

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

Marvin Paulo Lins

**Participação do hormônio do crescimento nas interações entre  
timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório**

Maceió – AL

2015

MARVIN PAULO LINS

**Participação do hormônio do crescimento nas interações entre timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório**

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

**Orientação:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Salete Smaniotto

Maceió – AL

2015

**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Roselito de Oliveira Santos**

L759p Lins, Marvin Paulo.  
Participação do hormônio do crescimento nas interações entre  
timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório / Marvin Paulo  
Lins. – 2015.  
60 f. : il.

Orientadora: Salete Smaniotto.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de  
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 54-60.

1. Timócito. 2. Hormônio do crescimento.  
3. Endotélio. I. Título.

CDU: 612.018

## Folha de Aprovação

Marvin Paulo Lins

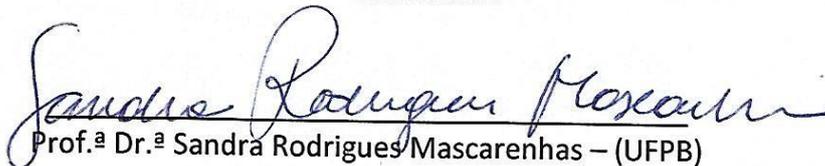
Participação do hormônio do crescimento nas interações entre timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de fevereiro de 2015.



Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto (Orientador)

### Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Sandra Rodrigues Mascarenhas – (UFPB)



Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely – (UFAL)



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade - (UFAL)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, sem a qual eu não seria metade do  
que me tornei hoje.*

*É por vocês cada luta, cada lágrima e cada vitória.*

*O melhor de mim tenho exercido e espero sempre fazer valer a pena o  
esforço de vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*Parece clichê, mas eu sinceramente preciso agradecer a Deus em primeiro lugar. Todo ser humano é movido por algo e quem me move, me impulsiona e me dá coragem é Deus. A Ele minha eterna gratidão por tudo o que eu tenho experimentado nessa vida.*

*À minha família, mais uma vez. Meus pais e minha irmã, por se espelharem em mim e terem toda paciência do mundo comigo. Obrigado por todo o amor incondicional e por me ensinarem a cada dia com o vosso jeito de ser. Família é o bem imaterial mais importante e eu quero dar mais essa alegria a vocês!*

*Aos meus amigos-irmãos Tales, Jadson, Kelly, Isis e Mateus. Vocês me conhecem e me acompanham há tanto tempo, e é muito confortante para o meu coração saber que vocês me amam do jeito que sou, independente dos meus títulos. Fico feliz em tê-los ao meu lado quase todos os dias e vê-los torcendo pelo meu sucesso, ao mesmo tempo em que me fazem colocar os pés no chão em nunca me esquecer de onde vim. Muito obrigado por tudo!*

*Aos meus parceiros de ministério: Brunno, Marília e Isadora. Nossa caminhada se iniciou exatamente quando meu mestrado começou e não poderiam haver pessoas melhores do que vocês para me apoiarem. Suas orações fizeram diferença nos meus dias e quero honrá-los tanto quanto vocês me honram. Aqui está o fruto do vosso incentivo! Agradeço de todo o meu coração.*

*À minha turma de graduação em Biologia, que continua viva através do grupo no WhatsApp. Em especial à Yngrid, André e Mickey. Mesmo que a distância nos doa, saber que vocês escolheram o caminho da Academia como eu, dá-me muito orgulho e eu torço pelo vosso sucesso, compartilho das mesmas dificuldades e vibro com os artigos! Que possamos nos ver em breve!*

*À toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular, em especial, Alex (Jow), Larissa, Jeniffer e Jamylle. Já são cinco anos com vocês, compartilhando desde viagens internacionais e menções honrosas, até faxinas e levantamento de estoque! É legal saber que somos uma família, movidos pelos mesmos ideais e que sofrem juntos quando necessário. Muito obrigado por tornarem os meus dias mais leves e a minha carreira mais agradável.*

*Agradeço aos professores Emiliano Barreto, Alexandre Borbely, Robinson Sabino e Silvana Ayres, pelas suas participações diretas e indiretas na minha formação. E, principalmente, à minha orientadora Salete Smaniotto. Realmente faltam adjetivos para você e palavras para agradecer por tudo! Desde 2010, em me receber tão bem, me acompanhar e investir na minha formação de muitas formas. Obrigado por estar comigo nos piores e melhores dias acadêmicos, pela amizade, sorrisos e oportunidades abertas. Que venham os próximos quatro anos!*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Universidade Federal de Alagoas pelo apoio institucional, na pessoa dos orientadores e professores. Aos órgãos de fomento, FAPEAL, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.*

*E, demais disto, filho meu, atenta: não há limite para fazer livros, e o muito estudar é enfado da carne.*

*De tudo o que se tem ouvido, o fim é: Teme a Deus, e guarda os seus mandamentos; porque isto é o dever de todo o homem.*

*Porque Deus há de trazer a juízo toda a obra, e até tudo o que está encoberto, quer seja bom, quer seja mau.*

*Eclesiastes de Salomão, capítulo 12, versículos 12 a 14.*

## RESUMO

O hormônio do crescimento (GH), além dos seus efeitos clássicos sobre o crescimento e metabolismo no organismo, possui ações pleiotrópicas sobre o sistema imune e, particularmente, sobre o timo. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a participação do GH nas interações entre timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório. Para o estudo foram utilizados timócitos frescos de camundongos C57BL/6, com idade entre 4 a 6 semanas de ambos os sexos, e a linhagem de células endoteliais tímicas (tEnd.1). Inicialmente, no ensaio funcional de adesão célula-célula em cocultura, observou-se que o pré-tratamento dos timócitos com GH (100 ng/mL), durante uma hora, aumentou 27,7% a adesão dos timócitos ao endotélio tímico quando comparado ao grupo em que os timócitos não receberam o tratamento. Esse efeito foi observado em todas as subpopulações com exceção da simples-positiva CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Por meio do ensaio de imunocitoquímica, constatou-se um aumento de 26,6% na deposição de fibronectina pelas tEnd.1 quando cocultivadas com timócitos pré-tratados com GH. Entretanto, a deposição de laminina foi aumentada em tEnd.1 pela presença de timócitos, independente do tratamento prévio com GH. Através de citometria de fluxo, verificou-se que o tratamento com GH aumentou em 49,3% a expressão da integrina VLA-5 na superfície celular em timócitos totais, e esse fenômeno foi observado em todas as subpopulações de timócitos. Entretanto, o tratamento com GH diminuiu 7,8% a expressão da integrina VLA-6 na subpopulação simples-positiva CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Em relação ao citoesqueleto de actina, a análise por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência mostrou que o GH foi capaz de induzir a polarização dos timócitos e a polimerização de F-actina após 30 minutos de tratamento. Em ensaios funcionais de transmigração celular, evidenciou-se um aumento de 44,7% de timócitos migrantes quando previamente tratados com GH e frente ao estímulo quimioatraente do IGF-1, sendo este aumento observado nas subpopulações duplo-positiva CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e simples-positiva CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Em conjunto, os resultados obtidos no estudo demonstram a participação do GH nas interações timócitos/endotélio tímico, em especial à reorganização do citoesqueleto e migração transendotelial de timócitos.

**Palavras-chave:** Timócito, hormônio do crescimento, migração, endotélio

## **Involvement of growth hormone in thymocyte/thymic endothelium interactions in vitro**

Growth hormone (GH), beyond its effects on the growth and metabolism, has pleiotropic actions on immune system and, particularly, on thymus. The objective of this study was to evaluate the involvement of GH in thymocyte/thymic endothelium interactions during migratory process. We applied fresh thymocytes from C57BL/6 mice, aged 4-6 weeks, and thymic endothelial cell line (tEnd.1). It was observed that GH-treated thymocytes were stimulated in 27.7% to adhere to thymic endothelium. This effect was observed in all subpopulations, except in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> single-positive. By means of immunocytochemical assay, there was an increase of 26.6% in the deposition of fibronectin by tEnd.1 when these cells were cocultured with GH-treated thymocytes. However, laminin deposition by tEnd.1 was increased in the presence of thymocytes. Using flow cytometry, it was found that GH treatment increased in 49.3% VLA-5 integrin expression on cell surface. However, GH treatment decreased VLA-6 expression in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> single-positive thymocytes in 7.8%. With regard to actin cytoskeleton, analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy showed that GH was able to induce polarization of thymocytes and polymerization of F-actin. Transmigration assays demonstrated that GH-treated thymocytes migrated more in the presence of IGF-1 as chemoattractant factor (increase of 44.7%), in total thymocytes, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> subsets. Taken together, results demonstrate the involvement of GH in thymocyte/thymic endothelium interactions, particularly in the reorganization of the cytoskeleton and transendothelial migration of thymocytes.

**Key-words:** Thymocyte, growth hormone, cell migration, thymic endothelium

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Aspectos morfológicos do timo .....	17
<b>Figura 2 -</b>	Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos e do microambiente tímico .....	18
<b>Figura 3 -</b>	Regulação do GH e síntese e secreção do IGF-1 .....	25
<b>Figura 4 -</b>	Efeitos pleiotrópicos do GH sobre as células tímicas .....	27
<b>Figura 5 -</b>	Linhagem de células endoteliais tímicas (tEnd.1) .....	29
<b>Figura 6 -</b>	Cocultivo de células endoteliais tímicas (tEnd.1) e timócitos ..	33
<b>Figura 7 -</b>	Índice de adesão de timócitos às células endoteliais tímicas ..	34
<b>Figura 8 -</b>	Esquema representativo das subpopulações de timócitos .....	34
<b>Figura 9 -</b>	GH promove adesão de timócitos às células endoteliais .....	35
<b>Figura 10 -</b>	Deposição de fibronectina por células endoteliais cocultivadas com timócitos .....	36
<b>Figura 11 -</b>	Deposição de laminina por células endoteliais cocultivadas com timócitos .....	37
<b>Figura 12 -</b>	Ação do GH sobre a expressão de VLA-5 por timócitos .....	38
<b>Figura 13 -</b>	Ação do GH sobre a expressão de VLA-6 por timócitos .....	39
<b>Figura 14 -</b>	Quantificação da intensidade de fluorescência da marcação de F-actina em timócitos .....	40
<b>Figura 15 -</b>	Organização do citoesqueleto de F-actina em timócitos .....	42
<b>Figura 16 -</b>	Número de timócitos que migraram através de endotélio tímico .....	43
<b>Figura 17 -</b>	Timócitos tratados com GH migram em maiores números na presença de IGF-1 como quimioatraente .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- APC – alofococianina (*Allophycocyanin*)
- BSA – albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- CD – grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)
- CCL – quimiocina do tipo C-C (*C-C chemokine receptor*)
- CCR – receptor de quimiocina do tipo C-C (*C-C chemokine receptor*)
- CTR – controle
- cTEC - célula epitelial tímica cortical (*cortical Thymic Epithelial Cell*)
- CXCL – quimiocina do tipo C-X-C (*C-X-C motif chemokine*)
- CXCR – receptor de quimiocina do tipo C-X-C (*C-X-C chemokine receptor*)
- DC – célula dendrítica (*Dendritic Cell*)
- DN – timócito duplo-negativo (*Double-Negative Thymocyte – CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>*)
- DP – timócito duplo-positivo (*Double-Positive Thymocyte – CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>*)
- EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EPM – erro padrão da média
- FITC – isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein-5-Isothiocyanate*)
- GAR – anti-Ig de coelho produzido em cabra (*goat anti-rabbit Ig*)
- GH – hormônio do crescimento (*growth hormone*)
- GHBP – proteína ligadora de GH (*growth hormone binding protein*)
- GHD – deficiência de GH (*growth hormone deficiency*)
- GHR – receptor para GH (*growth hormone receptor*)
- GHRF – fator liberador de GH (*Growth-hormone-releasing hormone*)
- HIV – vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- IA – índice de adesão
- ICAM – molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- Ig – imunoglobulina
- IGF-1 – fator-1 de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor-1*)
- IL – interleucina (*Interleukin*)
- JAK – Janus quinase
- MEC – matriz extracelular

