°C) a 7200 rpm, por 10 minutos. Depois, foi transferido 400 µl da fase aquosa (RNA) de cada tubo, para um novo tubo, também rotulado, e foi adicionado individualmente 200 µl de etanol puro.

Para a purificação final do RNA foram utilizados os filtros e soluções de lavagem do conjunto *RiboPure Blood* (*Applied Biosystems*). Neste momento, o homogeneizado com etanol de cada tubo, foi submetido à passagem por um filtro portando uma membrana de vidro carregada positivamente. Os RNAs retidos nas membranas foram lavados com as soluções de lavagem 1 e 2 para limpar do clorofórmio e dos sais, e depois, foram separados das membranas por incubação em temperatura ambiente, por 2 minutos, ao tampão de eluição previamente aquecido (*Elution Buffer*) e centrifugados a 14500 rpm, por 9 min, para obtenção do *pellet*.

3.8.3. Transcrição reversa e RT-PCR

A transcrição reversa do RNA total (12,5 µl/reação) para DNA complementar (cDNA), feita de acordo ao protocolo de utilização do *kit* de transcrição reversa cDNA de alta capacidade (*Applied Biosystems*, 2006), seguiu as seguintes condições do termociclador: etapa 1 (anelamento dos iniciadores randômicos), 25°C/10 min; etapa 2 (construção da fita de DNA complementar pela transcriptase reversa), 37°C/120min; etapa 3 (desnaturação da transcriptase reversa), 85°C/5seg; etapa 4 (estabilização do cDNA), 4°C/24h. Após essas etapas, foi realizada à quantificação relativa para VCAM-1 e CXCL12 nos grupos experimentais utilizando como controle interno, o gene da β2-microglobulina e como calibrador de comparação o grupo controle (célula tEnd.1 não tratada com GH). A detecção dos sinais de amplificação ocorreu num termociclador de PCR em tempo real modelo 7500 (*Applied Biosystems*), utilizando o *kit* PCR SyBr Green master mix (*Applied Biosystems*), com as seguintes condições: etapa 1 (1 ciclo): 95°C/10min; etapa 2 (40 ciclos – termociclagem padrão do software SDS System 7500): 95°C/15seg e 60°C/1min.

3.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). Os resultados foram analisados através do teste t de *Student*. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel® (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism® 4.00 (San Diego, CA, USA), respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1. GH modula a transmigração *in vitro* de timócitos murinos através de células endoteliais tEnd.1.

Inicialmente analisamos nas diferentes condições de tratamento das células endoteliais tEnd.1 e/ou timócitos com GH [100 ng/ml], o número total de timócitos transmigrados por barreiras endoteliais tEnd.1, após 18 horas de transmigração. Comparando cada grupo experimental sob tratamento com GH ao grupo controle (sem tratamento), observamos o efeito imunomodulador do GH somente na situação experimental em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas, por 8 horas, registrando uma redução estatisticamente significativa na capacidade transmigratória dos timócitos. Entre os grupos tratados com GH, verificamos que a transmigração desenvolvida nas condições de tratamento dos timócitos, por uma hora, aumentou significativamente em comparação àquela em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas (Figura 6).

Examinando a transmigração nas mesmas condições de tratamento das células endoteliais tEnd.1 e/ou timócitos com GH e ainda, sob influência da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml] como fator quimiotático, também notamos uma redução estatisticamente significativa no número total de timócitos transmigrados nas condições em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas com GH, quando comparamos ao grupo controle (sem tratamento). Porém, observamos em relação ao grupo controle, um aumento estatisticamente significativo no número total de timócitos transmigrados na condição em que apenas estas células foram tratadas com GH. No grupo experimental de tratamento para ambas as células, a transmigração dos timócitos atingiu valores semelhantes ao do grupo controle (Figura 7).

Relacionando o número total de timócitos transmigrados de cada grupo experimental sob tratamento com GH, na ausência da quimiocina

CXCL12 ao seu correspondente na presença desta quimiocina, notamos que a capacidade quimioatraente ocorreu principalmente nos grupos em que os timócitos foram submetidos ao tratamento com GH, por uma hora, pois somente nestes grupos, a presença da quimiocina CXCL12 promoveu um aumento estatisticamente significativo na capacidade transmigratória dos timócitos, quando comparados aos seus correspondentes sem a quimiocina (Figura 8).

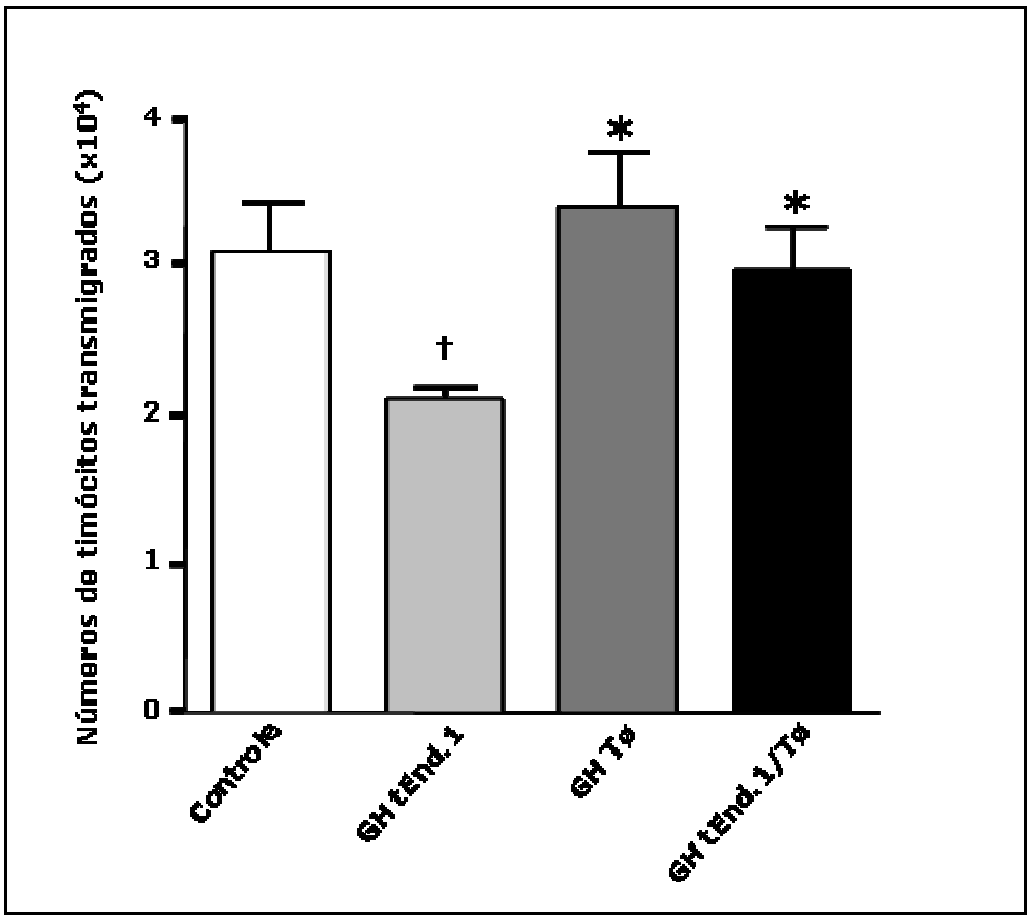

Figura 6. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) sobre a transmigração de timócitos murinos (Tø) através de células endoteliais da linhagem tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente. Grupo controle: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$.

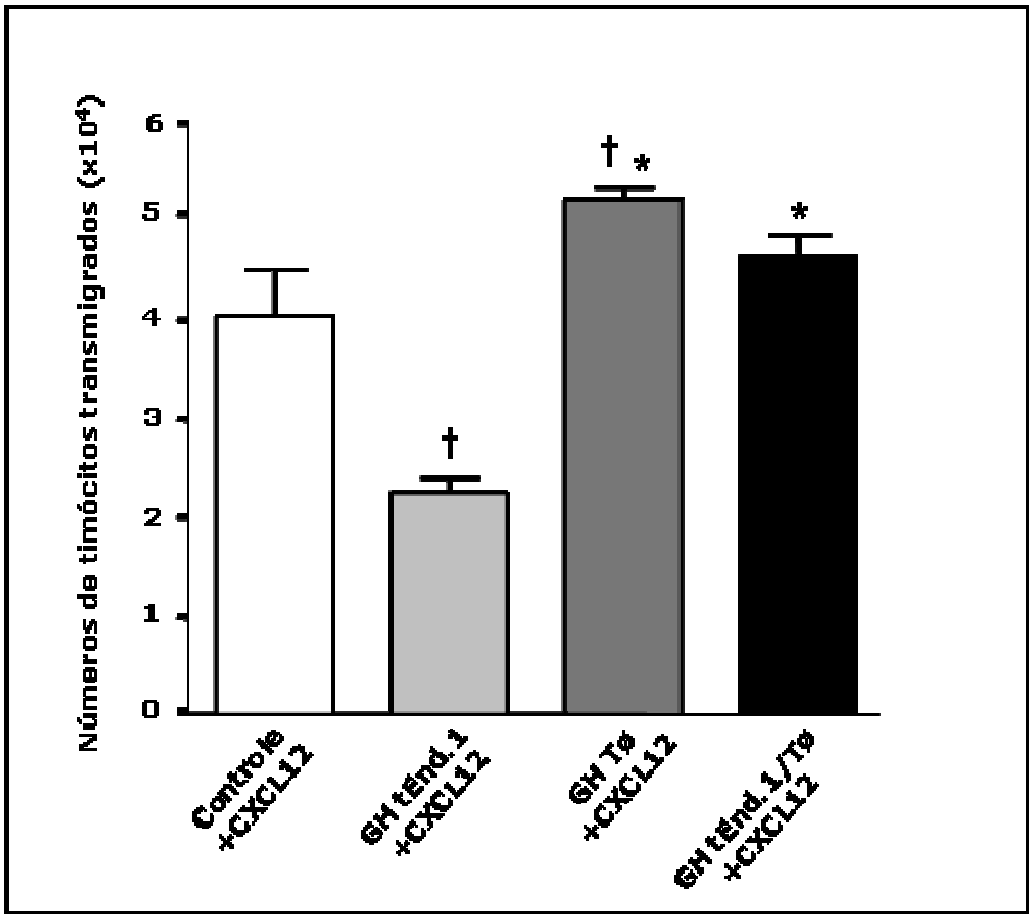

Figura 7. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na presença da quimiocina CXCL12 sobre a transmigração de timócitos murinos (Tø) através de células endoteliais da linhagem tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e ainda sob influência do fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. Grupo controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de quatro experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle + CXCL12; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1 + CXCL12. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$.

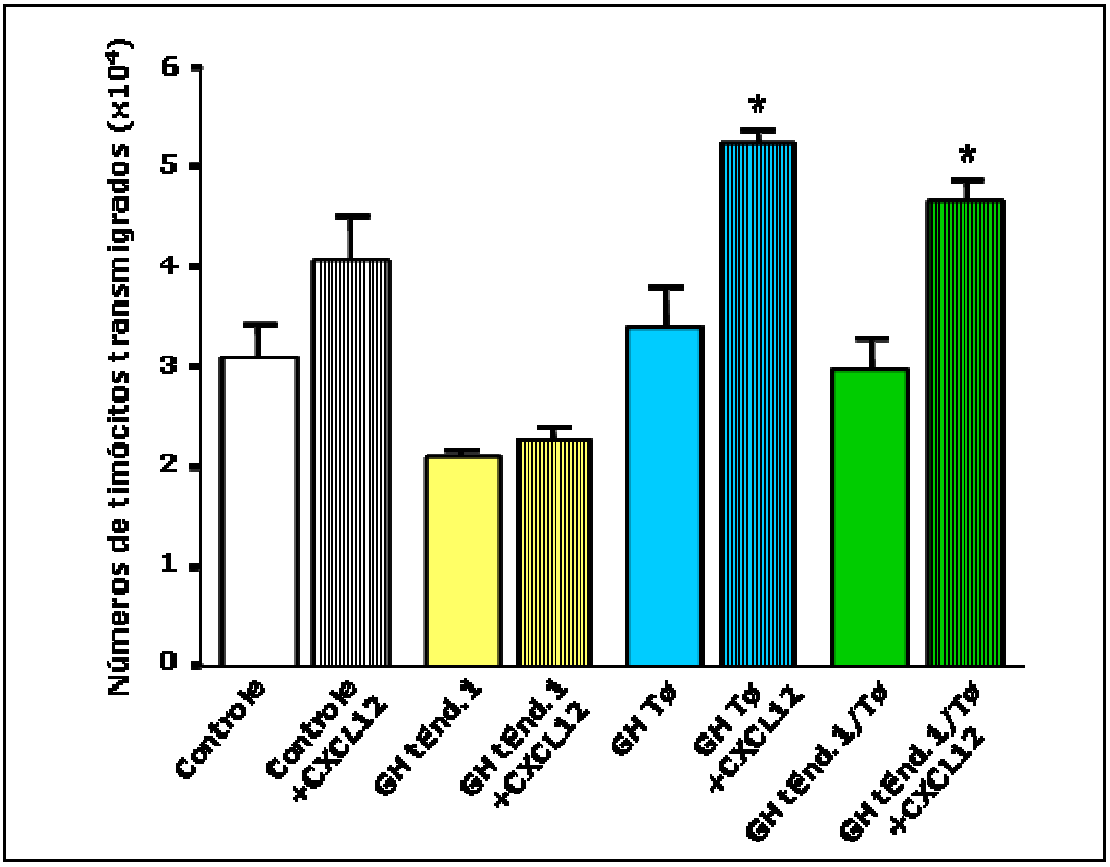

Figura 8. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 sobre a transmigração de timócitos murinos (Tø) através de monocamadas endoteliais tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis (grupos experimentais na ausência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais na presença da CXCL12) experimentos independentes. * estatisticamente significativo em relação ao grupo correspondente na ausência da CXCL12. A análise estatística, para comparar as diferenças entre cada grupo experimental na ausência da CXCL12 ao seu correspondente na presença desta quimiocina foi feita através do teste t de Student: * $p \leq 0,05$.

4.2. GH mantêm seu efeito imunomodulador na transmigração de timócitos por células endoteliais tEnd.1 nas diferentes subpopulações CD4/CD8 quando em conjunto com CXCL12

Considerando que o GH modulou em determinadas situações experimentais o número total de timócitos transmigrados, tornou-se interessante analisarmos o fenótipo CD4/CD8 destas células. Na figura 9, observamos um resultado representativo da análise por citometria de fluxo mostrando o perfil citofluorimétrico de expressão CD4/CD8 dos timócitos transmigrados, em cada grupo experimental definido pelo tratamento das células endoteliais tEnd.1 e/ou timócitos com GH e na ausência ou presença da CXCL12. A partir dos percentuais de timócitos transmigrados em cada subpopulação, como mostrados na figura 9, calculamos os números absolutos e relativos de timócitos transmigrados para as subpopulações CD4/CD8 nos diferentes grupos experimentais.

Realizando a transmigração na ausência da quimiocina CXCL12, vimos que, o efeito imunomodulador do GH, na concentração de 100 ng/ml, ocorreu somente na subpopulação $CD4^{+}CD8^{+}$ (DP). Na situação em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas com GH, por 8 horas, registramos uma diminuição estatisticamente significativa no número total de timócitos DP transmigrados em relação ao grupo controle (não tratado). Ainda, verificamos que, quando os timócitos foram tratados com GH, por uma hora, a capacidade transmigratória das células DP alcançou valores semelhantes à condição controle, recuperando o efeito de bloqueio na transmigração observado quando apenas as células tEnd.1 foram tratadas. Não registramos nenhuma diferença estatisticamente significativa na transmigração dos timócitos imaturos $CD4^{-}CD8^{-}$ (DN) e dos timócitos maduros $CD4^{+}CD8^{-}$ (CD4SP) e $CD4^{-}CD8^{+}$ (CD8SP), quando os grupos tratados com GH foram comparados ao grupo controle (sem tratamento) ou relacionados entre si (Figura 10).

Analisando a transmigração na presença da quimiocina CXCL12, notamos que todas as subpopulações de timócitos revelaram uma redução estatisticamente significativa na transmigração destas células no grupo em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas com GH em comparação ao grupo controle (sem tratamento), e que este bloqueio foi revertido no grupo em que os timócitos foram tratados, atingindo valores semelhantes ao controle. Além disso, a ação conjunta do GH e CXCL12 causou um aumento estatisticamente significativo no número absoluto das células DP transmigradas, quando somente os timócitos foram tratados com GH, por uma hora, em relação ao grupo controle (Figura 11).

Relacionando cada grupo experimental sob tratamento com GH na ausência da quimiocina CXCL12 ao seu correspondente na presença desta quimiocina nas diferentes subpopulações de timócitos, vimos que, no compartimento celular DN a presença da quimiocina somente teve influência no grupo controle, já que o número absoluto de timócitos DN transmigrados aumentou significativamente no grupo controle com CXCL12 comparado ao controle sem a quimiocina. Na subpopulação DP, percebemos a ação quimiotática para CXCL12 em todas as situações experimentais se relacionados aos seus correspondentes sem quimiocina. Nas subpopulações de timócitos CD4SP e CD8SP, a ação da quimiocina modulou negativamente a transmigração, principalmente no grupo experimental em que apenas as células endoteliais tEnd.1 foram submetidas ao tratamento com GH, relacionado ao seu correspondente sem o fator quimiotático (Figura 12).

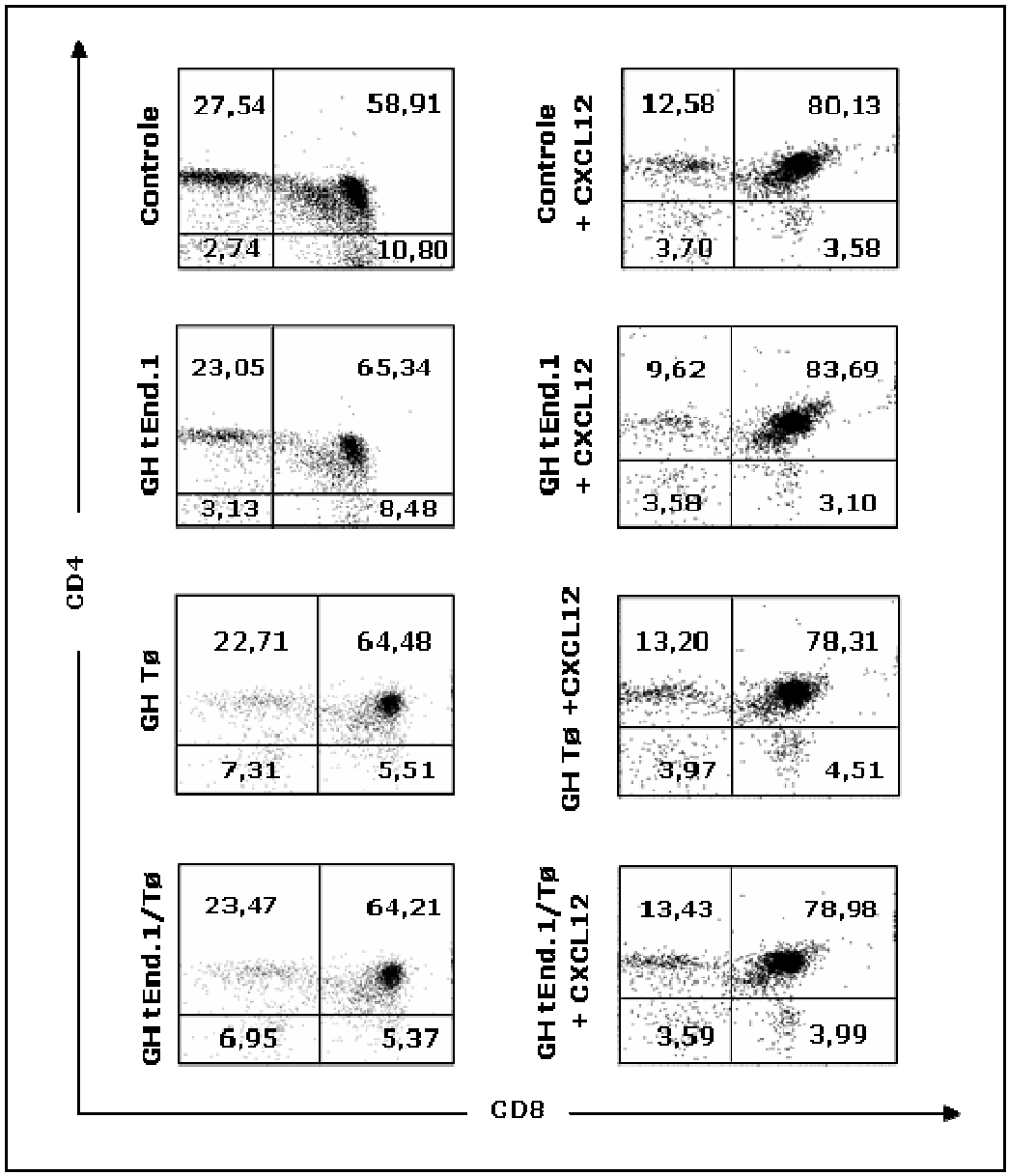

Figura 9. Expressão das moléculas co-receptoras CD4 e CD8 por timócitos (Tø) transmigrados através de células endoteliais tEnd.1. Os *dot plots* apresentam nos quatro quadrantes, o número percentual de Tø transmigrados contribuindo para cada uma das subpopulações CD4/CD8 nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. Grupo controle e controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada *dot plot* é o representativo da média percentual de seis (grupos experimentais sem CXCL12) e quatro (grupos experimentais sob influência da CXCL12) experimentos independentes.

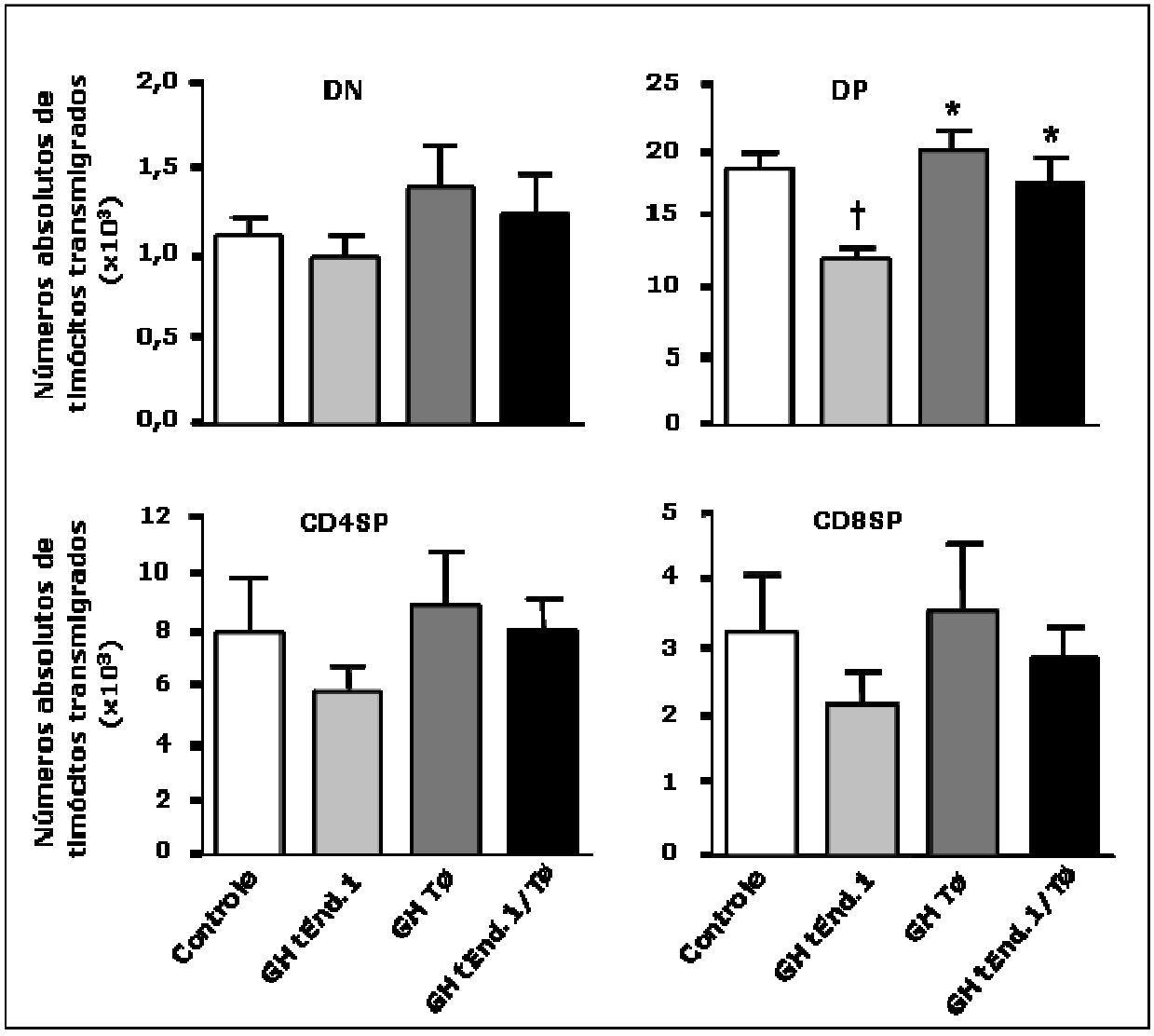

Figura 10. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) sobre o número absoluto das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nas subpopulações determinadas pelas moléculas CD4 e CD8, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente. Grupo controle: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

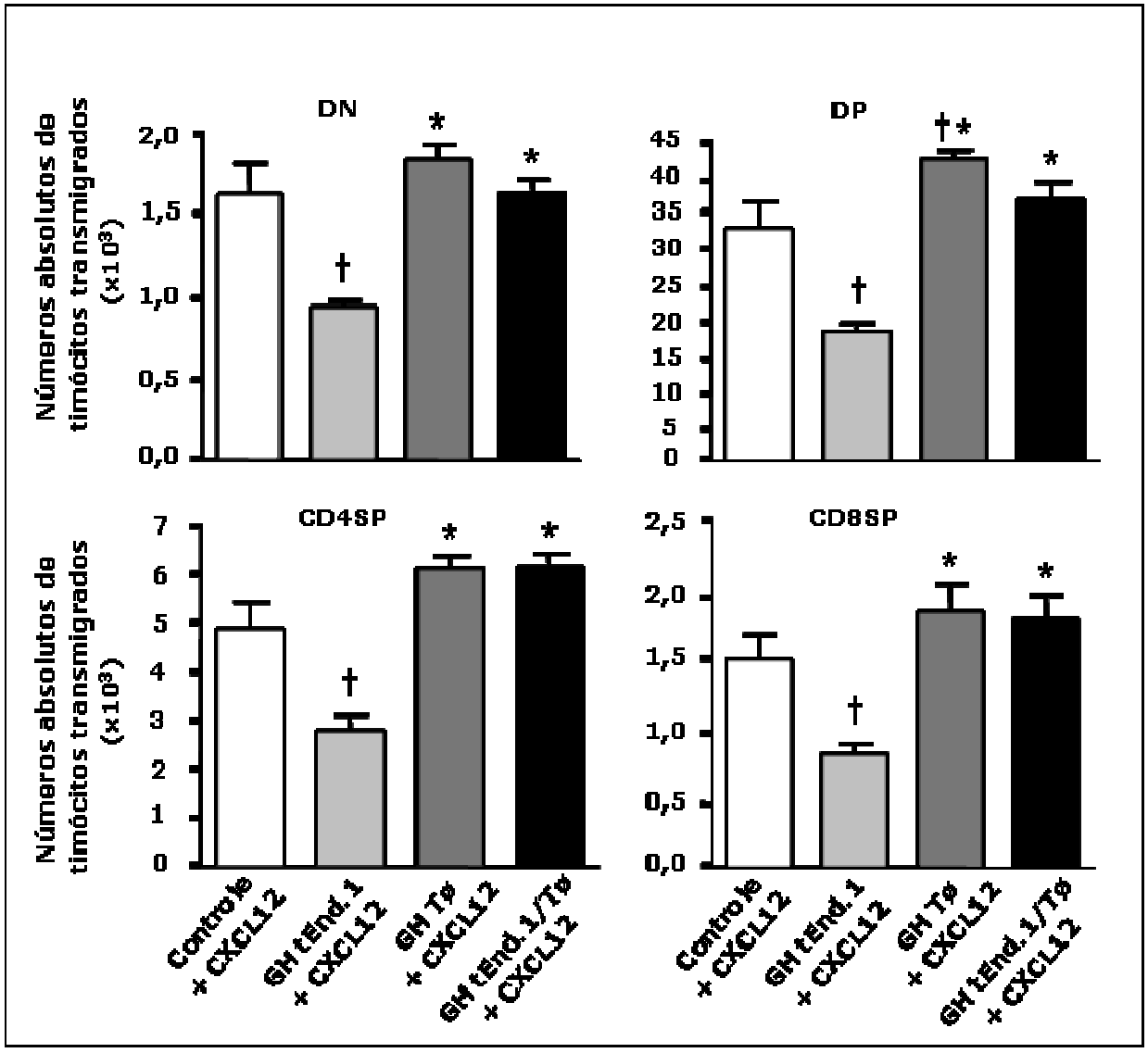

Figura 11. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na presença da quimiocina CXCL12 sobre o número absoluto das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nas subpopulações determinadas pelas moléculas CD4 e CD8, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e ainda sob influência do fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. Grupo controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de quatro experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle + CXCL12; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1 + CXCL12. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