MHC – complexo de histocompatibilidade principal (*Major histocompatibility complex*)  
MMP – metaloproteinase (*Matrix Metalloproteinase*)  
mTEC – célula epitelial tímica medular (*medular Thymic Epithelial Cell*)  
NK – célula matadora natural (*Natural-Killer cell*)  
PBS – solução tampão de fosfato (*Phosphate Buffer Solution*)  
PE – ficoeritrina (*Phycoerythrin*)  
PerCP - proteína clorofila peridinina (*Peridinin Chlorophyll*)  
PSGL-1 – glicoproteína-1 ligante à P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)  
ROS – espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)  
RPMI – meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)  
S1P1 – receptor 1 da esfingosina-1-fostato (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1*)  
SBF – soro bovino fetal  
SP – tímócito simples-positivo (*Simple-Positive Thymocyte*)  
STAT – proteína transdutora de sinais e ativadora de transcrição (*Signaling Transducer and Activator of Transcription*)  
TCR – receptor de célula T (*T Cell Receptor*)  
TEC – célula epitelial tímica (*Thymic Epithelial Cell*)  
tEnd.1 – linhagem de células endoteliais tímicas  
TNC – complexo *nurse* tímico (*Thymic Nurse Complex*)  
VLA – antígeno de aparecimento tardio (*Very Late Antigen*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1 Timo .....	15
3.1.1 Histórico .....	15
3.1.2 Função e estrutura tímica .....	16
3.1.3 Microambiente tímico e diferenciação de timócitos .....	17
3.1.4 Matriz extracelular tímica e citoesqueleto de timócitos .....	21
3.1.5 Controle neuroendócrino do timo .....	23
3.2 Hormônio do crescimento .....	24
3.2.1 Fisiologia do eixo GH/IGF-1 .....	24
3.2.2 Ações do GH no timo .....	26
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	29
4.1 Obtenção de timócitos murinos .....	29
4.2 Linhagem de células endoteliais .....	29
4.3 Padronização da cultura celular .....	29
4.4 Tratamento de timócitos in vitro .....	30
4.5 Análise por citometria de fluxo .....	30
4.6 Ensaio de adesão .....	30
4.7 Ensaio de imunocitoquímica .....	31
4.8 Marcação direta de citoesqueleto de F-actina em timócitos .....	31
4.9 Ensaio de migração transendotelial .....	32
4.10 Análise estatística .....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	33
5.1 Timócitos tratados aderem em maior número ao endotélio tímico .....	33
5.2 Células endoteliais apresentam maior deposição de matriz extracelular em contato com timócitos tratados com GH .....	36
5.3 O hormônio do crescimento modula a expressão de VLA-5 e VLA-6 em timócitos murinos .....	38

5.4 Citoesqueleto de timócitos é reorganizado após tratamento com GH .....	40
5.5 Timócitos tratados com GH migram em maiores números na presença de IGF-1 como quimioatraente.....	43
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O timo, órgão linfóide primário, é crucial para o desenvolvimento de células T que, posteriormente na periferia, desempenharão suas funções imunes em condições homeostáticas ou patológicas do organismo. O sucesso na diferenciação de células T maduras depende da constante migração dos timócitos através do microambiente tímico. No processo migratório é essencial que as células do estroma tímico forneçam os sinais necessários para que os timócitos sofram proliferação, diferenciação e geração de diversidade (PETRIE & ZUNIGA-PFLUCKER, 2007).

Embora os mecanismos que direcionam essa migração ainda não estejam bem compreendidos, claras evidências têm mostrado que o microambiente, de maneira coletiva, influencia no processo de desenvolvimento de células T através de moléculas de adesão e elementos da matriz extracelular, e também através da secreção de polipeptídeos solúveis como citocinas e quimiocinas. Ao lado deste controle intrínseco, já está bem fundamentada a influência hormonal sobre as funções do timo. Mais particularmente, evidências indicam que o hormônio do crescimento (GH) age sobre o microambiente e sobre o compartimento linfóide do órgão (SAVINO & DARDENNE, 2010).

O GH é capaz de aumentar a produção de citocinas pelo timo, bem como o tráfego celular intratímico e o transporte de timócitos. Sabe-se também que as ações do GH podem ser mediadas pelo fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e seu receptor. Além disso, uma vez que o GH é produzido por células do microambiente tímico, o controle deste hormônio sobre o timo pode, ainda, ser compreendido numa via parácrina/autócrina (RETTORI, 2007).

Dada a importância da fisiologia tímica observada no constante suprimento de células T com diferentes especificidades antigênicas do TCR, e o incremento de informações para a área das interações imunoneuroendócrinas, este trabalho objetivou avaliar *in vitro* a participação do GH nas interações entre timócitos e endotélio tímico envolvidas no processo migratório.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Estudar os efeitos do hormônio do crescimento sobre as interações entre timócitos e endotélio tímico envolvidas no processo migratório.

### **2.2 Específicos:**

- a) Avaliar a adesão de timócitos tratados com GH sobre endotélio tímico (tEnd.1);
- b) Avaliar se os timócitos tratados com GH influenciam na deposição de matriz extracelular por células endoteliais (tEnd.1);
- c) Avaliar a expressão de receptores de adesão na superfície dos timócitos após o tratamento com GH;
- d) Avaliar o efeito do GH no citoesqueleto dos timócitos;
- e) Avaliar a migração transendotelial de timócitos após o tratamento com GH.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Timo

#### 3.1.1 Histórico

A origem da palavra timo é incerta, mas parece ser derivada da semelhança que o órgão apresenta com a folha da planta *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) ou da palavra proveniente da Grécia antiga *Θυμος*, que pode ser interpretada como alma, coração, coragem, mente ou propósito. Através do sacrifício de animais jovens, os gregos encontraram uma grande massa de tecido no peito, acima do coração, e concluíram que esta poderia ser a sede da alma (REZZANI et al., 2008). A mais conhecida referência sobre a primeira descrição do timo é atribuída ao médico romano Cláudio Galeno de Pérgamo (129-200 d.C.). Ele afirmou que o timo apresentava o papel de purificação do sistema nervoso e também noticiou que o órgão é maior durante a infância. Porém, a contribuição mais duradoura de Galeno foi referenciar o timo como “o órgão do mistério”, termo que perdurou durante 2000 anos na história da medicina (NISHINO et al., 2006).

Por séculos e até a década de 1960, médicos e cientistas acreditavam que, na melhor das hipóteses, o timo era um órgão endócrino e que, na pior delas, ele era um remanescente evolucionário atrofiado sem função alguma. Este entendimento era derivado, pelo menos em parte, de experimentos demonstrando que camundongos adultos timectomizados produziam respostas imunes celulares e humorais tão eficientemente quanto animais intactos (GUIDOS, 2006). A primeira evidência de sua função no desenvolvimento do sistema imune foi reportada em 1961, quando observou-se que camundongos timectomizados logo após o nascimento tinham um pobre desenvolvimento dos tecidos linfoides, respostas imunes prejudicadas e uma grande susceptibilidade em desenvolver infecções. Embora se acreditasse que os linfócitos derivados do timo seriam imunoincompetentes, foi mostrado em 1967 que eles podiam responder a antígenos e, através de proliferação, geravam uma progênie de células que não secretavam anticorpos (MILLER, 1961, 2002, 2014).

Um enorme progresso no entendimento acerca das funções do timo e das células T surgiram a partir da década de 1960. Alguns dos mais recentes avanços nas diversas áreas da biologia do timo incluem a organogênese do timo, a regulação

transcricional que induz à escolha do tipo celular que se desenvolverá no ambiente intratímico, as doenças infecciosas que refletem-se na fisiologia tímica, e a migração, regulada por quimiocinas, de precursores de células T através dos diferentes microambientes tímicos (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

### **3.1.2 Função e estrutura tímica**

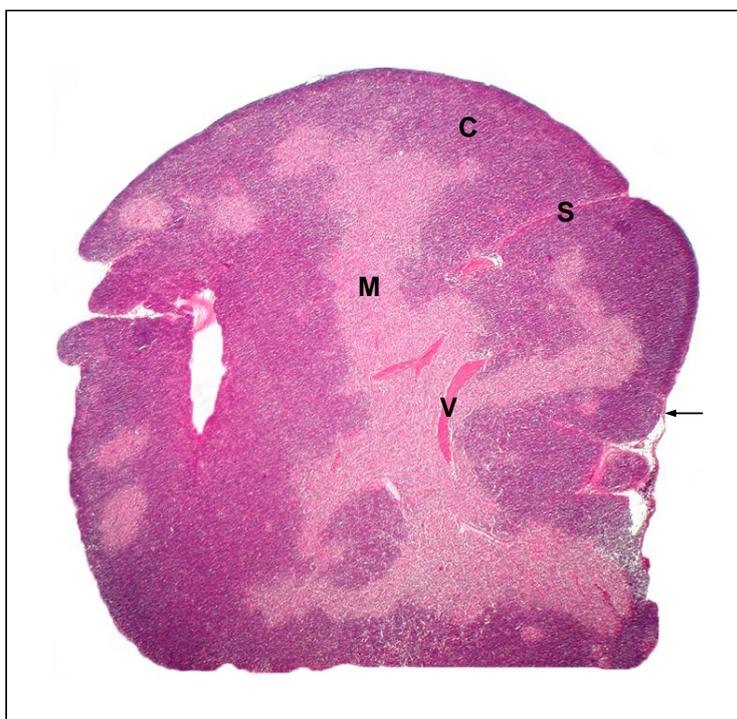
O timo é considerado um órgão-chave do sistema imune dos vertebrados, pois provê o microambiente necessário para o desenvolvimento das células T. Ele é considerado como órgão linfóide primário porque, da mesma forma que a medula óssea, é responsável pelo suprimento de células imunes aos órgãos linfóides secundários. O timo é morfológicamente similar entre as espécies e, nos mamíferos, está localizado no mediastino superior, anteriormente aos grandes vasos do coração e posteriormente ao osso esterno (FAUSTO et al., 2004).