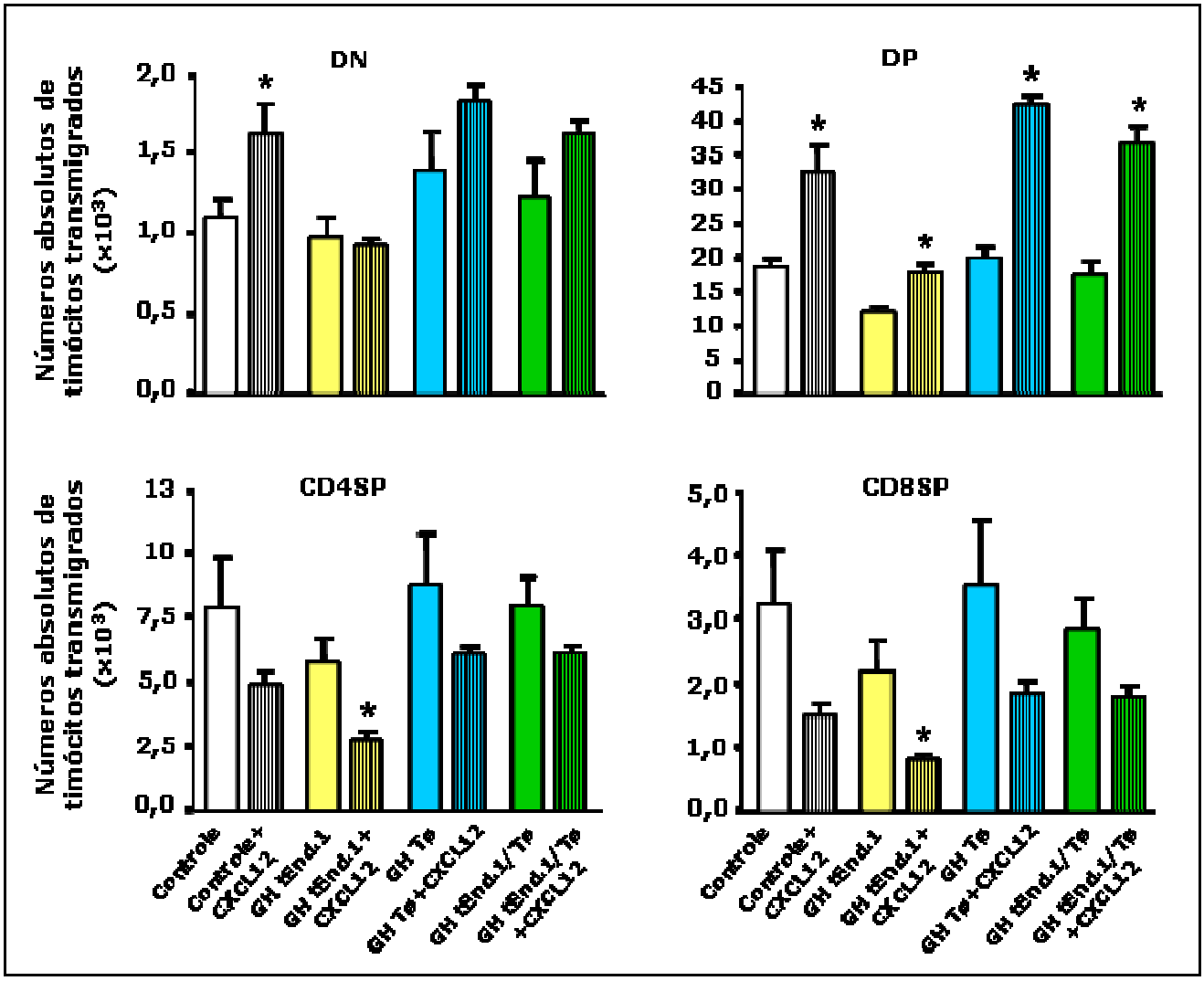

Figura 12. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 sobre o número absoluto das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel mostra, número total de Tø transmigrados nas subpopulações determinadas pelas moléculas CD4 e CD8, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis (grupos experimentais na ausência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais na presença da CXCL12) experimentos independentes. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. * estatisticamente significativo em relação ao grupo correspondente na ausência da CXCL12. A análise estatística para comparar as diferenças entre cada grupo experimental na ausência da CXCL12 ao seu correspondente na presença desta quimiocina foi feita através do teste t de Student: * $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

4.3. GH em adição a CXCL12 aumenta a passagem de células DP e CD4SP através de barreiras endoteliais

Dentre os parâmetros analisamos na avaliação do perfil transmigratório das subpopulações de timócitos, utilizamos também o número relativo, isto é, o valor matemático determinado pela razão percentual entre o número total de cada subpopulação definida pelos marcadores CD4/CD8 de timócitos transmigrados pelo número total da subpopulação correspondente na condição antes de migrar.

Através desta análise vimos que, a transmigração dos timócitos nas diferentes condições de tratamento das células endoteliais tEnd.1 e/ou timócitos com GH [100 ng/ml] e na ausência da quimiocina CXCL12, apresentou resultados similares àqueles já descritos em números absolutos, em que, na subpopulação DP ocorreu um bloqueio na transmigração quando somente as células endoteliais tEnd.1 foram tratadas com GH, por 8 horas, em comparação ao grupo controle. Esta redução na quantidade de células DP transmigradas não se manteve quando os timócitos também foram tratados com GH, por uma hora, alcançando valores semelhantes ao controle. Ainda, efeitos semelhantes pela utilização do GH foram notados no compartimento CD4SP. Neste caso, apesar de não registrarmos diferença estatisticamente significativa quando comparamos a capacidade transmigratória dos timócitos nos grupos de tratamento com GH em relação ao grupo controle, notamos um aumento no número relativo das células CD4SP transmigradas nas condições onde os timócitos foram tratados com GH, por uma hora, em relação àquele em que apenas as células tEnd.1 foram tratadas, por 8 horas (Figura 13).

Realizando a transmigração na presença da CXCL12 [200 ng/ml], observamos em todas as subpopulações transmigradas, uma diminuição estatisticamente significativa na transmigração dos timócitos no grupo em que somente as células tEnd.1 foram tratadas com GH quando comparamos ao grupo controle. Notamos a recuperação deste efeito nas

diferentes subpopulações quando os timócitos também foram tratadas com GH. Vimos ainda que, sob influência da CXCL12, ocorreu em relação ao grupo controle, um aumento estatisticamente significativo no número relativo das células DP e CD4SP na condição em que apenas os timócitos foram tratados com GH (Figura 14).

Comparando os grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou timócitos com GH aos seus correspondentes com adição da CXCL12, observamos que nas células DP, em todos os grupos experimentais, a presença da quimiocina aumentou o número relativo de timócitos transmigrados quando comparados aos seus correspondentes sem quimiocina. No compartimento CD4SP, registramos uma modulação negativa estatisticamente significativa na capacidade transmigratória dos timócitos no grupo em que somente as células tEnd.1 foram tratadas com GH e na presença da CXCL12 em relação ao seu correspondente na ausência desta quimiocina. Para as subpopulações DN e CD8SP, não registramos diferença significativa entre os grupos experimentais correspondentes na presença ou na ausência da CXCL12 (Figura 15).

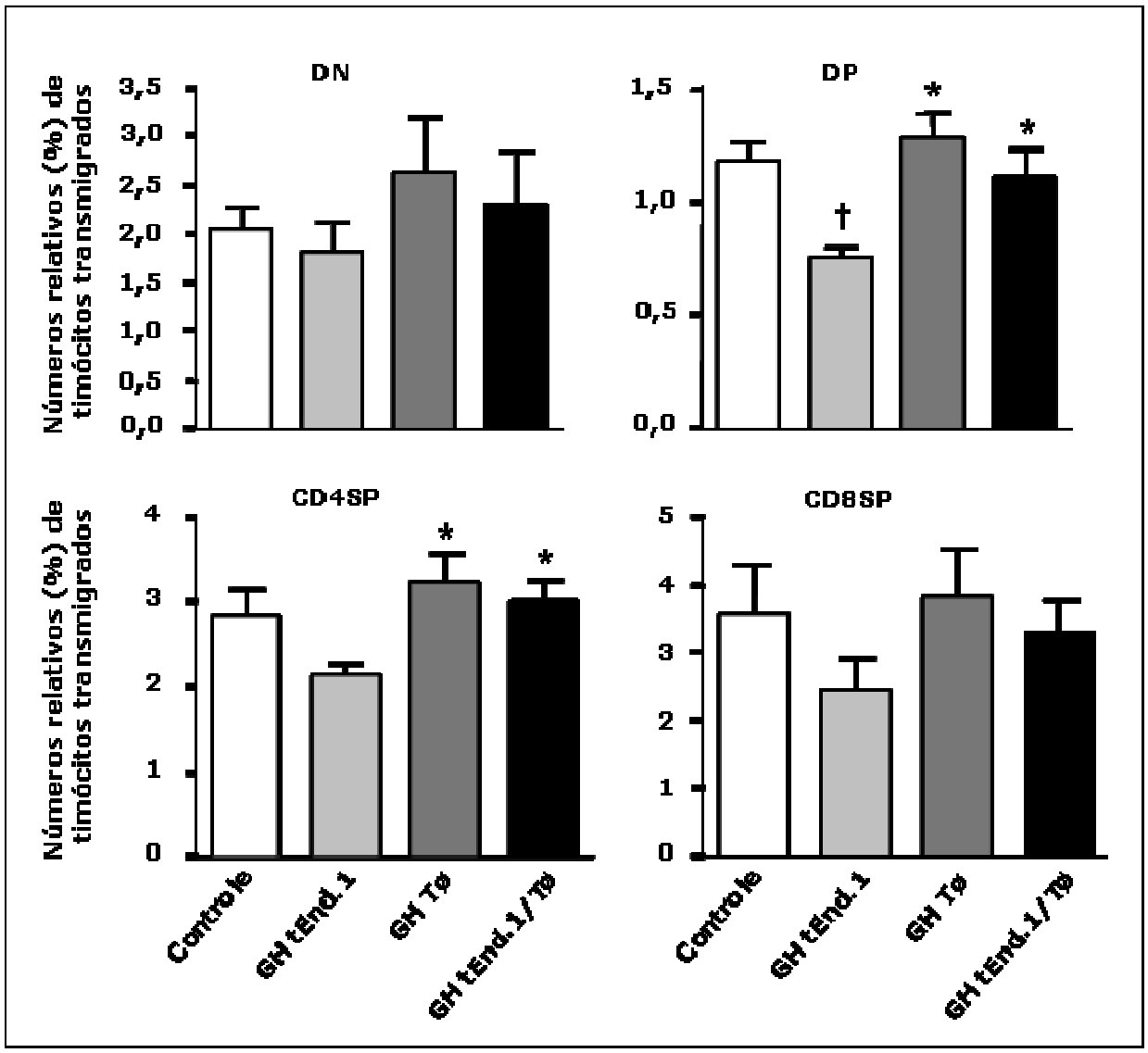

Figura 13. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) sobre o número relativo das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel exibe, a razão percentual entre o número total de cada subpopulação CD4/CD8 de Tø transmigrados pelo número total da subpopulação correspondente na condição antes de migrar, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente. Grupo controle: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