Este órgão consiste de dois lobos, conectados por um istmo. Algumas vezes, esses lobos estão unidos fisicamente, formando uma massa única. Uma delgada cápsula de tecido conjuntivo circunda cada lobo e dá origem aos septos que adentram no órgão e subdividem-no parcialmente em lóbulos interconectantes de variável tamanho e orientação. Vasos sanguíneos e fibras nervosas penetram no timo juntamente com os septos. O timo adulto apresenta as regiões cortical (subcapsular e profunda) e medular, e exhibe, ainda, a junção corticomedular que se encontra entre elas (figura 1) (PEARSE, 2006).

As células no timo são didaticamente classificadas em duas categorias: células derivadas de células-tronco hematopoiéticas, originadas na medula óssea, e células estromais residentes que são derivadas de uma linhagem não-hematopoiética. As primeiras incluem os timócitos, células dendríticas (DC) e pequenas populações de células B, macrófagos e células *natural killer* (NK). As segundas incluem células epiteliais tímicas que residem na medula ou no córtex (mTEC e cTEC, respectivamente), células mesenquimais, fibroblastos e células endoteliais. As regiões tímicas, córtex e medula são compostas por diferentes proporções de ambas as linhagens celulares (DZHAGALOV & PHEE, 2012). Essas duas regiões podem ser distinguidas em virtude da diferente densidade de células linfóides. O córtex tímico de um animal jovem é densamente povoado por timócitos imaturos e células epiteliais associadas a eles. Entretanto, um maior número de

timócitos maduros são encontrados na medula, onde células epiteliais e outros tipos celulares são mais abundantes, apesar da menor celularidade da região. Na medula tímica são observadas as microestruturas características do órgão – os corpúsculos de Hassall, primeiramente descritos em 1849 pelo médico britânico Arthur Hill Hassall, constituídos por grupamentos concêntricos de células epiteliais medulares e células dendríticas, com marcante queratinização. Suas funções estão ainda em discussão, porém atribui-se que estes corpúsculos estejam envolvidos no desenvolvimento de células T regulatórias (FURUKAWA, et al., 2012).

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



Fotomicrografia de um lobo do timo de camundongo C57BL/6, em que pode-se observar claramente as regiões cortical (C), bastante densa em timócitos, e medular (M), menos densa em timócitos. V= vaso sanguíneo; S= septo; e seta= cápsula de tecido conjuntivo. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento: 100x. (MARTINS-NETO, 2009)

### **3.1.3 Microambiente tímico e diferenciação de timócitos**

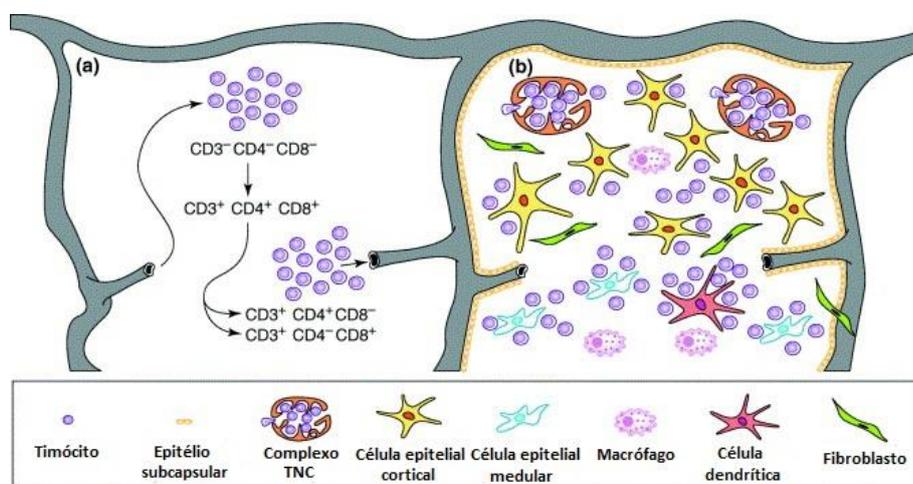
A capacidade única que o microambiente tímico possui para o desenvolvimento das células T é reconhecida há muitos anos e sugere-se, inclusive, que este seja um dos motivos para que sua estrutura tenha sido conservada filogeneticamente entre as espécies (TAKEOKA, et al., 1997). Este conceito é amplamente ratificado quando se leva em consideração que o timo é apto a produzir,

de maneira rápida e eficiente, células T funcionalmente maduras, restritas ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) próprio e autotolerantes. Embora a composição deste microambiente seja descrita há décadas, as pistas moleculares que governam sua formação estão em constante crescimento.

Este microambiente particular, em especial o epitélio tímico, fornece os sinais essenciais para a maturação dos timócitos através da combinação de contatos diretos célula-célula e a produção de fatores solúveis. Além disso, o arranjo tridimensional das TEC é considerado importante para o desenvolvimento das células T, pois permite a migração dos timócitos entre discretos nichos (AW, et al., 2009).

As interações entre timócitos em desenvolvimento e células do microambiente são necessariamente transitórias, porque estas últimas células são elementos sésseis, enquanto que as primeiras migram dentro do órgão durante o processo de diferenciação. Este processo envolve rearranjos do gene do receptor de célula T (TCR) e a expressão temporal de algumas moléculas de superfície, incluindo CD4 e CD8, sendo estas as que melhor definem os estágios da maturação dos timócitos (figura 2). Ao longo da migração e diferenciação de timócitos, a maioria deles recebem sinais para apoptose, e somente 1-3% são “resgatados da morte”, sendo positivamente selecionados, e compõem o repertório de células T do organismo (REZZANI et al., 2008).

**Figura 2. Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos e do microambiente tímico.**



a) Células progenitoras entram no timo através da junção corticomedular e migram no interior do órgão durante o processo de diferenciação. b) Durante esse processo, os timócitos entram em contato

com diferentes células do microambiente tímico presentes em cada região do lóbulo (adaptado de SAVINO et al., 2002).

Sabendo-se, entretanto, que sob condições fisiológicas os precursores intratímicos de células T não se renovam, a geração de células T maduras depende do recrutamento contínuo de progenitores vindos da medula óssea, via corrente sanguínea. Então, estas células devem: a) ter potencial para linhagem de célula T; b) ser liberadas na circulação; c) ter capacidade para entrar no timo. Esta entrada de progenitores no timo ocorre nos vasos sanguíneos presentes na junção corticomedular e envolve a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e a presença de quimiocinas, como CCL21 e CCL25. Já foi atestado que os progenitores apresentam receptores para as quimiocinas, o CCR7 e o CCR9 respectivamente, além de PSGL-1, um ligante para a P-selectina expressa pelo endotélio tímico (SARAN, et al., 2012; JEKER, et al., 2008).

Após sua entrada no timo, os timócitos migram a partir da junção corticomedular em direção à região subcapsular do córtex tímico. O primeiro estágio destas células é caracterizado pela ausência dos co-receptores CD4 e CD8, sendo assim chamadas de duplo-negativas (DN), que representam 5% do total de timócitos. Neste momento, há o primeiro *checkpoint* regulatório dos timócitos (chamado  $\beta$ -seleção) que consiste no rearranjo do gene TCR $\beta$  e sua expressão, permitindo a posterior formação do complexo pré-TCR. As células que falham nesse processo entram em apoptose. Subsequentemente, sinais gerados pelo pré-TCR e pelo microambiente resultam na proliferação e diferenciação dos timócitos DN, resultando no próximo estágio, o duplo-positivo (DP), dado pela expressão concomitante das moléculas CD4 e CD8 na superfície celular (SWAT, et al., 2006).

Após a  $\beta$ -seleção, o grande *pool* de timócitos DP, que representa cerca de 80% do total do órgão, desligam o seu ciclo celular e iniciam o rearranjo da cadeia  $\alpha$  do TCR. O produto deste gene é expresso e compõe o TCR  $\alpha\beta$  maduro. Esses timócitos, então, interagem através do seu TCR com os complexos MHC-peptídeo apresentados pelas células estromais, como cTEC e DC presentes no córtex. A maioria (~90%) dos timócitos DP interagem tão fracamente com os ligantes MHC-peptídeos que os sinais intracelulares que são requeridos para sustentar a viabilidade não são gerados, levando estas células à morte por negligência (*death by neglect*). Uma pequena fração de timócitos (~5%) carrega TCRs que ligam-se de

maneira muito forte aos ligantes do MHC. Estes linfócitos poderiam causar patologias autoimunes se fosse permitido que saíssem do timo. A sinalização destes TCRs promove rápida morte apoptótica (GERMAIN, 2002).

Por fim, as células que portam TCRs que reconhecem os ligantes do MHC e geram sinais que têm uma intensidade intermediária entre aqueles que ligam-se fraca ou fortemente, iniciam o processo de múltiplas etapas conhecido como seleção positiva. Os timócitos DP positivamente selecionados são induzidos a se diferenciarem em células simples-positivas (SP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e migram rapidamente para a medula tímica após esse processo (DZHAGALOV & PHEE, 2012).

A medula desempenha a função de induzir tolerância contra os auto-antígenos apresentados pelas mTEC e DCs e, dessa forma, prevenir a autoimunidade. Por isso, a migração do córtex para a medula é essencial para a eliminação dos timócitos auto-reativos. A remoção destes timócitos é conhecida como seleção negativa e estas células passam cerca de 12 dias na medula antes de serem exportadas do timo. Durante este período, os timócitos maturam e podem ser identificados pela análise dos perfis de expressão de CD62L (ligante CD62, também conhecido como L-selectina) e CD69, tornando-se imunocompetentes quando apresentam o fenótipo CD62L<sup>hi</sup>CD69<sup>low</sup> (GRAY, et al., 2005).

Finalmente, os timócitos SP selecionados podem deixar o timo e formar o repertório de células T periféricas. Este é o último evento migratório que estas células desempenham dentro do órgão e sabe-se que apenas 1% de todos os timócitos é exportado por dia na circulação (~10<sup>6</sup> em camundongos e 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> em humanos, a depender da idade). O exporte de células maduras ocorre através do espaço perivascular, que é permeado por vênulas pós-capilares, arteríolas e linfáticos. Os sinais que regulam essa saída não estão claramente identificados. Em particular, a proteína G acoplada ao receptor S1P<sub>1</sub> (receptor-1 de esfingosina-1-fosfato) é a molécula-chave na saída de células T maduras do timo e na saída de linfócitos de linfonodos. Além disso, a baixa expressão de CD69 em timócitos maduros antes de sua saída também tem sido apontada como controlador do *output* tímico (TAKAHAMA, 2006; FINK, 2013).

A célula endotelial tímica, apresenta um papel fundamental na fisiologia tímica, visto que os progenitores celulares migram através do endotélio no momento

da sua chegada ao timo, e da mesma forma, os timócitos maduros cruzam esta barreira endotelial no momento da sua saída para a circulação sanguínea. Este endotélio, além das suas funções inerentes à manutenção do tônus vascular e homeostase do fluxo sanguíneo, também atua no controle da resposta inflamatória. Neste processo, as células endoteliais interagem com os leucócitos em transmigração, apresentando moléculas de adesão, quimiocinas e reorganizando o seu citoesqueleto, a fim de permitir a passagem dos leucócitos para o tecido (ZLOTOFF & BHANDoola, 2011; BAHIA et al., 2006).

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que as células endoteliais tímicas são ativamente moduladas por fatores solúveis, como o hormônio do crescimento (GH) e o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Por exemplo, foram observados diversos efeitos como: alterações na morfologia celular, reorganização do citoesqueleto, expressão de moléculas de adesão na membrana celular e a produção de moléculas da matriz extracelular por estas células *in vitro* (RAMOS, 2008; VIANA et al., 2015).

#### **3.1.4 Matriz extracelular tímica e citoesqueleto de timócitos**

A matriz extracelular (MEC) é o componente acelular presente em todos os tecidos e órgãos que proporciona não apenas um arcabouço físico para as células, mas também inicia os sinais biomecânicos e bioquímicos que são requeridos para a morfogênese tecidual, diferenciação e homeostase. Embora, fundamentalmente, a MEC seja constituída por água, proteínas e polissacarídeos, cada tecido possui uma MEC cuja composição e topologia são únicas, em virtude do diálogo entre os vários constituintes celulares (FRANTZ, et al., 2010).

Os eventos de adesão celular à MEC são mediados por receptores de matriz extracelular, como integrinas, receptores com domínio de discoidina e sindecans. A adesão é capaz de mediar o acoplamento do citoesqueleto à MEC e está envolvida na migração celular sobre o substrato. Ainda, a MEC direciona importantes funções fisiológicas através da ligação com fatores de crescimento e interação com os receptores celulares, sendo que estes, por sua vez, iniciam sinais de transdução e regulam a transcrição gênica (SCHMIDT & FRIEDL, 2010).

No contexto da diferenciação intratímica dos timócitos, os eventos de adesão e de-adesão tornam possível o constante contato entre as células em maturação e

as diferentes regiões do microambiente tímico, quer sejam as células estromais ou as moléculas da MEC. A distribuição da matriz no timo não segue um padrão homogêneo, sugerindo-se um relevante papel dessas moléculas na fisiologia do órgão. Sabe-se, inclusive, que o perfil de deposição de várias glicoproteínas no timo é amplamente conservado entre os mamíferos. Por exemplo, na região medular dos lóbulos tímicos, moléculas como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV formam uma rede bastante espessa, enquanto que no córtex são encontradas apenas delgadas fibras de MEC (SAVINO et al., 2000).

Levando-se em consideração a distribuição não-homogênea de moléculas da MEC no timo, há evidências que estas apresentem um papel fundamental na localização de diferentes estágios de maturação dos timócitos. É possível, ainda, que esses arranjos supramoleculares de MEC atuem como um “cinturão” transportador, permitindo a migração ordenada das células no microambiente tímico (LINHARES-LACERDA et al., 2010).

Distintos tipos celulares do timo são capazes de produzir componentes da MEC, entre eles citam-se as TECs, fibroblastos e macrófagos. A deposição da MEC no timo correlaciona-se com a expressão de seus receptores específicos, como receptores a fibronectina VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) e VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ), e receptores a laminina VLA-3 ( $\alpha 3\beta 1$ ) e VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$ ) por timócitos em diferenciação e células do próprio microambiente. Os receptores supracitados pertencem à família integrina, que correspondem a heterodímeros transmembrana  $\alpha$  e  $\beta$  ligados não-covalentemente, que suportam os eventos de reorganização do citoesqueleto, formação de adesão focal e mudanças na expressão gênica (GAMEIRO et al., 2010).

O citoesqueleto de actina é um importante alvo da sinalização mediada por integrinas. Ele está envolvido em diversas atividades celulares como na manutenção da morfologia celular, no tráfego intracelular de vesículas, na sustentação de organelas, e na polarização celular para os processos de adesão e migração. As células hematopoiéticas, em virtude da sua mobilidade multidirecional, requerem uma alta capacidade de polimerizar o citoesqueleto de actina. Assim, as células leucocitárias em migração exibem dois polos: o *leading edge*, rico em receptores de quimiocinas e moléculas de adesão na parte dianteira da célula, e o uropódio, descrito como a “cauda celular”, rico em moléculas de adesão intercelulares (ICAMs) (WIESNER et al., 2005).

Em células T, já está bem fundamentada a participação do citoesqueleto de F-actina em diversos processos após a ativação destas células, como a formação da sinapse imunológica, a secreção de citocinas e a ativação transcricional. No entanto, a participação da F-actina na diferenciação de timócitos foi pouco estudada. Sabe-se que o rearranjo desse citoesqueleto está diretamente envolvido na sinalização do pré-TCR, que leva a um efeito proliferativo nos timócitos DN e na formação subsequente de DP e SP. Além disso, é importante frisar a participação de diversas proteínas acessórias do citoesqueleto e também dos receptores integrina durante os estágios da diferenciação de timócitos (ZHANG et al., 2002).

A partir de muitos estudos *in vitro*, obtiveram-se resultados consistentes, evidenciando-se que as flutuações na expressão de receptores de matriz ao longo da diferenciação de timócitos fornecem pistas para o melhor entendimento de como os timócitos interagem sequencialmente com a MEC. É sabido, entretanto, que os mecanismos moleculares que governam a migração de timócitos são complexos, havendo sinergismos e antagonismos entre quimiocinas, moléculas de matriz e, até mesmo, com enzimas degradantes de matriz como as metaloproteinases (MMPs). Além disso, têm-se publicado que o timo é alvo de um controle neuroendócrino, no qual, hormônios e neuropeptídeos clássicos modulam as funções tímicas (SAVINO et al., 2003).

### **3.1.5 Controle neuroendócrino do timo**

Evidências substanciais a partir de vários estudos clínicos e experimentais fortemente indicam que a comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune representa uma característica fundamental de um organismo vivo, tanto na saúde quanto na doença. Desde o início da década de 1930, o endocrinologista Hans Selye sugeriu esse *link* intersistêmico através de ligantes e receptores em comum. De fato, os sistemas nervoso, endócrino e imune interagem, buscando adaptar-se a situações como infecção, injúria tecidual, câncer e, até mesmo, desordens psiquiátricas (MORALE et al., 2001; RETTORI, 2007).

O timo desempenha um papel proeminente no sistema imunoneuroendócrino, produzindo e liberando vários hormônios tímicos, juntamente com uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que agem em *feedback* sobre o eixo hipotálamo-pituitária. Este, por conseguinte, influencia os órgãos linfoides via

neurotransmissores e hormônios pituitários. Em adição a isso, tecidos linfoides são direta e extensivamente inervados, estando as fibras nervosas em contato direto com linfócitos, macrófagos ou seus precursores, desempenhando suas funções neuro-efetoras (BARNARD, et al., 2008).

Hormônios pituitários, tireoidianos, esteroides e neuropeptídeos modulam, direta ou indiretamente, o desenvolvimento de timócitos, gerando sinais positivos ou negativos para a proliferação celular, através da produção de citocinas diversas. A produção intratímica de hormônios e fatores de crescimento, bem como a expressão de seus receptores, vem sendo publicada nos últimos anos. E além da clássica via endócrina, os mecanismos parácrino e autócrino estão envolvidos na modulação tímica. Por isso, os níveis circulantes normais desses fatores e a produção local de maneira controlada são necessários para manter a homeostase e as funções biológicas deste órgão (FERONE, et al., 2000).

## **3.2 Hormônio do Crescimento**

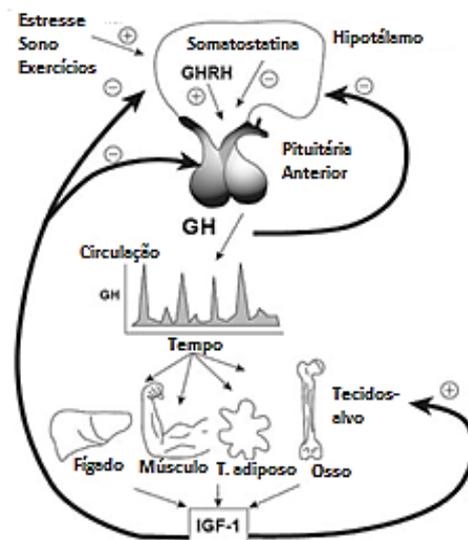
### **3.2.1 Fisiologia do eixo GH/IGF-1**

O hormônio do crescimento (GH – *growth hormone*) e o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 – *insulin-like growth factor-1*) são importantes participantes na orquestração do crescimento e desenvolvimento. Eles cooperam ou competem com outros fatores de crescimento na passagem das células através de seu ciclo celular. Conseqüentemente, isto pode levar ao estímulo ou inibição do crescimento, e também à diferenciação, sobrevivência, apoptose e tumorigênese. Suas funções no tocante à modulação do sistema imune têm sido referidas por diversos autores na literatura (VAN BUUL-OFFERS & KOOIJMAN, 1998).

O GH, um peptídeo de cadeia simples contendo 191 aminoácidos, é sintetizado e secretado, majoritariamente, pelas células somatotróficas da pituitária anterior. Sua secreção é regulada por dois neuro-hormônios hipotalâmicos: o fator liberador de GH (GHRF – *GH releasing factor*) e o fator inibidor de GH (somatostatina). A razão entre estes dois fatores representa o mecanismo pelo qual influências neurológicas e extra-neurológicas podem afetar a liberação do GH no organismo. Porém outras vias de regulação do GH também são conhecidas, como a grelina – um peptídeo secretado pelo estômago e hipotálamo, e a insulina secretada pelo pâncreas. Além disso, o GH pode modular sua própria secreção, indiretamente,

produzindo o IGF-1 que inibe as células somatotróficas e estimula a liberação de somatostatina (figura 3) (CASTELLANO, et al., 2009).

**Figura 3. Regulação do GH e síntese e secreção do IGF-1**



Esquema mostra a secreção do GH pela pituitária anterior e seus principais órgãos-alvo. O feedback negativo também está ilustrado. GHRH: hormônio liberador de GH (adaptado de HIGHAM & TRAINER, 2008).

A secreção do GH se dá de maneira pulsátil e, na maior parte do dia, o nível GH no plasma é de 5 ng/mL em humanos adultos, com um ou dois picos de liberação após as refeições. Os mais baixos níveis de GH ocorrem nas primeiras horas da manhã e os mais altos se dão uma hora após o início do sono profundo. A liberação de GH é aumentada por  $\alpha_2$  agonistas, hipoglicemia e situações de estresse, e inibida por  $\beta$  e  $\alpha_1$  agonistas, glicocorticoides e envelhecimento. Também é conhecido que diferentes estímulos, incluindo sexo, idade, adiposidade, horas de sono, dietas e exercícios afetam a frequência e magnitude dos pulsos de GH na circulação (PERRINI, et al., 2010).

Os efeitos biológicos do GH são mediados pela ligação com seu receptor específico (GHR), uma proteína transmembrana de cadeia simples, expressa pela maioria dos tipos celulares (hepatócitos, adipócitos, fibroblastos, linfócitos, miócitos). Sua dimerização ativa a via JAK/STAT (*Janus Kinase and Signaling Transducer and Activator of Transcription*) que induz a transdução de sinal, por meio de mudanças no influxo de  $Ca^{+2}$ , regulando a contração do citoesqueleto e modificando a secreção de hormônios. O domínio extracelular do GHR pode ser proteoliticamente quebrado e estar presente na circulação, na forma de GHBP (*GH – binding protein*), onde

compete com os receptores de membrana pela disponibilidade de GH. Acredita-se que os níveis circulantes de GHBP's modulem os efeitos do GHR (WELNIAK, et al., 2002).