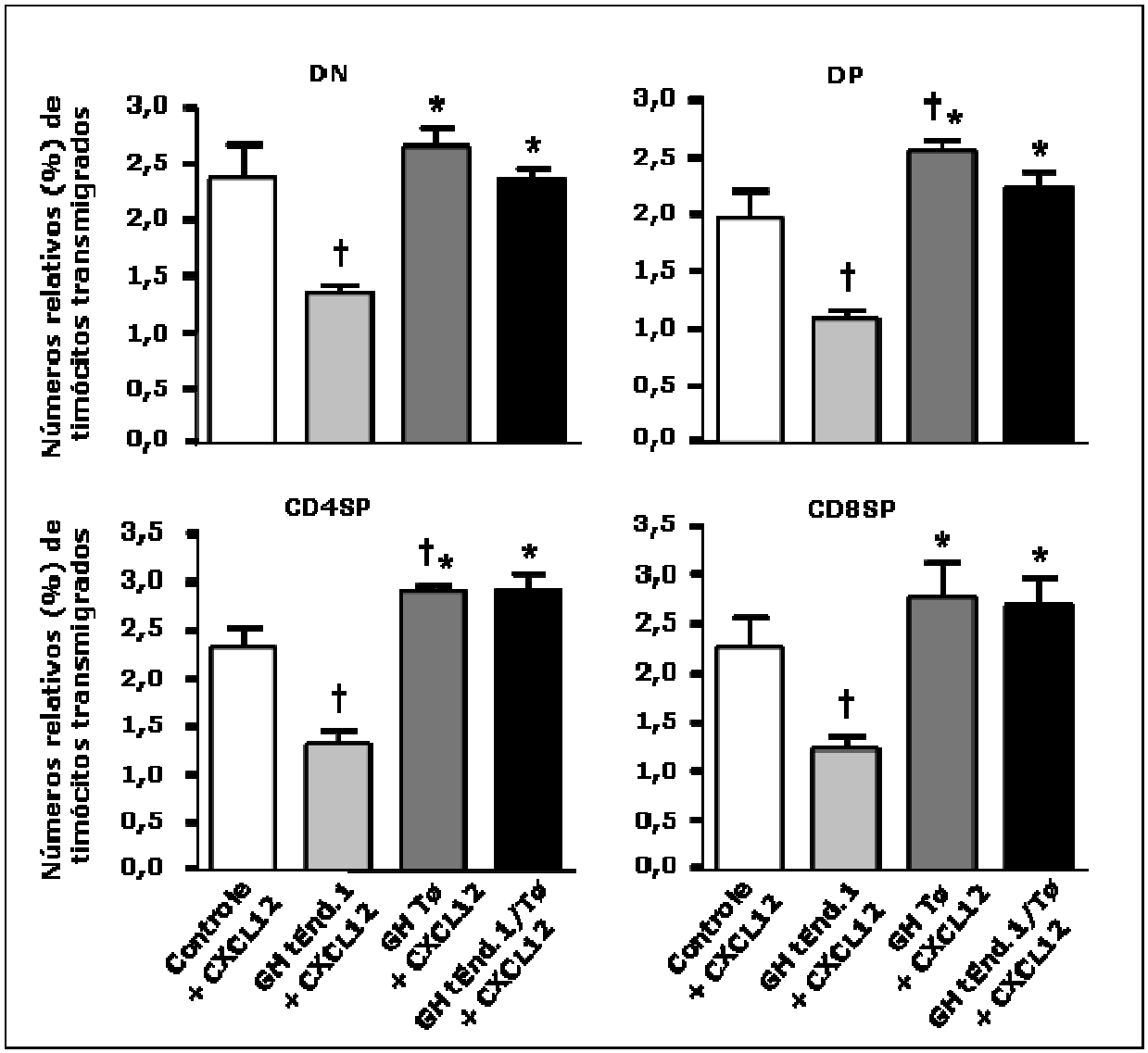

Figura 14. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na presença da quimiocina CXCL12 sobre o número relativo das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel exibe, a razão percentual entre o número total de cada subpopulação CD4/CD8 de Tø transmigrados pelo número total da subpopulação correspondente na condição antes de migrar, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e sob influência do fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. Grupo controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de quatro experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle+CXCL12; * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1+CXCL12. Teste t de Student: †,* $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

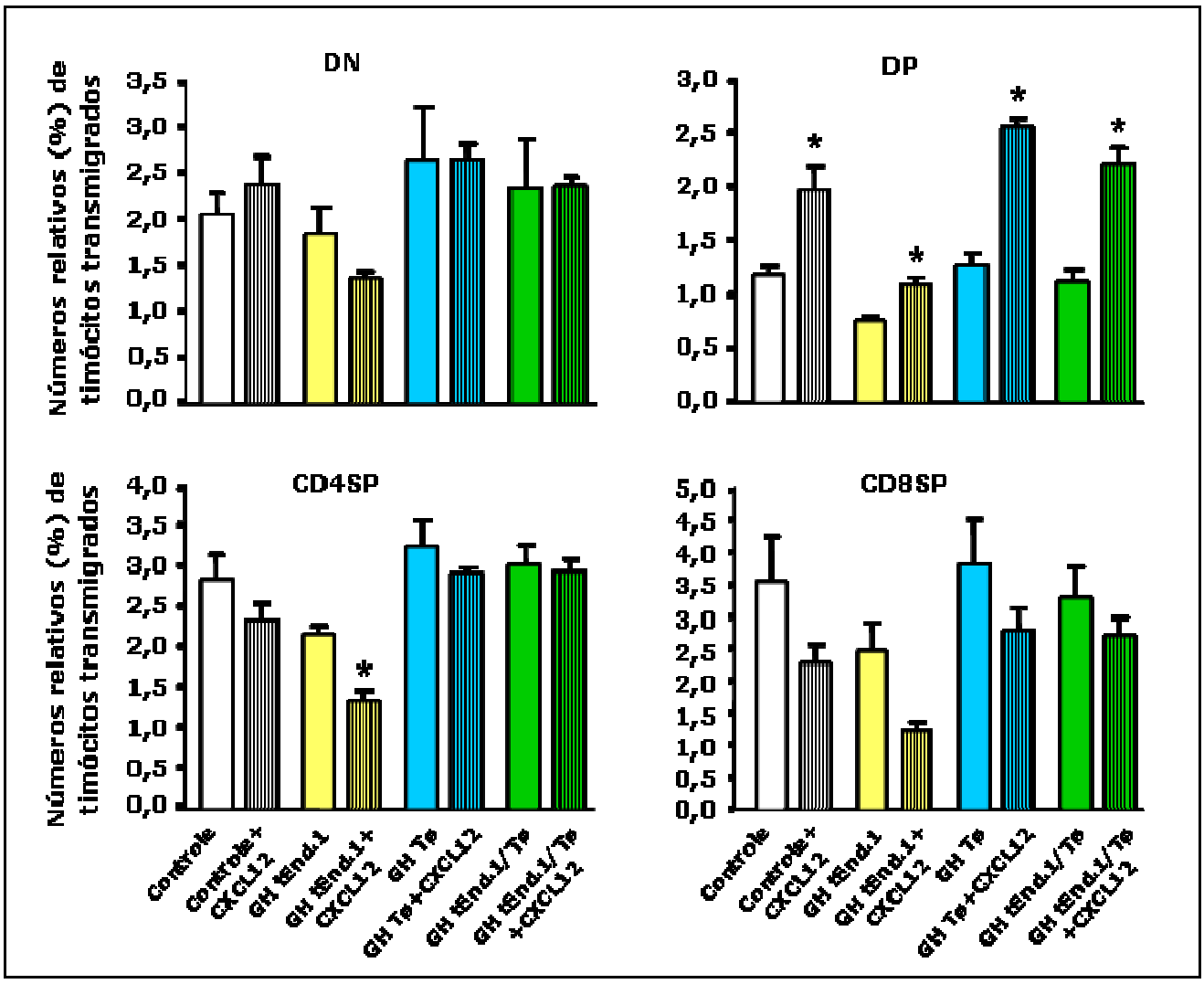

Figura 15. Efeitos do hormônio do crescimento (GH) na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 sobre o número relativo das subpopulações de timócitos murinos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel mostra, a razão percentual entre o número total de cada subpopulação CD4/CD8 de Tø transmigrados pelo número total da subpopulação correspondente na condição antes de migrar, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Cada coluna gráfica representa a média ± EPM de seis (grupos experimentais na ausência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais na presença da CXCL12) experimentos independentes. * estatisticamente significativo em relação ao grupo correspondente na ausência da CXCL12. A análise estatística para comparar as diferenças entre cada grupo experimental na ausência da CXCL12 ao seu correspondente na presença desta quimiocina foi feita através do teste t de Student: * $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

4.4. A expressão de VCAM-1 e CXCL12 por células endoteliais tEnd.1 é mantida pelo efeito do GH

Considerando os resultados anteriores e sabendo que a transmigração celular depende, além de outros eventos biológicos, das interações entre ligantes e receptores, o que confere uma mensagem molecular necessária para disparar uma cascata de sinalização que culmina em motilidade da célula, é que foi avaliado se o GH influencia a expressão de algumas dessas moléculas relevantes em transmigração.

Pelo sistema de PCR em tempo real quantitativo (sistema taqman) posteriormente à reação de transcrição reversa do RNA total extraído e purificado, avaliamos em células endoteliais tEnd.1 em cultura confluente nas condições não tratadas ou tratadas com GH, na concentração 100 ng/ml, durante 8 horas (tempo de tratamento semelhante ao utilizado no ensaio de transmigração), o nível do mRNA para a molécula de adesão VCAM-1 e para a quimiocina CXCL12.

Identificamos que as células endoteliais tEnd.1 são positivas para essas moléculas.

Observamos através da quantificação relativa que a síntese do mRNA para VCAM-1 e do mRNA para CXCL12 não revelou alteração na condição de tratamento com GH quando comparada ao grupo controle (células tEnd.1 não tratadas) (Figura 16).

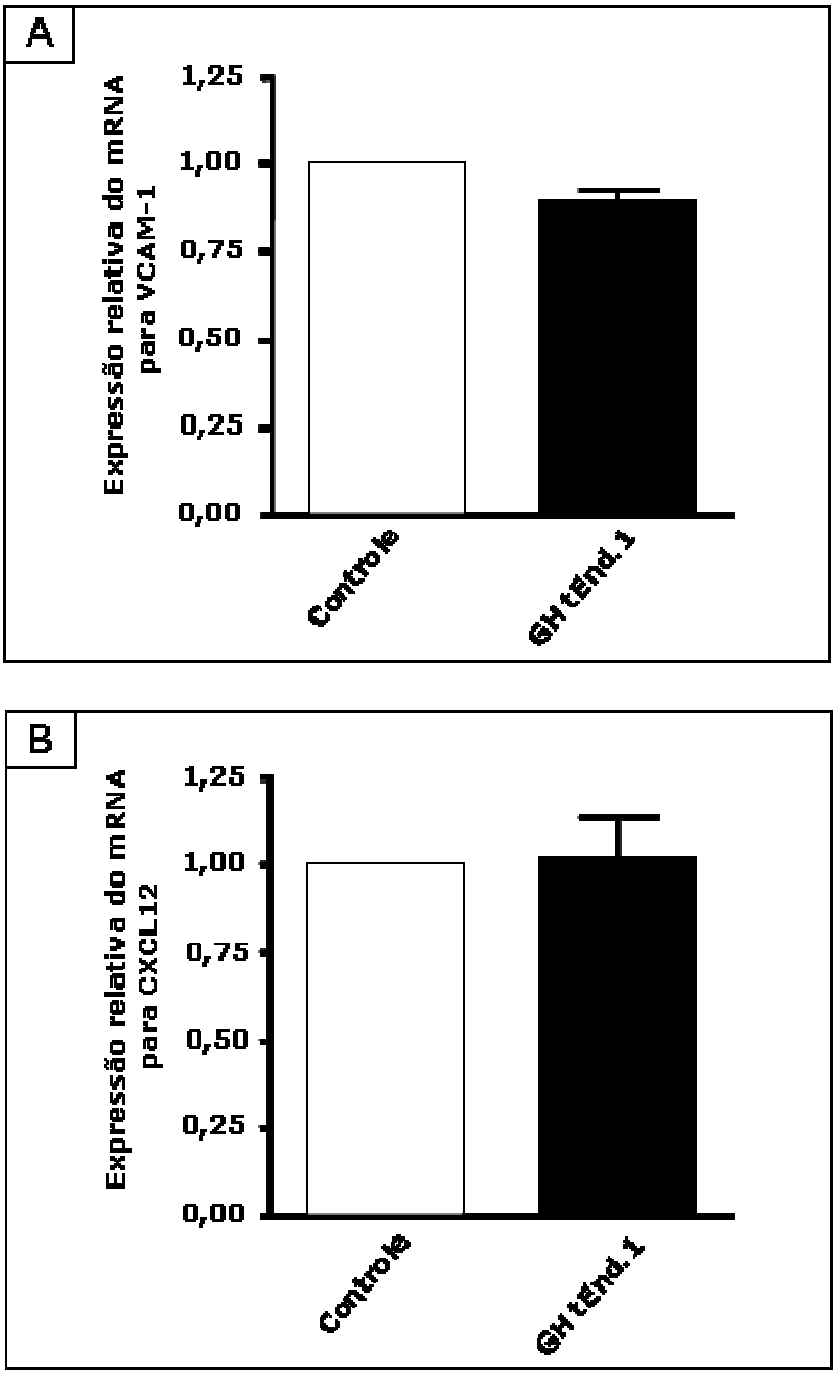

Figura 16. Ação do hormônio do crescimento (GH) sobre a expressão de VCAM-1 e CXCL12 por células endoteliais tEnd.1. Painel **A**: Quantidade do mRNA para VCAM-1 no grupo experimental em que as células tEnd.1 foram tratadas com GH [100 ng/ml], por 8 horas, em relação ao grupo controle (sem tratamento) normalizado para 1. Painel **B**: Quantidade do mRNA para CXCL12 no grupo experimental em que as células tEnd.1 foram tratadas com GH [100 ng/ml], por 8 horas, em relação ao grupo controle (sem tratamento) normalizado para 1. Estes resultados representam a média ± EPM de três experimentos independentes.

4.5. Expressão de CXCR4 é diminuída em timócitos tratados com GH e sob influência da CXCL12 após transmigração endotelial

Tendo em vista, os efeitos do GH na transmigração de timócitos, procuramos determinar se este hormônio poderia, também, apresentar efeitos sobre a expressão de receptores presentes nestas células e que sabidamente, estão envolvidos na transmigração.

Analisamos por citometria de fluxo, a expressão dos receptores VLA-4 e CXCR4 sobre timócitos transmigrados através de células endoteliais tEnd.1, nas mesmas condições de tratamento das células com GH [100 ng/ml] e na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 [200 ng/ml]. Apresentamos os valores através de histogramas com o número percentual de timócitos positivos para estes receptores (M1) e o número percentual de timócitos com alta expressão para estes receptores (M2). O traço citofluorimétrico em preto representa a marcação obtida com imunoglobulinas não-relacionadas.

Com o ensaio de transmigração na ausência da quimiocina, verificamos que a expressão das moléculas receptoras VLA-4 e CXCR4 sobre timócitos totais transmigrados não foram alteradas pelo GH em nenhuma condição de tratamento (Figuras 17 e 18 - histogramas superiores).