Nas décadas de 1970 e 80, a hipótese da somatomedina propunha que o IGF-1 (outrora denominado somatomedina C) mediava todos os efeitos do GH. Dessa forma, o IGF-1 secretado pelo fígado seria crucial para as ações promotoras do crescimento do GH. Entretanto, recentemente foi estabelecido que a expressão de IGF-1 não é limitada ao fígado e a síntese de GH não está restrita à pituitária. Assim, foi necessário modificar a hipótese da somatomedina, propondo, desta vez, que o GH poderia atuar diretamente em muitos órgãos-alvo, estimulando a produção local de IGF-1 (ROELFSEMA & CLARK, 2001).

### **3.2.2 Ações do GH no timo**

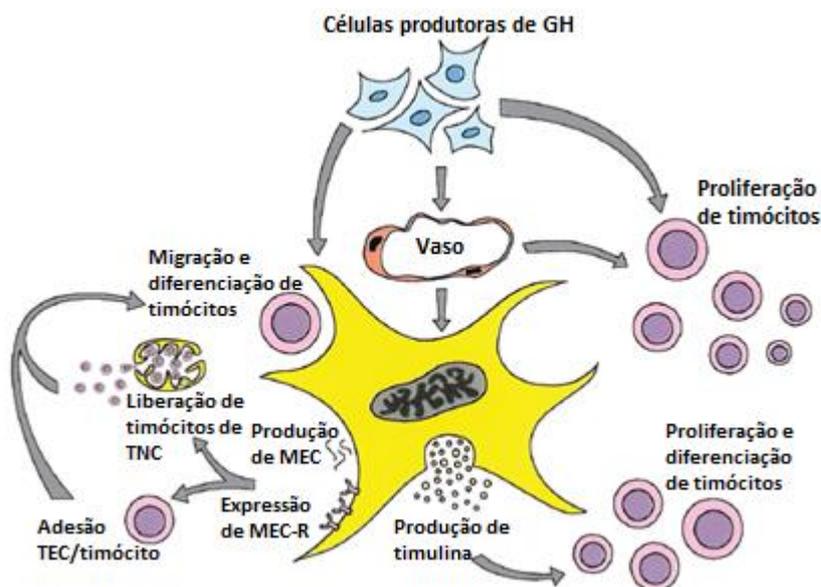
Um estudo feito há 80 anos associou, pela primeira vez, a hipofisectomia com a atrofia tímica em ratos. Embora as funções do GH e do timo não fossem precisamente conhecidas nessa época, esta foi uma observação preliminar para experimentos posteriores sobre o papel do GH na imunorregulação. A ideia de que o GH teria um efeito positivo sobre o sistema imune e, especialmente, sobre o timo, é advindo da observação que camundongos *dwarf* (anões) exibem marcante atrofia tímica. A empobrecida celularidade tímica em ratos hipofisectomizados e em duas linhagens de camundongos *dwarf* (Ames e Snell-Bagg) pode ser parcialmente ou completamente revertida pela suplementação com GH ou IGF-1 (KERMANI, et al., 2012).

Em seres humanos, há evidências das propriedades imunomoduladoras do GH. Dados na literatura revelam que o volume do timo e o número de células CD4<sup>+</sup> são significativamente mais baixos em um grupo de crianças HIV<sup>+</sup> com deficiência de GH (GHD) do que em um grupo não-GHD. O tratamento de pacientes HIV<sup>+</sup> com altas doses de GH aumenta a massa tímica e a geração de células CD4<sup>+</sup> e a suplementação com GH em adultos com deficiência de GH restaurou dois parâmetros da timopoiese, a proliferação intratímica de precursores de células T e a saída de células T naïves. A questão dos efeitos timotrópicos do GH, com relação a sua ação direta ou indireta pela síntese local de IGF-1, permanece em discussão (NAPOLITANO, et al., 2002, 2008; MORRHAYE, et al., 2009).

O GH age sobre os compartimentos linfoide e não-linfoide do timo, refletindo nas suas funções. Primeiro, ele pode modular o número de timócitos pelo aumento de sua proliferação. Segundo, ele estimula o crescimento das TECs que são essenciais para suportar a diferenciação das células T como previamente discutido. Terceiro, o GH é capaz de aumentar a produção de laminina pelas TECs, o principal componente da MEC, e dessa forma, influenciar a migração/diferenciação intratímica (MARTENS & GEENEN, 2011).

Além disso, já está estabelecido que o GH favorece a produção de citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 pelas células do microambiente tímico, bem como aumenta os níveis de timulina (figura 4). Além de estimular o tráfego de timócitos dentro das *thymic cell nurse* (TNC – complexo de células epiteliais no córtex tímico que liga-se a timócitos DP e os internaliza), induzir o repovoamento de timos atrofiados em ratos diabéticos e estimular eventos de adesão celular (SAVINO et al., 2002).

**Figura 4. Efeitos pleiotrópicos do GH sobre as células tímicas**



O GH age diretamente sobre os timócitos, modulando sua proliferação. Age também sobre as TEC que medeiam suas diversas ações sobre os timócitos. ECM: matriz extracelular. ECM-R: receptores a matriz extracelular. TNC: célula nurse tímica. TEC: célula epitelial tímica (adaptado de SAVINO et al., 2002).

Finalmente, sabe-se que estes processos tímicos, bem como o número das subpopulações de timócitos e células T maduras, passam por alterações dinâmicas durante a patofisiologia de uma dada infecção. Então, são eles alguns dos eventos que podem ser considerados como alvos em potencial para abordagens terapêuticas, já que a manipulação intratímica oferece uma possível via para o

aumento da funcionalidade das células T durante uma infecção (RETTORI, 2007). Além disso, o GH pode representar uma ferramenta para o tratamento de uma variedade de infecções relacionadas diretamente ou não com o timo, incluindo AIDS, a doença de Chagas e outras doenças virais. Também há a possibilidade do uso terapêutico desse hormônio na recuperação de pacientes no pós-transplante de medula óssea e deficiências hormonais de GH (BARNARD, et al., 2008; CHU, et al., 2008).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção de timócitos murinos

Camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 4 a 8 semanas, de ambos os sexos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas, protocolo nº: 028370/2010-07, foram utilizados para se obter os timócitos frescos. Os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental (120 mg/kg) e os timos foram removidos e macerados em placa de 24 poços contendo 1 mL de PBS/SBF 4%. O sobrenadante foi recolhido e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02%.

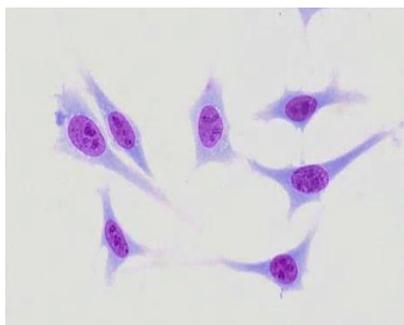
### 4.2 Linhagem de células endoteliais

Para este trabalho foi utilizada a linhagem de células endoteliais tímicas (tEnd.1), derivadas de endotelioma tímico murino de camundongos C57BL/6. Seu isolamento e caracterização foram realizados por Williams e colaboradores em 1988.

### 4.3 Padronização da cultura celular

As células endoteliais tEnd.1 (figura 5) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e gentamicina 40 mg/mL. As células foram mantidas em condições estéreis, em estufa a 37°C, com atmosfera umedecida contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A passagem destas células foi realizada quando estas se encontravam em estado de semi-confluência por meio do tratamento com solução de Tripsina 0,25% - EDTA 0,02% em solução livre de cálcio e magnésio, pH 7,2.

**Figura 5. Linhagem de células endoteliais tímicas (tEnd.1).**



As células endoteliais em cultura apresentam citoplasma abundante, com projeções citoplasmáticas ramificadas ou não. Seu núcleo é centralizado de forma arredondada a elíptica. Na fotomicrografia, as tEnd.1 foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Aumento: 400x.

#### **4.4 Tratamento de timócitos *in vitro***

Após contagem,  $1 \times 10^6$  timócitos frescos foram plaqueados em placas de 24 poços, juntamente com 500  $\mu$ L de RPMI 2% SBF, sendo tratados ou não com GH (100 ng/mL) durante uma hora, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C (SMANIOTTO et al., 2011). Então, as células eram recolhidas, centrifugadas e ressuspensas para análise em citometria ou para serem submetidas a outros ensaios.

#### **4.5 Análise por citometria de fluxo**

Para avaliação fenotípica dos timócitos após tratamento com GH ou após outros ensaios, estas células foram colocadas em microtubos e incubados por 20 minutos, sob refrigeração e protegidos da luz, com uma mistura dos seguintes anticorpos devidamente diluídos em PBS/SBF 4%: anti-CD4/APC, anti-CD8/PerCP, anti-CD49d/PE, anti-CD49e/PE, anti-CD49f/PE. Os isotipos controles IgG2a/PE e IgG2a/APC foram utilizados como controles negativos. Então, as células foram recolhidas e fixadas em solução de PBS-Formaldeído 2%, sendo posteriormente analisadas pelo citômetro de fluxo FACSCanto II.

Os resultados foram expressos na forma de *densityplots* e histogramas, através do software WinMDI versão 2.9. As células foram selecionadas a partir dos parâmetros de tamanho x granulosidade já pré-estabelecidos para os timócitos (SMANIOTTO et al., 2005).

#### **4.6 Ensaio de adesão**

As células tEnd.1 foram contadas e plaqueadas ( $1 \times 10^5$ ) em garrafas de cultura por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão celular. Timócitos pré-tratados ou não com GH (100 ng/mL) foram adicionados sobre as culturas de tEnd.1, numa proporção de 50 timócitos por célula endotelial, e as coculturas foram incubadas em estufa por uma hora. A seguir, as células foram lavadas delicadamente com PBS a 37°C para remoção dos timócitos não-aderentes.

No primeiro ensaio de adesão celular, após a remoção dos timócitos não-aderentes, a cultura foi fixada com metanol absoluto por 10 minutos e corada,

também por 10 minutos, com Giemsa. Então, as células foram fotografadas e contadas ao microscópio óptico para o cálculo do índice de adesão (IA), segundo a fórmula abaixo (LANNES-VIEIRA et al., 1993):

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

Em outros ensaios, após a remoção dos timócitos não-aderentes, os timócitos aderidos às células tEnd.1 foram recolhidos, por meio de lavagens com PBS gelado, e quantificados. Em seguida, os timócitos foram marcados com anticorpos específicos para se determinar seu fenótipo por citometria de fluxo.