Desenvolvendo a transmigração na presença da CXCL12, não registramos nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão de VLA-4 relacionando os grupos experimentais (Figura 17, histogramas inferiores). Porém, para a expressão de CXCR4, vimos que em relação ao grupo controle com quimiocina, cujo percentual de timócitos transmigrados positivos para esta molécula foi de 75,86±1,14, o número percentual de timócitos positivos para CXCR4 diminuiu significativamente nos grupos em que os timócitos foram tratados com GH para 67,44±3,20 e 68,61±2,68 (Figura 18, histogramas inferiores).

Quando analisamos a expressão dos receptores VLA-4 e CXCR4 no total de timócitos transmigrados, comparando cada grupo experimental sem influência da CXCL12 com cada grupo experimental na presença desta quimiocina, observamos que nos grupos com quimiocina ocorreu aumento estatisticamente significativo no percentual de timócitos com alta expressão (M2) de VLA-4 em todos os grupos experimentais (ausência da CXCL12: 38,80±5,74, 39,63±6,53, 40,04±5,51 e 40,29±5,32; presença da CXCL12: 73,07±2,36, 73,42±2,54, 69,09±3,20 e 69,67±2,97). Não registramos diferença significativa quanto à expressão de CXCR4 por esta análise (Figuras 17 e 18, histogramas superiores versus histogramas inferiores).

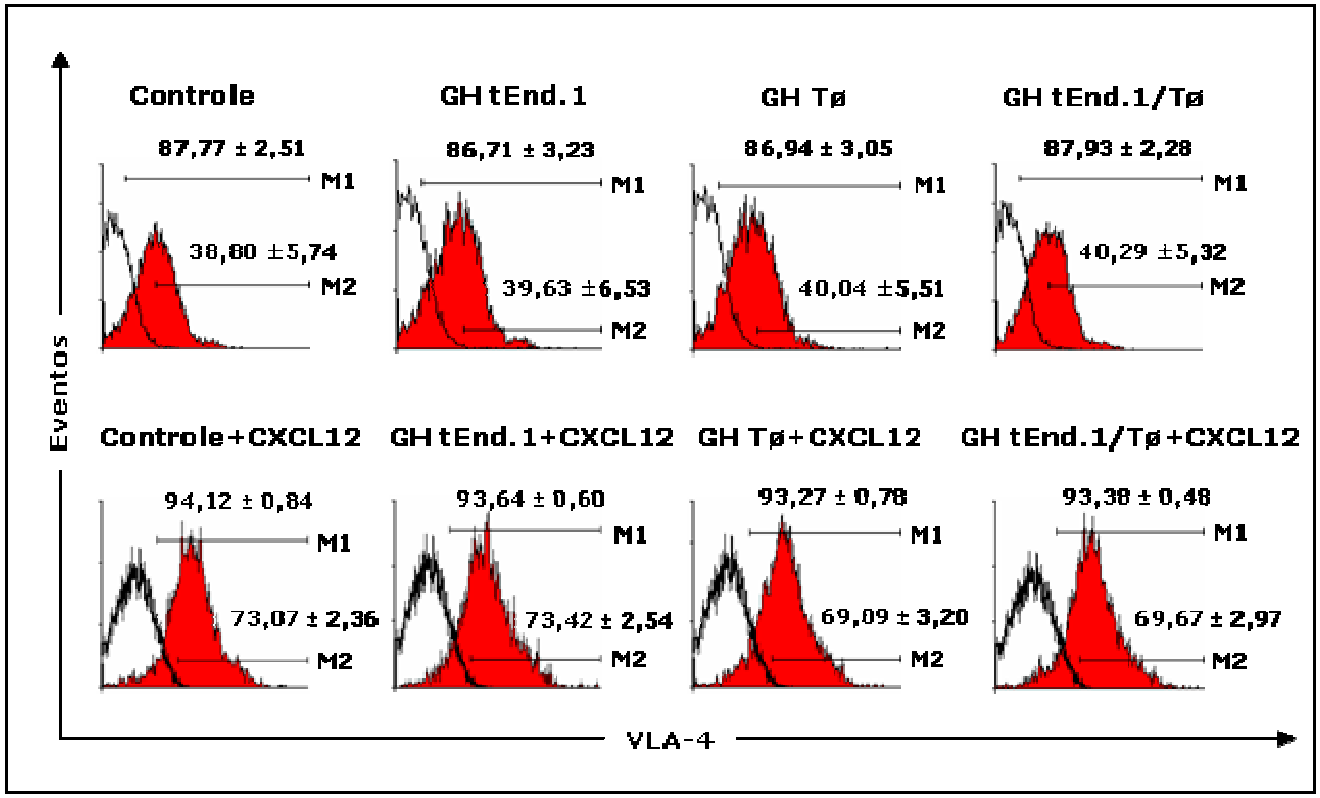

Figura 17. Ação do hormônio do crescimento (GH) na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 sobre a expressão de VLA-4 por timócitos (Tø) transmigrados através de células endoteliais tEnd.1. O painel mostra, número percentual de Tø transmigrados que expressam em sua membrana a integrina VLA-4, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são apresentados como a média percentual ± EPM de seis (histogramas superiores) e quatro (histogramas inferiores) experimentos independentes. O percentual de Tø com alta expressão de VLA-4 (M2), entre cada grupo experimental sem influência da CXCL12 quando comparado com cada grupo experimental sob influência desta quimiocina revelou uma diferença estatisticamente significativa. Teste t de Student: $p \leq 0,05$. O traço citofluorimétrico, em preto, representa a marcação obtida com imunoglobulina não-relacionada (IgG2b). M1: percentual de Tø positivos para VLA-4; M2: percentual de Tø com alta expressão de VLA-4.

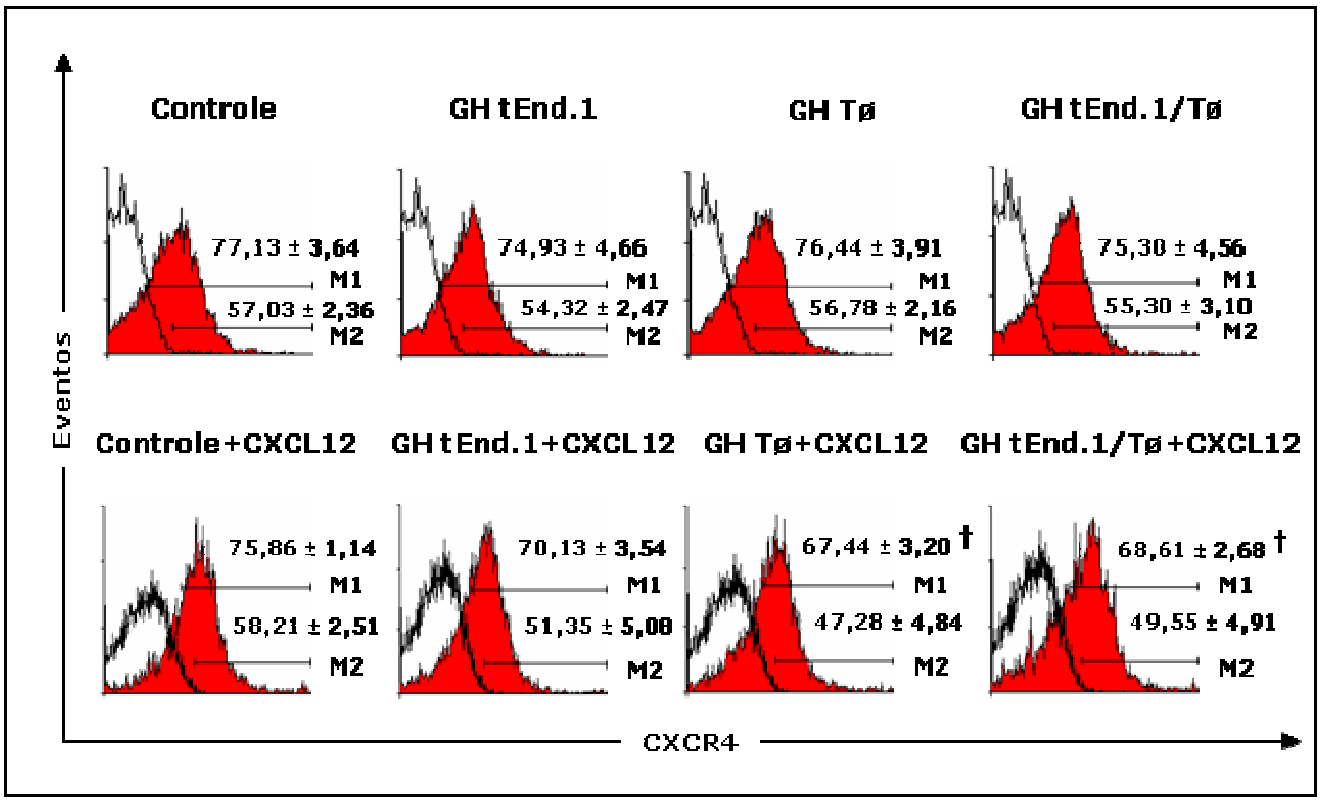

Figura 18. Ação do hormônio do crescimento (GH) na ausência ou presença do fator quimiotático CXCL12 sobre a expressão de CXCR4 por timócitos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1. O painel representa, número percentual de Tø transmigrados que expressam em sua membrana o receptor de quimiocina CXCR4, nos diferentes grupos experimentais definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com GH [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, e na ausência ou presença da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são apresentados como a média percentual ± EPM de seis (histogramas superiores) e quatro (histogramas inferiores) experimentos independentes. † estatisticamente significativo em relação à expressão correspondente no grupo controle+CXCL12. Teste t de Student: † $p \leq 0,05$. O traço citofluorimétrico, em preto, representa a marcação obtida com imunoglobulina não-relacionada (IgG2b). M1: percentual de Tø positivos para CXCR4; M2: percentual de Tø com alta expressão de CXCR4.

4.6. Expressão de VLA-4 é mantida em timócitos CD4/CD8 transmigrados mesmo sob ação conjunta do GH e CXCL12

Analisando a expressão do receptor integrina VLA-4 nas subpopulações de timócitos transmigrados, não observamos alteração estatisticamente significativa quando comparamos os grupos experimentais na ausência da quimiocina CXCL12. Porém, avaliando os grupos experimentais na presença desta quimiocina, notamos que no compartimento celular CD8SP ocorreu um aumento estatisticamente significativo no percentual de células positivas para VLA-4, no grupo em que apenas os timócitos foram tratados com GH (96,85±0,42) quando comparado aos grupos em que as células endoteliais tEnd.1 foram tratadas (93,97±0,62; 93,79±1,04). Através da análise comparativa entre os grupos experimentais sem quimiocina aos seus correspondentes com quimiocina, evidenciamos que a utilização da CXCL12 como fator quimiotático, não alterou o percentual de células positivas para VLA-4 (Tabela 2).

Quanto à alta expressão da molécula receptora VLA-4 nas subpopulações de timócitos transmigrados, não registramos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos experimentais na ausência da quimiocina CXCL12, bem como, quando comparamos os grupos experimentais na presença desta quimiocina. Entretanto, para todas as subpopulações de timócitos transmigrados, observamos aumento estatisticamente significativo no percentual de células com alta expressão de VLA-4 quando comparamos os grupos experimentais sem influência da CXCL12 aos grupos experimentais sob influência desta quimiocina (Tabela 3).

Tabela 2. Expressão do receptor VLA-4 sobre timócitos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1

Grupos experimentais	Subpopulações de timócitos definidas CD4/CD8			
	DN	DP	CD4SP	CD8SP
Controle	85,11±3,36	82,75±3,69	92,76±2,39	93,24±2,77
GH tEnd.1	87,49±2,51	81,04±4,48	91,53±3,42	92,84±3,18
GH Tø	87,46±3,17	81,98±4,00	91,38±3,09	92,42±3,46
GH tEnd.1/Tø	90,38±2,06	82,58±3,33	92,10±2,44	92,72±3,22
Controle + CXCL12	93,18±1,50	90,83±1,16	91,55±2,21	90,90±3,18
GH tEnd.1 + CXCL12	92,70±1,31	89,70±0,83	93,63±0,70	93,97±0,62
GH Tø + CXCL12	91,16±2,20	88,73±1,35	93,00±1,22	96,85±0,42*,•
GH tEnd.1/Tø + CXCL12	93,53±2,22	88,57±0,77	94,12±1,14	93,79±1,04

Os grupos experimentais foram definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com hormônio do crescimento (GH) [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, bem como, sob influência da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são expressos como a média percentual dos timócitos transmigrados VLA-4 positivos ± EPM, de seis (grupos experimentais sem influência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais sob influência da CXCL12) experimentos independentes. * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1+CXCL12, • estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1/Tø+CXCL12. Teste t de Student: *,• $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

Tabela 3. Alta expressão do receptor VLA-4 sobre timócitos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1

Grupos experimentais	Subpopulações de timócitos definidas CD4/CD8			
	DN	**DP**	**CD4SP**	**CD8SP**
Controle	66,42±3,78	10,30±2,33	27,58±5,30	40,68±4,66
GH tEnd.1	67,59±4,26	10,97±2,79	25,12±6,03	38,95±5,92
GH Tø	65,07±3,89	11,46±2,25	28,29±5,37	41,74±4,63
GH tEnd.1/Tø	66,63±2,81	12,06±2,63	29,45±6,33	40,23±6,50
Controle + CXCL12	83,68±1,75	71,32±2,40	76,52±3,52	81,13±3,66
GH tEnd.1 + CXCL12	83,91±2,47	71,03±2,69	78,58±2,37	87,01±0,63
GH Tø + CXCL12	80,97±2,60	66,10±3,52	76,54±2,84	88,36±1,47
GH tEnd.1/Tø + CXCL12	85,32±3,85	66,38±2,70	77,78±3,12	83,65±3,16

Os grupos experimentais foram definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com hormônio do crescimento (GH) [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, bem como, sob influência da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são expressos como a média percentual dos timócitos transmigrados com alta expressão de VLA-4 ± EPM, de seis (grupos experimentais sem influência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais sob influência da CXCL12) experimentos independentes. Em todas as subpopulações CD4/CD8, a comparação entre cada grupo experimental sem CXCL12 com cada grupo experimental sob influência desta quimiocina revelou uma diferença estatisticamente significativa. Teste t de Student: $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

4.7. Expressão de CXCR4 é diminuída no compartimento celular DP após transmigração endotelial de timócitos tratados com GH e sob influência da CXCL12

Analisando o percentual de células positivas para o receptor de quimiocina CXCR4 nas subpopulações de timócitos CD4/CD8 transmigrados, não registramos diferença significativa entre os grupos experimentais na ausência da quimiocina CXCL12. Entretanto, confrontando os grupos na presença da CXCL12, percebemos na subpopulação DP, uma diminuição estatisticamente significativa no percentual de células expressando CXCR4 nas situações experimentais em que os timócitos foram influenciados pela ação conjunta do GH/CXCL12 (77,31±2,04; 78,46±1,92) quando comparamos ao grupo controle com CXCL12 (84,09±0,88) (Tabelas 4).

Comparando os grupos experimentais sem quimiocina aos grupos com quimiocina, observamos na subpopulação DP, que em relação ao controle (87,58±2,03), a presença da CXCL12 diminuiu significativamente o número percentual de timócitos transmigrados positivos para CXCR4, nos grupos experimentais em que as células tEnd.1 e/ou timócitos foram tratados com GH (79,47±2,22; 77,31±2,04; 78,46±1,92) (Tabela 4).

Analisando o percentual de células com alta expressão de CXCR4 nas subpopulações transmigradas, não encontramos diferença significativa quando os grupos experimentais sem quimiocina ou os grupos com quimiocina foram comparados entre si. Porém, quando comparamos os grupos sem influência do fator quimiotático CXCL12 aos grupos experimentais sob influência da quimiocina, percebemos na subpopulação DP, uma diminuição estatisticamente significativa no percentual de células com alta expressão de CXCR4, nos grupos em que os timócitos foram tratados com GH e quimioatraídos por CXCL12 (49,58±4,69; 52,32±4,86) em relação ao grupo controle (64,81±2,58) e ao grupo em que somente os timócitos foram tratados com GH (62,95±3,51). Na subpopulação CD4SP, na situação controle com CXCL12 (39,75±6,20), a presença desta

quimiocina, aumentou o número percentual de timócitos transmigrados com alta expressão de CXCR4, quando comparamos ao controle sem quimiocina (19,14±3,58), ou em relação aos grupos em que somente as células endoteliais tEnd.1 (22,74±4,55) ou apenas os timócitos (26,15±2,55) foram tratados com GH e não influenciados pelo fator quimiotático (Tabela 5).

Tabela 4. Expressão do receptor CXCR4 sobre timócitos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1

Grupos experimentais	Subpopulações de timócitos definidas CD4/CD8			
	DN	**DP**	**CD4SP**	**CD8SP**
Controle	79,68±6,38	87,58±2,03	49,22±7,10	70,74±4,26
GH tEnd.1	80,42±5,76	84,32±3,29	52,32±6,92	69,91±5,91
GH Tø	79,52±6,13	85,46±2,93	55,12±5,36	70,47±5,29
GH tEnd.1/Tø	79,55±6,06	84,10±2,86	55,65±7,32	70,78±5,17
Controle + CXCL12	80,70±1,81	84,09±0,88	66,71±3,25	69,05±3,90
GH tEnd.1 + CXCL12	74,74±4,07	79,47±2,22‡	57,63±5,04	65,50±3,12
GH Tø + CXCL12	71,87±4,46	77,31±2,04‡†	55,39±4,39	66,86±3,13
GH tEnd.1/Tø + CXCL12	72,42±3,66	78,46±1,92‡†	57,70±3,95	63,44±4,05

Os grupos experimentais foram definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com hormônio do crescimento (GH) [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, bem como, sob influência da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são expressos como a média percentual dos timócitos transmigrados CXCR4 positivos ± EPM, de seis (grupos experimentais sem influência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais sob influência da CXCL12) experimentos independentes. ‡ estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, † estatisticamente significativo em relação ao grupo controle+CXCL12. Teste t de Student: ‡,† $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

Tabela 5. Alta expressão do receptor CXCR4 sobre timócitos (Tø) transmigrados por células endoteliais tEnd.1

Grupos experimentais	Subpopulações de timócitos definidas CD4/CD8			
	DN	DP	CD4SP	CD8SP
Controle	52,73±8,69	64,81 ±2,58	19,14±3,58	37,18±5,34
GH tEnd.1	56,86±7,35	60,25±4,06	22,74±4,55	40,52±5,54
GH Tø	56,54±7,37	62,95±3,51	26,15±2,55	42,37±3,67
GH tEnd.1/Tø	56,39±9,12	59,58±4,55	27,54±5,94	41,54±7,15
Controle + CXCL12	57,48±4,68	60,66±2,17	39,75±6,20‡*§	45,27±4,67
GH tEnd.1 + CXCL12	46,38±7,59	54,44±4,77	29,75±6,05	38,46±5,52
GH Tø + CXCL12	42,98±5,95	49,58±4,69‡§	28,42±5,58	35,82±5,70
GH tEnd.1/Tø + CXCL12	46,62±6,78	52,32±4,86‡	30,28±6,58	38,06±6,50

Os grupos experimentais foram definidos pelo tratamento das células tEnd.1 e/ou Tø com hormônio do crescimento (GH) [100 ng/ml], por 8 horas e 1 hora, respectivamente, bem como, sob influência da quimiocina CXCL12 [200 ng/ml]. Controle e Controle+CXCL12: Tø e tEnd.1 não foram tratados com GH. Valores são expressos como a média percentual dos timócitos transmigrados com alta expressão de CXCR4 ± EPM, de seis (grupos experimentais sem influência da CXCL12) e quatro (grupos experimentais sob influência da CXCL12) experimentos independentes. ‡ estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, * estatisticamente significativo em relação ao grupo GH tEnd.1, § estatisticamente significativo em relação ao grupo GH Tø. Teste t de Student: ‡,*,§ $p \leq 0,05$. DN, timócitos $CD4^-CD8^-$; DP, timócitos $CD4^+CD8^+$; CD4SP, timócitos $CD4^+CD8^-$; CD8SP, timócitos $CD4^-CD8^+$.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o efeito do hormônio do crescimento na transmigração endotelial de timócitos, que é um processo dependente de eventos bastante relacionados: como a ligação dos timócitos às células endoteliais, e a migração através da parede vascular, provavelmente em resposta a um estímulo quimioatraente.

Inicialmente, mostramos que o GH [100 ng/ml] influenciou diferentemente a transmigração de timócitos murinos por células endoteliais tEnd.1, dependendo da condição de tratamento. Esse dado apontou para um papel imunomodulador do GH na migração de timócitos. Além disso, mostrou que no processo de transmigração, este hormônio possui uma ação sobre as células endoteliais e os timócitos.

No que se refere às células endoteliais, Ikeo *et al*. (2001) demonstraram que o GH inibiu o efeito do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 humana sobre a migração de células endoteliais ECV304, interferindo na ativação de moléculas de sinalização intracelular. De outro modo, o GH modulou positivamente o reparo vascular afetando a mobilização de progenitor de células endoteliais, bem como, aumentou a proliferação de células endoteliais de retina humana (Rymaszewski *et al*., 1991; Devin *et al*., 2008). Lincoln *et al*. (2007) demonstraram a presença do receptor de GH em células endoteliais de neoplasma vascular, fortalecendo o conceito que o sistema somatotrófico possui um papel na biologia da célula endotelial.

Em um estudo realizado, Murphy *et al*. (1992) observaram que o hormônio do crescimento humano recombinante promoveu a entrada de células T murinas de camundongos singênicos para o timo de camundongos portadores de síndrome de imunodeficiência severa combinada (SCID), os quais são deficientes de células T maduras, indicativo de possuir efeitos sobre a adesão e migração de células T *in vivo*. Timócitos humanos sintetizaram e secretaram GH com um peso molecular (23 KDa) similar ao GH hipofisário, capaz de promover a

proliferação dessas células de maneira dose resposta (Sabharwal & Varma, 1996). Além disso, diferentes doses de GH aumentaram a proliferação de timócitos murino estimulados por anticorpo anti-CD3 (Postel-Vinay *et al*., 1997); e que implantes de células pituitárias GH3 em ratos velhos aumentou o número total de timócitos e a percentagem de células $CD3^+$ revertendo à atrofia tímica idade-dependente (Kelley *et al*., 1986; Li *et al*., 1992).

Nossos resultados, através do ensaio de transmigração revelaram que, na condição de tratamento somente das células endoteliais com GH [100 ng/ml], no período de 8 horas, a capacidade transmigratória de timócitos totais diminuiu significativamente, e que esse efeito bloqueio reverteu, quando os timócitos foram tratados com GH [100 ng/ml], por um período de uma hora. Analisando o número absoluto e o número relativo dos timócitos transmigrados nas subpopulações definidas pelas moléculas CD4 e CD8, observamos que as células DP e CD4SP foram as subpopulações transmigradas moduladas pelo tratamento com GH.

Considerando os dados citados, da transmigração diminuída na situação experimental, em que somente as células endoteliais foram tratadas com GH, contrasta com um estudo anterior demonstrando que a IL-6 aumentou a permeabilidade de células endoteliais bovinas através do rearranjo dos filamentos de actina e por mudança na forma da célula endotelial (Maruo *et al*., 1992). Ainda, o hormônio do crescimento humano recombinante mostrou ser um potente quimioatraente aumentando *in vitro* a migração de monócitos quando presente no compartimento inferior da câmara de quimiotaxia, ou quando adicionado às células no compartimento superior (Wiedermann *et al*., 1993). Entretanto, nossos resultados ampliam outros dados de nosso laboratório, no qual mostraram que o GH [20 ng/ml] diminuiu o número total de timócitos transmigrados, em especial de células DP, através da monocamada de células tEnd.1 tratada com este hormônio (Ramos, 2008).

Outro ponto de discussão interessante diz respeito à ação do GH na presença da CXCL12 no processo de transmigração de timócitos através de células tEnd.1. A migração de timócitos é influenciada por quimiocinas (Moser *et al*., 2004). É conhecido que elevada expressão da CXCL12 em células endoteliais de veia umbilical humana promoveu uma maior transmigração de células $CD34^+$ e o crescimento de células progenitoras hematopoiéticas (Hwang *et al*., 2006). A falta da CXCL12 ou de seu receptor CXCR4 em camundongos reduziu linfopoiese B e mielopoiese (Ansel & Cyster, 2001; Annunziato *et al*., 2001). Ainda, essa quimiocina regula a função pituitária, causando um aumento significativo na secreção de GH e proliferação de células da linhagem GH4C1 (Barbieri *et al*., 2007).

Em nossos estudos, observamos que o GH em adição a CXCL12 como fator quimiotático, apresentou um efeito similar ao processo de transmigração na ausência da quimiocina CXCL12, reduzindo o número de células T transmigradas quando tratamos com GH somente as células endoteliais, e que, esta ação não foi observada quando o tratamento ocorreu em ambas às células. Interessantemente, no grupo experimental onde somente os timócitos foram tratados com GH, por uma hora e na presença da quimiocina CXCL12, registramos um aumento significativo na transmigração de timócitos totais e também nas subpopulações DP e CD4SP quando comparamos ao grupo controle.

Em concordância com estes resultados, Smaniotto *et al*. (2005) mostraram que timócitos, incluindo todas as subpopulações CD4/CD8, derivados de camundongos transgênicos para o GH migraram mais eficientemente através de câmara *transwell* em resposta a CXCL12 do que em controles. Ainda, injeção intratímica de GH em camundongos modulou a distribuição de emigrantes recentes tímicos (RTEs) CD4SP e CD8SP entre os órgãos linfóides, com uma migração preferencial de RTEs CD4SP para os linfonodos (Smaniotto *et al*., 2004). Vale ressaltar que tal aumento de RTEs em linfonodos ocorreu também em camundongos transgênicos para o GH (Smaniotto *et al*., 2005). O tratamento com GH em pacientes adultos HIV-1^+ aumentou o número absoluto e percentual

de células T $CD4^+$ circulantes e um ganho no número absoluto de células T CD8 *naive* ($CD8^+CD45RA^+CD62L^+CD11a^{dim}$) (Napolitano *et al*., 2008).

Nossos dados sugerem que, a quimiocina CXCL12 provavelmente potencializa os efeitos do GH na transmigração de células DP e CD4SP. Deste modo, corroboram aos trabalhos citados anteriormente que apontam um potencial terapêutico para o GH, no que se refere ao aumento do número relativo de células CD4SP.

É sabido que, uma etapa inicial na transmigração endotelial de células T, é a adesão célula-célula mediada por uma variedade de receptores celulares. Sobre este assunto, Romanic & Madri (1994) observaram que a expressão da integrina VLA-4 sobre células T e a expressão de VCAM-1 sobre células endoteliais são necessárias para a transmigração. Da mesma forma, Baron *et al*. (1993) mostraram que a expressão de VLA-4 é requerida para a entrada de clones $CD4^+$ Th1 antígeno específico, no parênquima cerebral num modelo animal de encefalite experimental autoimune.

Além das moléculas de adesão, as quimiocinas e seus receptores possuem um papel potencial para recrutar subpopulações de timócitos, por induzir adesão destas células ao endotélio, facilitar a passagem transendotelial e direcionar a migração celular através de um gradiente de proteínas. Neste assunto, Lloyd *et al*. (1996) relataram que quimiocinas induzem a aderência de células T a moléculas de adesão humana recombinante (rhICAM-1, rhVCAM-1) e a proteínas de matriz extracelular como fibronectina, colágeno, e laminina. del Pozo *et al*. (1995) reportaram que várias quimiocinas induzem a formação de projeção citoplasmática durante a interação de linfoblasto T com células endoteliais, bem como, a redistribuição de receptores de adesão ICAM-3, ICAM-1, CD43 e CD44; Yun & Jo (2003) detectaram expressão do receptor CXCR4 em células endoteliais de veia umbilical humana, em sinusóides, vênulas e arteríolas da medula óssea; e Kucia *et al*. (2005) reuniram dados que sugeriram um importante papel biológico para o eixo CXCL12/CXCR4 em etapas cruciais

envolvidas na mobilização, trânsito, e endereçamento de células tronco normais e em metástase de células tronco malignas.