#### **4.7 Ensaio de imunocitoquímica**

Células tEnd.1 ( $2 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em poços de placas labtek com 200  $\mu\text{L}$  de RPMI completo durante 16 horas para adesão celular. Após esse período, o sobrenadante foi removido e  $2 \times 10^5$  timócitos tratados ou não com GH (100 ng/mL), por uma hora, foram adicionados sobre as culturas de tEnd.1 no volume final de 200  $\mu\text{L}$ . A cocultura foi mantida por 24 horas e então, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol por 10 minutos. Após a fixação, as culturas foram hidratadas com PBS por 10 minutos e bloqueadas com PBS a 1% de BSA por 30 minutos para impedir a formação de ligações inespecíficas dos anticorpos primários às diferentes preparações. As células foram incubadas com o anticorpo primário específico para a fibronectina e laminina em câmara úmida por 1 hora e depois lavadas com PBS. Em seguida, as culturas foram incubadas por 45 minutos com o anticorpo secundário GAR-FITC e novamente lavadas com PBS para posterior montagem. As lâminas foram avaliadas através de microscopia de fluorescência. A quantificação da deposição das moléculas de matriz foi mensurada através do programa ImageJ 1.47. Como controle negativo, em alguns poços, as células não foram incubadas com o anticorpo primário, recebendo apenas o anticorpo secundário.

#### **4.8 Marcação direta de citoesqueleto de F-actina em timócitos**

Para avaliar se o tratamento com GH estimula a polimerização dos filamentos de F-actina, os timócitos foram expostos ao GH (100 ng/mL) durante 30 minutos, sendo posteriormente incubados com anticorpos CD4 e CD8 durante 20 minutos,

sob refrigeração e protegidos da luz. Então, após a permeabilização da membrana celular, com citofix/cytoperm durante 20 minutos, e lavagem com tampão permwash, os tímócitos foram marcados com faloidina por meia hora e, finalmente, analisados por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência.

#### **4.9 Ensaio de migração transendotelial**

Os ensaios de migração de tímócitos *in vitro* foram desenvolvidos utilizando-se o sistema “transwell”, empregando insertos com membranas de policarbonato de 10 mm de diâmetro e poros de 8  $\mu\text{m}$ . Inicialmente, as células tEnd.1 foram cultivadas sobre a membrana dos insertos:  $2 \times 10^5$  tEnd.1/inserto em 500  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 completo. Após 48 horas de cultivo, as células tEnd.1 formaram uma monocamada na membrana dos insertos, sobre a qual foram adicionados tímócitos ( $2 \times 10^6$  tímócitos/inserto em 500  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo) previamente tratados ou não com GH (100 ng/mL, durante 1 hora). Alguns poços continham IGF-1 (100 ng/mL) na câmara inferior, usado como quimioatraente.

A transmigração celular foi desenvolvida por 18 horas, em estufa de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, os tímócitos que transmigraram para a câmara inferior do inserto foram recolhidos, contados em câmaras de Neubauer e marcados com anticorpos de interesse para posterior análise citofluorimétrica (JOHNSON-LÉGER et al., 2002).

#### **4.10 Análise estatística**

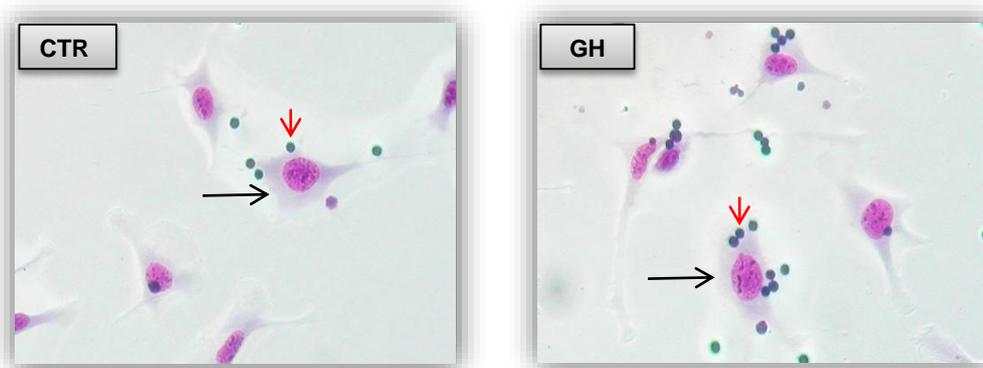
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados através do teste *t* de Student e one-way ANOVA, aplicando-se o pós-teste de Newman Keuls. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para construção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.00.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Timócitos tratados com GH aderem em maior número ao endotélio tímico

Após o tratamento, os timócitos foram adicionados às monoculturas de tEnd.1 e mantidos em cocultura durante 1 hora. Posteriormente os timócitos não-aderentes foram removidos, as células foram fixadas, coradas e foram obtidas fotomicrografias que demonstram o cocultivo das células endoteliais e dos timócitos aderidos a elas. Analisando-se as fotomicrografias de maneira qualitativa, foi constatado que o tratamento aumentou o número de timócitos aderidos (figura 6).

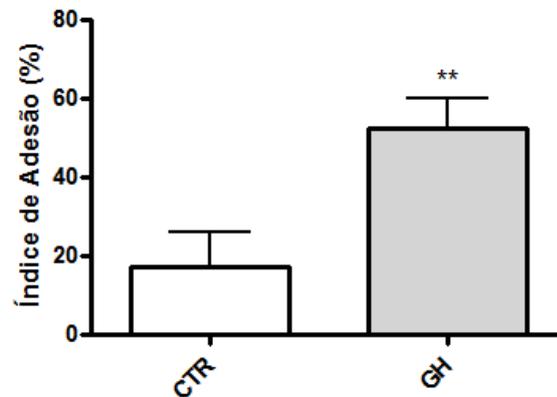
**Figura 6. Cocultivo de células endoteliais tímicas (tEnd.1) e timócitos**



Fotomicrografias representativas de timócitos aderidos (setas vermelhas) a células endoteliais (setas pretas). A adesão foi desenvolvida durante 1 hora, a 37°C. As células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Aumento: 200x

Ao microscópio óptico, as células tEnd.1 e os timócitos foram contados para se calcular o índice de adesão, previamente descrito por Lannes-Vieira e colaboradores em 1993, indicando o número relativo de timócitos que foram capazes de aderir às células endoteliais. Desta forma, evidenciou-se quantitativamente que o tratamento com GH foi capaz de elevar o índice de adesão dos timócitos às células tEnd.1 quando comparado ao grupo controle (figura 7).

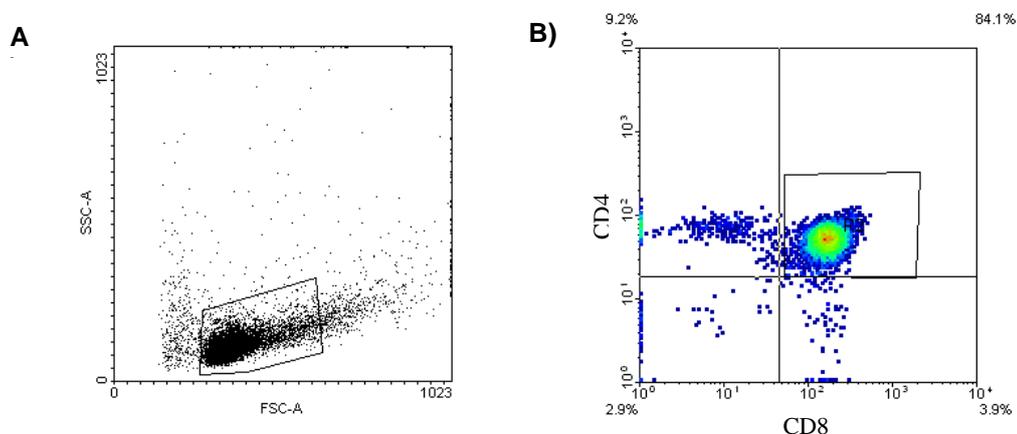
**Figura 7. Índice de adesão de timócitos às células endoteliais tímicas**



O gráfico mostra o índice de adesão dos timócitos às tEnd.1. Cada coluna gráfica representa a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student, sendo \*\*  $p \leq 0,01$ .

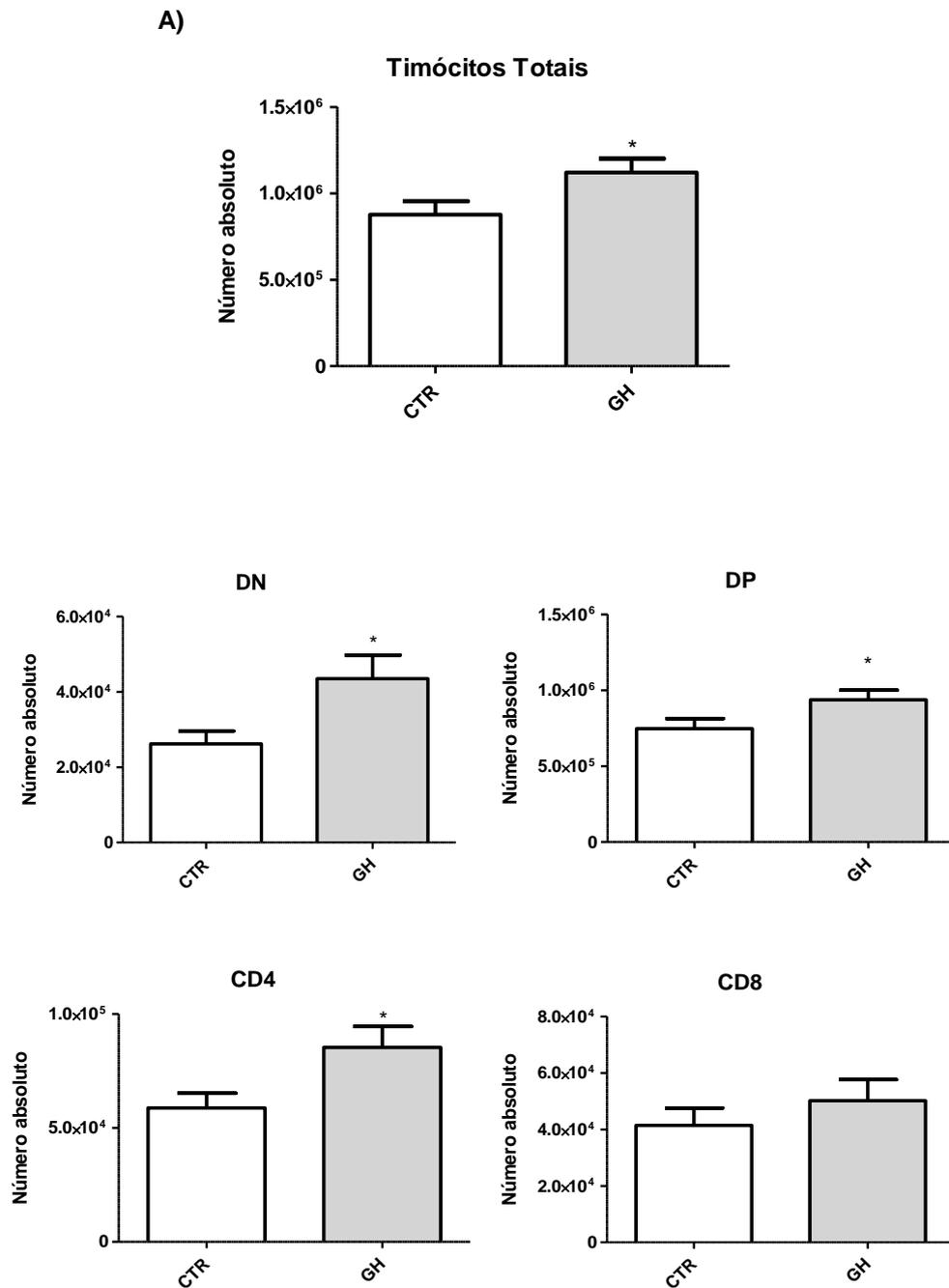
Em experimentos seguintes, após a remoção dos timócitos não-aderentes, os timócitos aderentes foram recolhidos e quantificados, a fim de se obter o número absoluto de timócitos aderidos e analisados por citometria para avaliar o fenótipo CD4/CD8 (figura 8). Observou-se que o GH promoveu a adesão de timócitos às células tEnd.1. Esse efeito foi constatado no número total de timócitos aderidos (figura 9A), e em suas subpopulações, com exceção dos timócitos CD8<sup>+</sup> simples-positivos (figura 9B).