No presente estudo, também avaliamos a possível influência do GH sobre os níveis de expressão da integrina VLA-4 e do receptor de quimiocina CXCR4 sobre timócitos transmigrados, como também, seus respectivos ligantes VCAM-1 e CXCL12 em células endoteliais tEnd.1, após termos observado que o GH modulou a transmigração de timócitos em determinadas situações experimentais.

Na presença da CXCL12 como fator quimiotático, o GH nas diferentes condições de tratamento das células, não alterou os níveis de expressão de VLA-4 no total de timócitos, bem como, o percentual de células com alta expressão de VLA-4 nas diferentes subpopulações. Entretanto, verificamos um aumento no percentual de células positivas para VLA-4 na subpopulação CD8SP, no grupo experimental em que tratamos somente os timócitos com GH e relacionado aos grupos de tratamento das células endoteliais. Ainda, no total de timócitos e em todas as subpopulações, verificamos que, a presença da quimiocina CXCL12 no compartimento inferior da câmara *transwell* aumentou o percentual de células com alta expressão de VLA-4, quando comparamos cada grupo experimental sem influência da CXCL12 com cada grupo experimental sob influência dessa quimiocina.

Relato da literatura demonstrou que os níveis de expressão na membrana celular dos receptores de matriz extracelular (VLA-4, VLA-5, e VLA-6), sobre subpopulações CD4/CD8 de timócitos derivados de camundongos transgênicos para o GH, não mudou em comparação àqueles de timócitos de camundongos controles, e que, a expressão da integrina VLA-6 sobre timócitos de camundongos transgênicos para GH migrados sob estimulação de laminina e/ou CXCL12, também não alterou (Smaniotto *et al*. 2005).

Dados do nosso laboratório mostraram que o GH aumentou a expressão de VLA-4 e VLA-5, na superfície das células endoteliais tEnd.1 após tratamento por 8 horas, na concentração de 20 ng/ml (Ramos,

2008). Em outro estudo, Peled *et al*. (2000) observaram que CXCL12 ativou as integrinas LFA-1, VLA-4 e VLA-5 sobre células hematopoiéticas humanas ($CD34^+$), induzindo um aumento na transmigração dessas células. Ainda, Ding *et al*. (2001) demonstraram que CXCL12 ativou a integrina β1 sobre células T, estimulando a migração transendotelial mediada por VLA-4. Num sistema *in vivo*, células T de sangue periférico humano migraram para o timo de camundongos SCID quando pré-tratadas com GH, e que esta migração foi inibida com anticorpos contra a cadeia β1 das integrinas da família VLA, receptores para moléculas de matriz extracelular (Taub *et al*., 1994).

Analisando a expressão de VCAM-1, detectamos que as células tEnd.1 são positivas para esta molécula da superfamília de imunoglobulinas, no entanto, sob efeito do GH [100 ng/ml], não observamos alteração na expressão deste ligante quando comparamos ao controle não tratado. Este dado contrasta com a observação de um aumento da expressão de VCAM-1 sobre células endoteliais de veia umbilical humana, incubadas com soro de pacientes saudáveis tratados com GH, mas, ajusta-se a outro dado do mesmo estudo, no qual mostrou que o GH não possuiu efeito estimulatório direto na expressão de VCAM-1 sobre células endoteliais tratadas (Hansen *et al*., 2004). Estudos realizados por marcação imunohistoquímica demonstraram a expressão de VCAM-1 por células do estroma tímico e em vênulas pós-capilares próximas da junção córtico-medular no timo de camundongos pós-natal, indicando que esta molécula é importante no endereçamento de progenitores tímicos, aparentemente não envolvida na periodicidade deste evento, uma vez que sua expressão pareceu não variar em relação à idade do animal (Lepique *et al*. 2003).

Portanto, em nosso estudo, embora o GH sozinho ou em combinação com CXCL12, tenha exercido pouca ou nenhuma influência sob a expressão de VLA-4/VCAM-1, não é possível descartarmos o envolvimento destas moléculas nas alterações observadas no ensaio de transmigração. E aqui, sugerimos um possível efeito do tratamento com GH na afinidade de VLA-4/VCAM-1. Sobre isso, Hourihan *et al*. (1993) sugeriram que um

aumento na afinidade da integrina VLA-4 regulou a migração dos linfócitos por células de endotélio alto, provavelmente devido a uma associação estável do VLA-4 com o citoesqueleto do linfócito em contato com a camada endotelial. Outro estudo mostrou que após adesão e transmigração mediada por interação VLA-4/VCAM-1, ocorreu regulação negativa de VLA-4 e LFA-1 em linfócitos T, assim como, subsequente redução na adesão dessas moléculas para VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente; porém, aumento na adesão destas células para colágeno-I e IV, fibronectina e laminina (Madri et al., 1996). Futuras investigações para responder tal hipótese irão contribuir para o entendimento dos efeitos do GH nos fenômenos da transmigração de timócitos por células endoteliais.

Analisando o efeito do GH na expressão de CXCR4, não observamos alterações em nenhuma situação experimental de tratamento das células com GH. Na presença da CXCL12 como fator quimiotático, o GH diminuiu o percentual de células positivas para CXCR4, nos grupos em que tratamos os timócitos em comparação ao controle com quimiocina, após análise no total de timócitos transmigrados e na subpopulação DP. Este resultado concilia com a demonstração de regulação negativa para CXCR4 sobre timócitos expostos a CXCL12 (Smaniotto *et al*., 2005).

Quanto a expressão da CXCL12 em células endoteliais tEnd.1 sob efeito do GH [100 ng/ml], não detectamos alteração na expressão desta molécula após tratamento com o hormônio. Esse dado de nosso estudo contrasta, com a observação de elevados níveis da CXCL12 no estroma tímico de camundongos transgênicos para o GH (Smaniotto *et al*., 2005). Entretanto, vimos expressão da CXCL12 por células tEnd.1, e esse achado vai de encontro a detecção por imunofluorescência deste ligante na mesma linhagem celular (Mendes-da-Cruz *et al*., 2008).

A diminuição vista em nosso estudo, no percentual de células positivas para CXCR4 quando os timócitos foram tratados com GH e na presença da CXCL12, pode ter contribuído para o aumento na transmigração destas células nesta situação experimental. Um papel

fisiológico, que pode ser pensado, para conter o aumento na produção das glicoproteínas laminina e fibronectina pelas células tEnd.1 tratadas com GH (Ramos, 2008), se consideramos a ideia que matriz extracelular e quimiocinas podem atuar em combinação para dirigir a migração de timócitos (Savino *et al*., 2002). No entanto, devemos comentar que para os resultados obtidos até o presente momento utilizamos apenas uma única concentração do GH e da CXCL12 em um modelo de imigração. Também, não podemos deixar de mencionar que a migração transendotelial sofre influência de vários outros componentes e receptores de matriz extracelular que serão analisados em futuras investigações.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o conjunto de dados apresentados neste trabalho, sustenta a ideia que o GH é relevante na fisiologia do timo, ampliando seu papel imunomodulador na biologia das células endoteliais e dos timócitos, no que se refere ao processo de transmigração. Aqui, mostramos que o GH modulou diferentemente a transmigração de timócitos murinos frente a barreiras endoteliais, com discretas alterações nos níveis de expressão para VLA-4 e CXCR4, receptores sabidamente envolvidos neste processo. Além disso, dados apresentados em nosso estudo favoreceram indiretamente o uso já feito do GH como adjuvante terapêutico nas imunodeficiências, como aqui mencionado o aumento na transmigração de células $CD4^+$ quando em conjunto com a CXCL12. Mais estudos serão necessários para elucidar o papel do GH em outros mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de transmigração endotelial de timócitos.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos dados desta dissertação foi possível levantar várias questões, cujas respostas poderão contribuir para um melhor entendimento dos efeitos do GH sobre o funcionamento de interações celulares no sistema imunológico. Diante da relevância do tema, pretendemos continuar contribuindo para os estudos científicos no domínio da neuroimunoendocrinologia, investigando alguns dos aspectos dentre os que seguem:

1. Analisar se o GH modula a transmigração endotelial de timócitos murinos, considerando o modelo de imigração, em outros tempos de tratamento das células e/ou ao longo deste processo.

2. Avaliar o efeito do GH na transmigração endotelial de células T em um modelo de emigração.

3. Investigar o efeito do GH sobre a expressão de outras moléculas sabidamente relevantes em transmigração endotelial de timócitos em modelos de imigração e emigração.

4. Observar o efeito do GH na transmigração endotelial de timócitos frente a outras quimiocinas importantes neste processo.

5. Comparar o efeito do tratamento com GH sobre a transmigração endotelial de timócitos provenientes de camundongos jovens e de camundongos velhos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves GJ; Palermo-Neto J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007; 29 (4): 363-369.

Andersson IJ; Johansson ME; Wickman A; Bohlooly-Y M; Klintland N; Caidahl K; Gustafsson M; Borén J; Gan LM; Bergström G. Endothelial dysfunction in growth hormone transgenic mice. *Clin Sci*. 2006; 110 (2): 217-225.

Annunziato F; Romagnani P; Cosmi L; Lazzeri E; Romagnani S. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol*. 2001; 22 (5): 277-281.

Ansel KM; Cyster JG. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13 (2): 172-179.

Aurrand-Lions M; Duncan L; Ballestrem C; Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem*. 2001; 276 (4): 2733-2741.

Aspinall R; Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol*. 2000; 20 (4): 250-256.

Barbieri F; Bajetto A; Porcile C; Pattarozzi A; Schettini G; Florio T. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. *J Mol Endocrinol*. 2007; 38 (3): 383–389.

Barnard A; Layton D; Hince M; Sakkal S; Bernard C; Chidgey A; Boyd R. Impact of the neuroendocrine system on thymus and bone marrow function. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15 (1): 7-18.

Baron JL; Madri JA; Ruddle NH; Hashim G; Janeway CA Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med*. 1993; 177 (1): 57-68.

Bereta J; Bereta M; Cohen S; Cohen MC. Regulation of VCAM-1 Expression and Involvement in Cell Adhesion to Murine Microvascular Endothelium. *Cell. Immunol*. 1993; 147 (2): 313-330.

Besedovsky HO; del Rey A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z Rheumatol*. 2000; 59: 26-30.

Besedovsky HO; del Rey A. Cytokines as mediators of central and peripheral immune-neuroendocrine interactions. *In*. Ader R, Felten DL, Cohen N. (Editors) *Psychoneuroimmunology* 3rd Ed. 2001; Academic Press, San Diego, Ca. Volume 1 pp 1-17.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol*. 1984; 132 (3): 1067-1070.

Boehm T; Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol*. 2006; 27 (10): 477-484.

Boyd RL; Tucek CL; Godfrey DI; Izon DJ; Wilson TJ; Davidson NJ; Bean AGD; Ladyman HM; Ritter MA; Hugo P. The thymic microenvironment. *Immunol Today*. 1993; 14: 445-459.

Capaldo B; Guardasole V; Pardo F; Matarazzo M; Di Rella F; Numis F; Merola B; Longobardi S; Saccà L. Abnormal vascular reactivity in growth hormone deficiency. *Circulation*. 2001; 103 (4): 520-524.

Chan JR; Hyduk SJ; Cybulsky MI. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med*. 2001; 193 (10): 1149-1158.

Chen HT; Schuler LA; Schultz RD. Growth hormone and Pit-1 expression in bovine fetal lymphoid cells. *Domest Anim Endocrinol*. 1997; 14 (6): 399-407.

Choi J; Enis DR; Koh KP; Shiao SL; Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 683-709.

Chute JP. Stem cell homing. *Curr Opin Hematol*. 2006; 13 (6): 399-406.

Coltey M; Bucy RP; Chen CH; Cihak J; Lösch U; Char D; Le Douarin NM; Cooper MD. Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras. *J Exp Med*. 1989; 170 (2): 543-557.

Conti A. Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? *Ann NY Acad Sci*. 2000; 917: 68-83.

Cyster JG. Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 127-159.

Dardenne M; Savino W. Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol Today*. 1994; 15 (11): 518-523.

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

Davis SL. Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domest Anim Endocrinol*. 1998; 15 (5): 283-289.

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

de Mello-Coelho V; Gagnerault MC; Souberbielle JC; Strasburger CJ; Savino W; Dardenne M; Postel-Vinay MC. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology*. 1998; 139 (9): 3837-3842.

del Pozo MA; Sánchez-Mateos P; Nieto M; Sánchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol*. 1995; 131 (2): 495-508.

Delves PJ; Roitt IM. The immune system. *Adv. Immunol*. 2000; 343 (1): 37-49.

Devin JK; Vaughan DE; Blevins LS Jr; Chen Q; Covington J; Verity DK; Young PP. Low-dose growth hormone administration mobilizes endothelial progenitor cells in healthy adults. *Growth Horm IGF Res*. 2008; 18 (3): 253–263.

Ding Z; Xiong K; Issekutz TB. Chemokines stimulate human T lymphocyte transendothelial migration to utilize VLA-4 in addition to LFA-1. *J Leukoc Biol*. 2001; 69 (3): 458-466.

do Nascimento CA ; Patriarca G ; Heimann JC. Estrutura orgânica do endotélio vascular. *In*. da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. Endotélio e doenças cardiovasculares 2003; Atheneu, São Paulo, Ca. 1 pp 1-16.

Fabris N; Pierpaoli W; Sorkin E. Hormones and the immunological capacity. III. The immunodeficiency disease of the hypopituitary Snell-bagg dwarf mouse. *Clin exp Immunol*. 1971; 9: 209-225.

Feng C; Woodside KJ; Vance BA; El-Khoury D; Canelles M; Lee J; Gress R; Fowlkes BJ; Shores EW; Love PE. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol*. 2002; 14 (6): 535-544.

Gagnerault MC; Postel-Vinay MC; Dardenne M. Expression of growth hormone receptors in murine lymphoid cells analyzed by flow cytofluorometry. *Endocrinology*. 1996; 137 (5): 1719-1726.