**Figura 8. Esquema representativo das subpopulações de timócitos em análises de citometria de fluxo.**



**(A)** Delimitação da população de timócitos no *dotplot* tamanho (FSC) x granulocidade (SSC). **(B)** *densityplot* CD4-FITC x CD8-PerCP feito a partir da população de timócitos definida em A, mostrando as diferentes subpopulações de timócitos, em que DN=duplo-negativo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; DP = duplo-positivo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; CD4=simples-positivo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; CD8=simples-positivo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.

Figura 9. GH promove adesão de timócitos às células endoteliais.

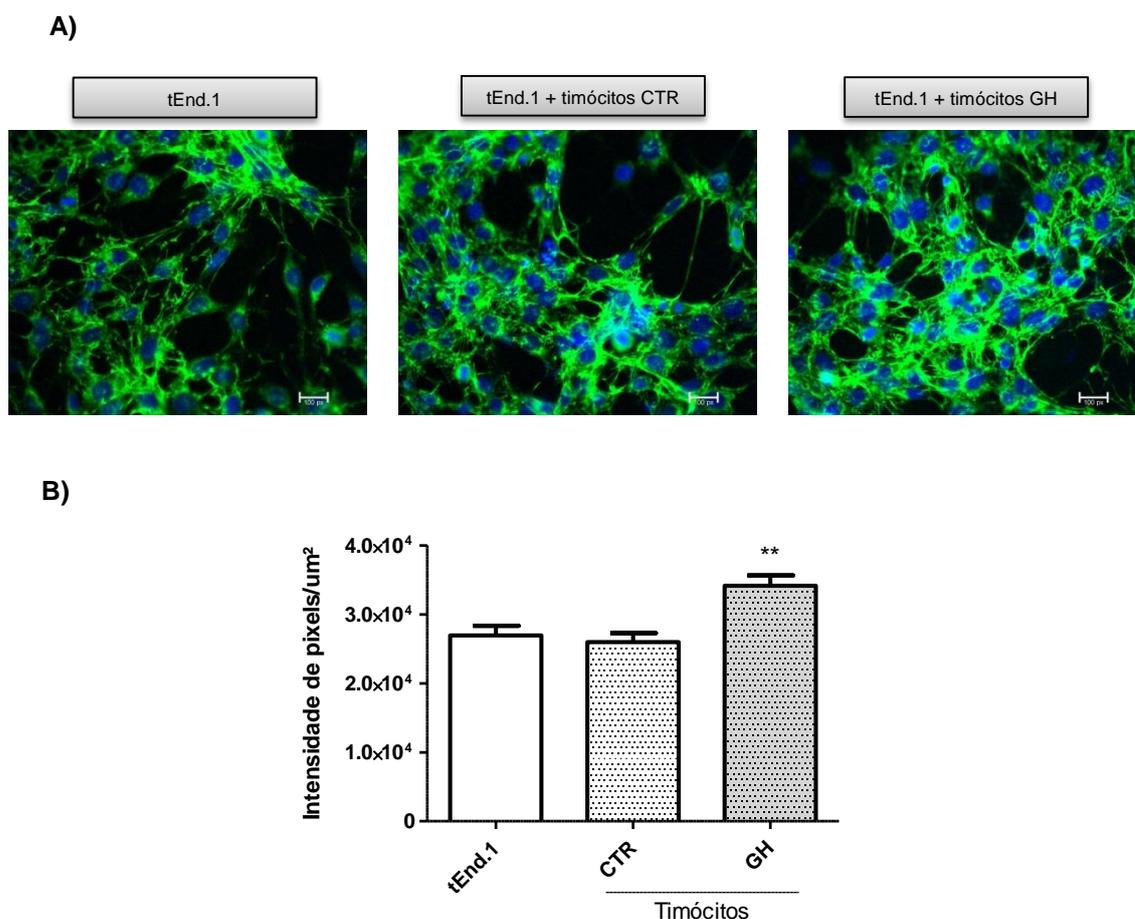


Timócitos foram adicionados às culturas de tEnd.1 durante 1 hora e então recuperados para contagem e fenotipagem CD4/CD8. Em A, o número total de timócitos aderidos às tEnd.1. Em B, as subpopulações de timócitos aderidos às tEnd.1. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student, sendo \*  $p \leq 0,05$ , DN = timócitos duplo-negativos e DP = timócitos duplo-positivos.

## 5.2 Células endoteliais apresentam maior deposição de matriz extracelular em contato com timócitos tratados com GH

Para verificar se os timócitos tratados previamente com GH influenciam a deposição de moléculas de matriz extracelular pelo endotélio tímico, foi realizado um cocultivo durante 24 horas e posteriormente foi realizada a detecção de fibronectina e laminina através de ensaio imunocitoquímico. Foram obtidas fotomicrografias e a intensidade de fluorescência foi quantificada. O resultado, no tocante à fibronectina, mostrou que as tEnd.1 em cocultura com os timócitos mantêm o mesmo padrão de síntese desta molécula quando comparada a monocultura de tEnd.1. Entretanto, foi observado que no grupo no qual houve a cocultura dos timócitos pré-tratados com GH, há uma maior deposição de fibronectina pelas células endoteliais (figura 10).

**Figura 10. Deposição de fibronectina por células endoteliais cocultivadas com timócitos**

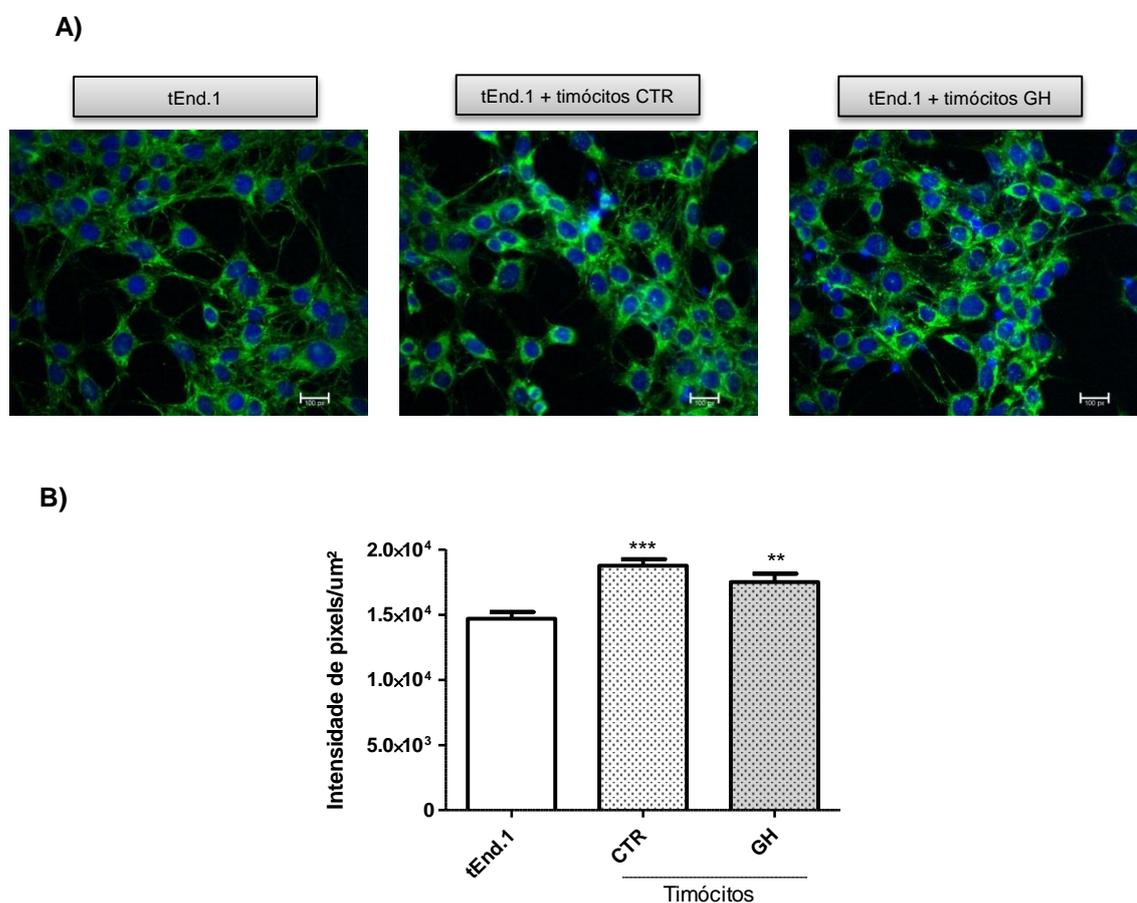


A) Fotomicrografias demonstram a deposição de fibronectina por tEnd.1 (em verde) após 24 horas de cocultivo com timócitos. Em azul estão marcados os núcleos das células (DAPI). Aumento: 400x B) Gráficos mostram a quantificação em pixels da intensidade de fluorescência da deposição de

fibronectina através do ImageJ. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes, com  $n=12$ . A análise estatística foi feita com ANOVA, pós-teste de Turkey, sendo  $**p<0,01$  em comparação ao grupo tEnd.1

Quanto à deposição de laminina, observou-se um aumento na deposição desta molécula pelas células tEnd.1 quando cocultivadas com timócitos em comparação ao grupo da monocultura. No entanto, a presença de timócitos previamente tratados com GH, não alterou o padrão de deposição de laminina pelas células endoteliais (figura 11).