Garmy-Susini B; Jin H; Zhu Y; Sung RJ; Hwang R; Varner J. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest*. 2005; 115 (6): 1542-1551.

Giancotti FG; Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science*. 1999; 285 (5430): 1028-1032.

Hadden JW. Thymic endocrinology. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 840: 352-358.

Hamann J; Fiebig H; Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol*. 1993; 150 (11): 4920-4927.

Hansen TK; Fisker S; Dall R; Ledet T; Jørgensen JO; Rasmussen LM. Growth hormone increases vascular cell adhesion molecule 1 expression: in vivo and in vitro evidence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89 (2): 909-916.

Hattori N; Saito T; Yagyu T; Jiang BH; 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.* 2001; 86: 4284-4291.

Hordijk PL. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS J*. 2006; 273 (19): 4408-4415.

Hourihan H; Allen TD; Ager A. Lymphocyte migration across high endothelium is associated with increases in $\alpha_4\beta_1$ integrin (VLA-4) affinity. *J Cell Sci*. 1993; 104: 1049-1059.

Hwang JH; Kim SW; Park SE; Yun HJ; Lee Y; Kim S; Jo DY. Overexpression of stromal cell-derived factor-1 enhances endothelium-supported transmigration, maintenance, and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2006; 15 (2): 260–268.

Ikeo S; Yamauchi K; Shigematsu S; Nakajima K; Aizawa T; Hashizume K. Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on human endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280 (5): C1255-C1261.

Inoue T; Saito H; Tsuno N; Fukatsu K; Lin MT; Inaba T; Han I; Furukawa S; Ikeda S; Matsuda T; Muto T. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on opsonin receptor expression on local and systemic phagocytes in a lethal peritonitis model. *Crit Care Med*. 1998; 26 (2): 338-343.

Irving RJ; Carson MN; Webb DJ; Walker BR. Peripheral vascular structure and function in men with contrasting GH levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87 (7): 3309-3314.

Johnson-Léger C; Aurrand-Lions M; Beltraminelli N; Fasel N; Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*. 2002; 100 (7): 2479-2486.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88 (9): 3259-3287.

Kelley KW; Brief S; Westly HJ; Novakofski J; Bechtel PJ; Simon J; Walker EB. GH3 pituitary adenoma cells can reverse thymic aging in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83 (15): 5663-5667.

Kelley KW; Weigent DA; Kooijman R. Protein Hormones and Immunity. *Brain Behav Immun*. 2007; 21 (4): 384-392.

Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (7): 546-559.

Kölle S; Sinowatz F; Boie G; Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol Reprod*. 1998; 59 (4): 836-842.

Kong FK; Chen CL; Six A; Hockett RD; Cooper MD. T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (4): 1536-1540.

Kucia M; Reca R; Miekus K; Wanzeck J; Wojakowski W; Janowska-Wieczorek A; Ratajczak J; Ratajczaka MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1–CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005; 23 (7): 879–894.

Ladi E; Yin X; Chtanova T; Robey EA. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol*. 2006; 7 (4): 338-343.

Lepelletier Y; Smaniotto S; Hadj-Slimane R; Villa-Verde DM; Nogueira AC; Dardenne M; Hermine O; Savino W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (13): 5545-5550.

Lepique AP; Palencia S; Irjala H; Petrie HT. Characterization of vascular adhesion molecules that may facilitate progenitor homing in the post-natal mouse thymus. *Clin Dev Immunol*. 2003;10 (1): 27-33.

Ley K; Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol*. 1995; 155 (2): 525-528.

Li L; Hsu HC; Stockard CR; Yang P; Zhou J; Wu Q; Grizzle WE; Mountz JD. IL-12 inhibits thymic involution by enhancing IL-7- and IL-2-induced thymocyte proliferation. *J Immunol*. 2004; 172 (5): 2909-2916.

Li YM; Brunke DL; Dantzer R; Kelley KW. Pituitary epithelial cell implants reverse the accumulation of CD4-CD8- lymphocytes in thymus glands of aged rats. *Endocrinology*. 1992; 130 (5): 2703-2709.

Lincoln DT; Singal PK; Al-Banaw A. Growth hormone in vascular pathology: neovascularization and expression of receptors is associated with cellular proliferation. *Anticancer Res*. 2007; 27 (6B): 4201-4218.

Lloyd AR; Oppenheim JJ; Kelvin DJ; Taub DD. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol*. 1996; 156 (3): 932-938.

Madri JA; Graesser D; Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74:749-757.

Manevich E; Grabovsky V; Feigelson SW; Alon R. Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J Biol Chem*. 2007; 282 (35): 25338-25348.

Manley NR; Blackburn CC. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol*. 2003; 15 (2): 225-232.

Martìn-Padura I; Lostaglio S; Schneemann M; Williams L; Romano M; Fruscella P; Panzeri C; Stoppacciaro A; Ruco L; Villa A; Simmons D; Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J cell Biol*. 1998; 142 (1): 117-127.

Maruo N; Morita I; Shirao M; Murota S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology*. 1992; 131 (2): 710-714.

Mendes-da-Cruz DA; Smaniotto S; Keller AC; Dardenne M; Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*. 2008; 180 (7): 4639-4647.

Metcalf DJ; Nightingale TD; Zenner HL; Lui-Roberts WW; Cutler DF. Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci*. 2008; 121: 19-27.

Milićević NM; Milićević Z. Thymus cell-cell interactions. *Int Rev Cytol*. 2004; 235: 1-52.

Miller JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev*. 2002; 185: 7-14.

Moser B; Wolf M; Walz A; Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004; 25 (2): 75-84.

Muller WA; Weigl SA; Deng X; Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1993; 178: 449-460.

Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leuk Biol*. 1995; 57 (4): 523-528.

Murphy WJ; Durum SK; Longo DL. Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89 (10): 4481-4485.

Murphy WJ; Longo DL. Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent. *Immunol Today*. 2000; 21 (5): 211-213.

Napoli R; Guardasole V; Angelini V; D'Amico F; Zarra E; Matarazzo M; Saccà L. Acute effects of growth hormone on vascular function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (6): 2817-2820.

Napolitano LA; Lo JC; Gotway MB; Mulligan K; Barbour JD; Schmidt D; Grant RM; Halvorsen RA; Schambelan M; McCune JM. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS*. 2002; 16 (8): 1103-1111.

Napolitano LA; Schmidt D; Gotway MB; Ameli N; Filbert EL; Ng MM; Clor JL; Epling L; Sinclair E; Baum PD; Li K; Killian ML; Bacchetti P; McCune JM. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest*. 2008; 118 (3): 1085-1098.

Newman PJ; Berndt MC; Gorski J; White GC 2nd; Lyman S; Paddock C; Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990; 247 (4947): 1219-1222.

Norment AM; Bevan MJ. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol*. 2000; 12 (5): 445-455.

Nourshargh S; Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*. 2005; 26 (3): 157-165.

Pantaleon M; Whiteside EJ; Harvey MB; Barnard RT; Waters MJ; Kaye PL. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation embryos: a role for GH in early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (10): 5125-5130.

Pearse G. Normal, Structure, Function and Histology of the thymus. *Toxicol Pathol*. 2006; 34 (5): 504-514.

Peled A; Kollet O; Ponomaryov T; Petit I; Franitza S; Grabovsky V; Slav MM; Nagler A; Lider O; Alon R; Zipori D; Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; 95 (11): 3289-3296.

Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (11): 859-866.

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*. 1999; 9: 25-30.

Polgreen L; Steiner M; Dietz CA; Manivel JC; Petryk A. Thymic hyperplasia in a child treated with growth hormone. *Growth Horm IGF Res*. 2007; 17 (1): 41-46.

Postel-Vinay MC; de Mello Coelho V; Gagnerault MC; Dardenne M. Growth hormone stimulates the proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinology*. 1997; 138 (5): 1816-1820.

Ramos FWS. Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímicas. Dissertação de Mestrado. (2008). Universidade Federal de Alagoas.

Ray D; Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocrine Rev*. 1997; 18: 206-228.

Raviola E; Karnovsky MJ. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med*. 1972; 136 (3): 466-498.

Recher S; Raccurt M; Lambert A; Lobie PE; Mertani HC; Morel G. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49 (3): 347-354.

Rodríguez-Frade JM; Mellado M; Martínez-A C. Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol*. 2001; 22 (11): 612-617.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997; 90 (3): 909-928.

Romani de Wit T; Rondaij MG ; van Mourik JA. Weibel-Palade bodies: unique secretory organelles within endothelial cells. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2004; 148 (32): 1572-7.

Romanic AM; Madri JA. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol*. 1994; 125 (5): 1165-1178.

Rossi D; Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 2000; 18: 217-242.

Rymaszewski Z; Cohen RM; Chomczynski P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88 (2): 617-621.

Sabharwal P; Varma S. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81 (7): 2663-2669.

Savino W; Dardenne M. Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol Today*. 1995; 16 (7): 318-322.

Savino W; Dardenne M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology. *Endocr Rev*. 2000; 21 (4): 412-443.

Savino W; Mendes-da-Cruz DA; Silva JS; Dardenne M; Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol*. 2002; 23 (6): 305-313.

Savino W; Ayres-Martins S; Neves-Dos-Santos S; Smaniotto S; Ocampo JS; Mendes-da-Cruz DA; Terra-Granado E; Kusmenok O; Villa-Verde DM. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36 (8): 1015-1025.

Savino W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol*. 2007; 92 (5): 813-817.

Scimone ML; Aifantis I; Apostolou I; von Boehmer H; von Andrian UH. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (18): 7006-7011.

Scollay RG; Butcher EC; Weissman IL. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol*. 1980; 10 (3): 210-218.

Scollay R; Godfrey DI. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today*. 1995; 16 (6): 268-273.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998 Spring; 10 (2): 230-231.

Serri O; St-Jacques P; Sartippour M; Renier G. Alterations of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: effect of substitutive GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84 (1): 58-63.

Silha JV; Krsek M; Hana V; Marek J; Weiss V; Jezkova J; Rosicka M; Jarkovska Z; Murphy LJ. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clin Endocrinol*. 2005; 63 (1): 79-86.

Smaniotto S; Ribeiro-Carvalho MM; Dardenne M; Savino W; de Mello-Coelho V. Growth hormone stimulates the selective trafficking of thymic CD4+CD8- emigrants to peripheral lymphoid organs. *Neuroimmunomodulation*. 2004; 11 (5): 299-306.

Smaniotto S; de Mello-Coelho V; Villa-Verde DM; Pléau JM; Postel-Vinay MC; Dardenne M; Savino W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*. 2005; 146 (7): 3005-3017.

Spector NH. Neuroimmunomodulation: A Brief Review. Can Conditioning of Natural Killer Cell Activity Reverse Cancer and/or Aging? *Regul Toxicol Pharmacol*. 1996; 24 (1 Pt 2): S32-S38.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994; 76 (2): 301-314.

Stoltz JF; Muller S; Kadi A; Decot V; Menu P; Bensoussan D. Introduction to endothelial cell biology. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007; 37 (1-2): 5-8.

Sumita K; Hattori N; Imagaki C. Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B – lymphoid precursors. *J Pharmacol Sci*. 2005; 97 (3): 408-416.

Sumpio BE; Riley JT; Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34 (12): 1508-1512.

Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (2): 127-135.

Tarbell JM; Ebong EE. The endothelial glycocalyx: A Mechano-sensor and-transducer. *Sci Signal*. 2008. 1, pt8.

Taub DD; Tsarfaty G; Llyoyd AR; Durum SK; Murphy WJ. 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.* 1994; 94 (1): 293-300.

Tedder TF; Steeber DA; Chen A; Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*. 1995; 9 (10): 866-873.

Temmim L; Kölle S; Baker H; Sinowatz F. Expression of growth hormone receptor in human liposarcomas and lipomas. *Oncol Rep*. 2000; 7 (4): 757-760.

Thum T; Tsikas D; Frölich JC; Borlak J. Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. *FEBS Lett*. 2003; 555 (3): 567-571.

Timsit J; Savino W; Safieh B; Chanson P; Gagnerault MC; Bach JF; Dardenne M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75 (1): 183-188.

Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in heath and disease. *Int. Immunopharmacol*. 2001; 1 (6): 983-993.

Vigano A; Saresella M; Trabattoni D; Giacomet V; di Natale B; Merlo M; Venuto A; Villa ML; Vanzulli S; Ferrante P; Clerici M. Growth hormone in T-lymphocyte thymic and postthymic development: a study in HIV-infected children. *J Pediatr*. 2004; 145 (4): 542-548.

Villa-Verde DMS; de Mello-Coelho V; Farias-de-Oliveira DA; Dardenne M; Savino W. Pleiotropic Influence of Triiodothyronine on Thymus Physiology. *Endocrinology*. 1993; 133 (2): 867-875.

Webster JI; Tonelli L; Sternberg EM. Neuroendocrine Regulation of Immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 2002; 20: 125-163.

Weigent DA; Blalock JE. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev*. 1987; 100: 79-108.

Welniak LA; Sun R; Murphy WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J Leuk Biol*. 2002; 71 (3): 381-387.

Wiedermann CJ; Reinisch N; Braunsteiner H. Stimulation of monocyte chemotaxis by human growth hormone and its deactivation by somatostatin. *Blood*. 1993; 82 (3): 954-960.

Williams RL; Courtneidge SA; Wagner EF. Embryonic lethalities and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell*. 1988; 52 (1): 121-131.

Yanagawa Y; Iwabuchi K; Onoé K. Enhancement of stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology*. 2001; 104 (1): 43-49.

Yin X; Chtanova T; Ladi E; Robey EA. Thymocyte motility: mutants, movies and migration patterns. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18 (2): 191-197.

Yun HJ; Jo DY. Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *J Korean Med Sci*. 2003; 18 (5): 679-685.

Zhan X; Giorgianni F; Desiderio DM. Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. *Proteomics*. 2005; 5 (5): 1228-1241.

Ziemssen T; Kern S. Psychoneuroimmunology - Cross-talk between the immune and nervous systems. *J Neurol*. 2007; 254: II/8-II/11.