**Figura 11. Deposição de laminina por células endoteliais cocultivadas com timócitos**



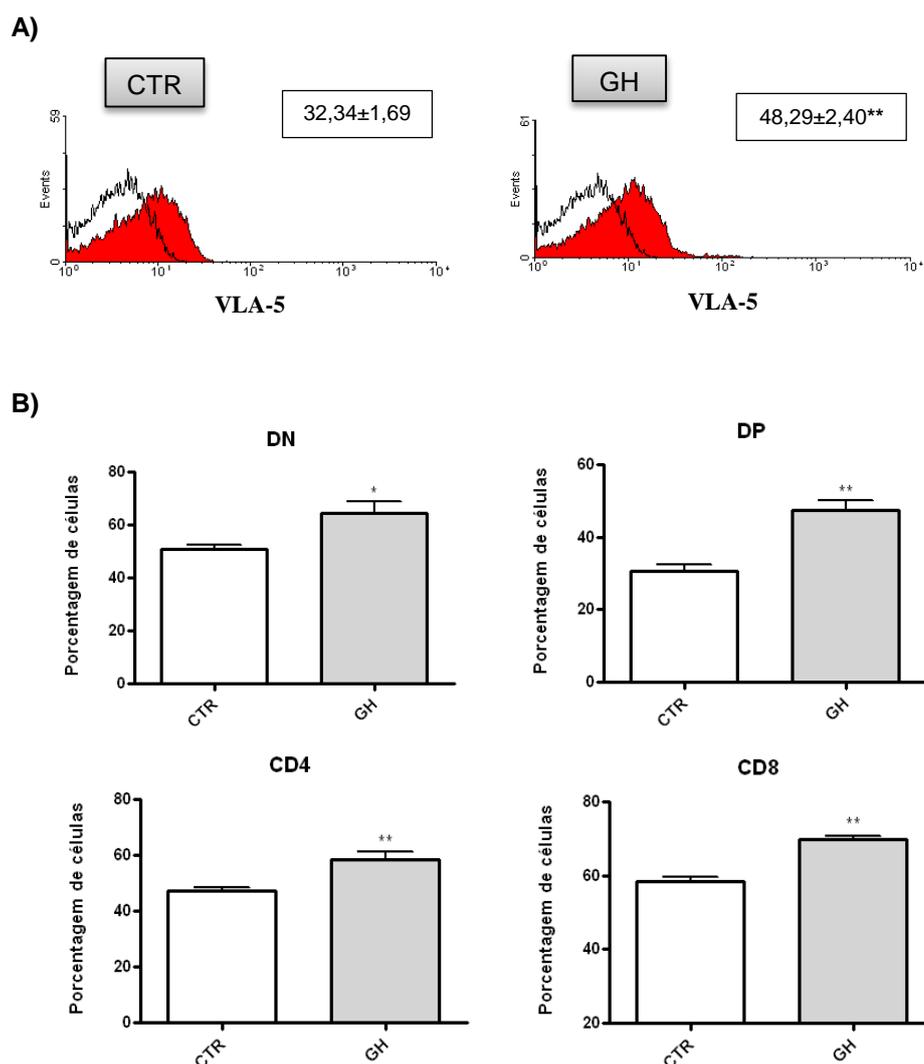
A) Fotomicrografias demonstram a deposição de laminina por tEnd.1 (em verde) após 24 horas de cocultivo com timócitos. Em azul estão marcados os núcleos das células (DAPI). Aumento: 400x

B) Gráficos mostram a quantificação em pixels da intensidade de fluorescência da deposição de laminina através do ImageJ. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes, com  $n=12$ . A análise estatística foi feita com ANOVA, pós-teste de Turkey, sendo  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  em relação ao grupo tEnd.1.

### 5.3 O hormônio do crescimento modula a expressão de VLA-5 e VLA-6 em timócitos murinos

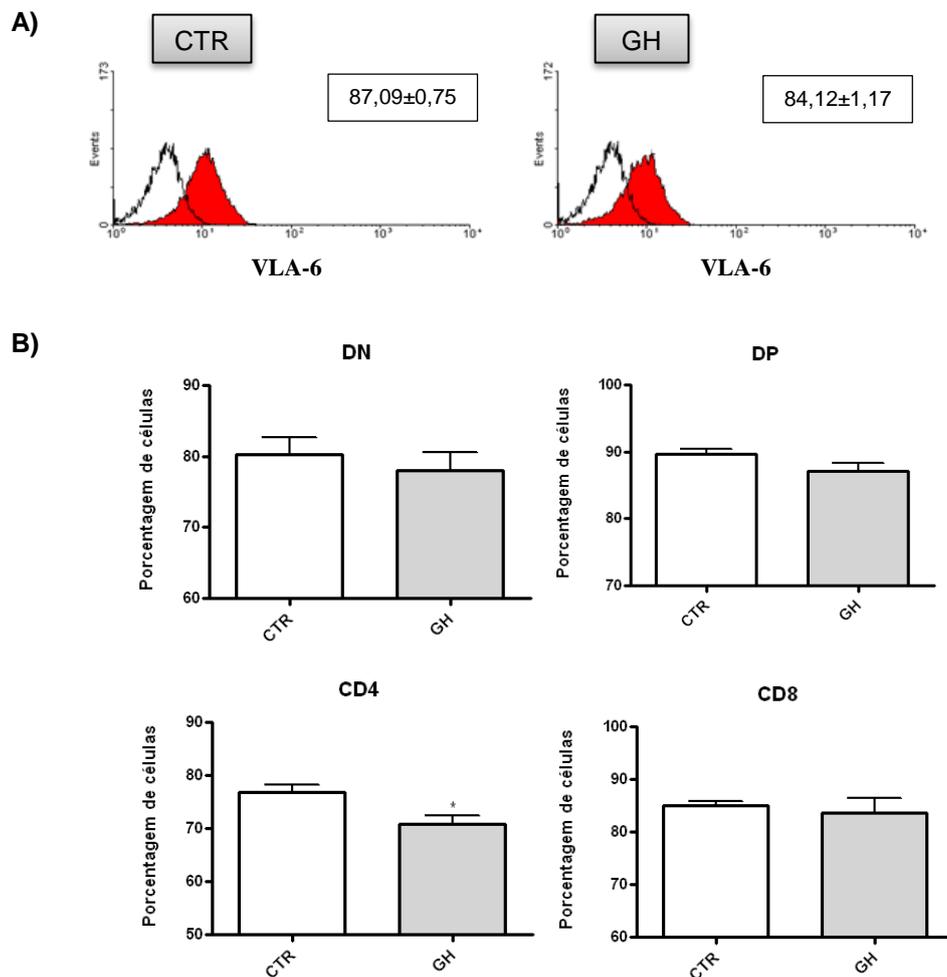
Após verificar modulações nos eventos de adesão e deposição de moléculas de matriz extracelular, foi investigada a expressão das integrinas VLA-5 (cadeia alfa da integrina  $\alpha 5\beta 1$ ) e VLA-6 (cadeia alfa da integrina  $\alpha 6\beta 1$ ), receptores de fibronectina e laminina, respectivamente, na superfície dos timócitos após tratamento com GH durante 1 hora. Como resultado, observou-se que o GH foi capaz de aumentar a expressão de VLA-5 pelos timócitos totais e nas suas subpopulações, conforme indica a figura 12. Quanto à integrina VLA-6, sua expressão manteve-se idêntica nos grupos GH e controle, com exceção para a subpopulação  $CD4^+$ , que exibiu uma diminuição na expressão desta molécula (figura 13).

**Figura 12. Ação do GH sobre a expressão de VLA-5 por timócitos totais e suas subpopulações.**



Timócitos foram tratados com GH (100 ng/mL) e analisados por citometria de fluxo. A) Histogramas com o número percentual médio de células que expressaram a integrina VLA-5 (vermelho cheio) e do controle Ig (branco vazado) na população total de timócitos de um experimento representativo. B) Os gráficos mostram o percentual de expressão da integrina VLA-5 nas subpopulações de timócitos. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5 por grupo). A análise estatística foi realizada com o teste t de Student, sendo \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

**Figura 13. Ação do GH sobre a expressão de VLA-6 por timócitos totais e suas subpopulações.**



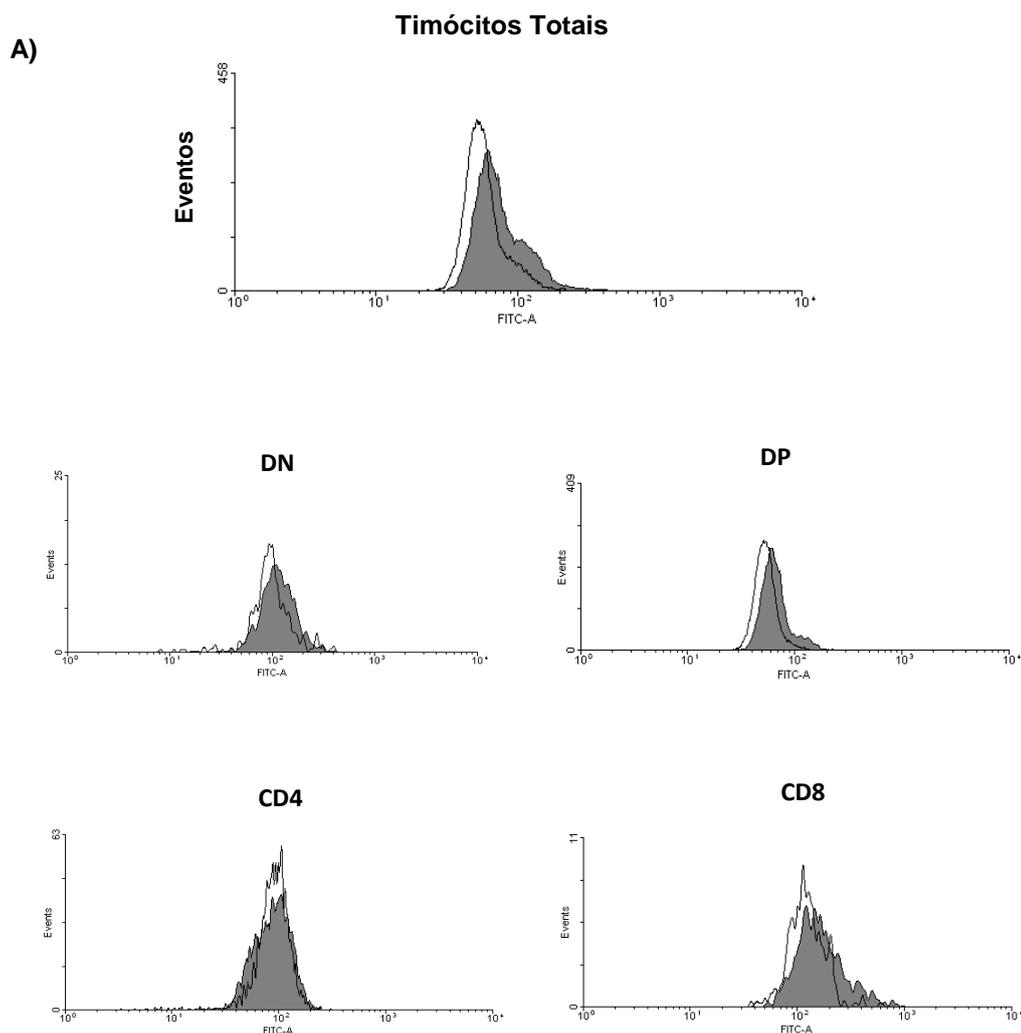
Timócitos foram tratados com GH (100 ng/mL) e analisados por citometria de fluxo. A) Histogramas com o número percentual médio de células que expressaram a integrina VLA-6 (vermelho cheio) e do controle Ig (branco vazado) na população total de timócitos de um experimento representativo. B) Os gráficos mostram o percentual de expressão da integrina VLA-6 nas subpopulações de timócitos. Os valores estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5 por grupo). Análise estatística realizada pelo teste t de Student, sendo \*p<0,05.

#### 5.4 Citoesqueleto de timócitos é reorganizado após tratamento com GH

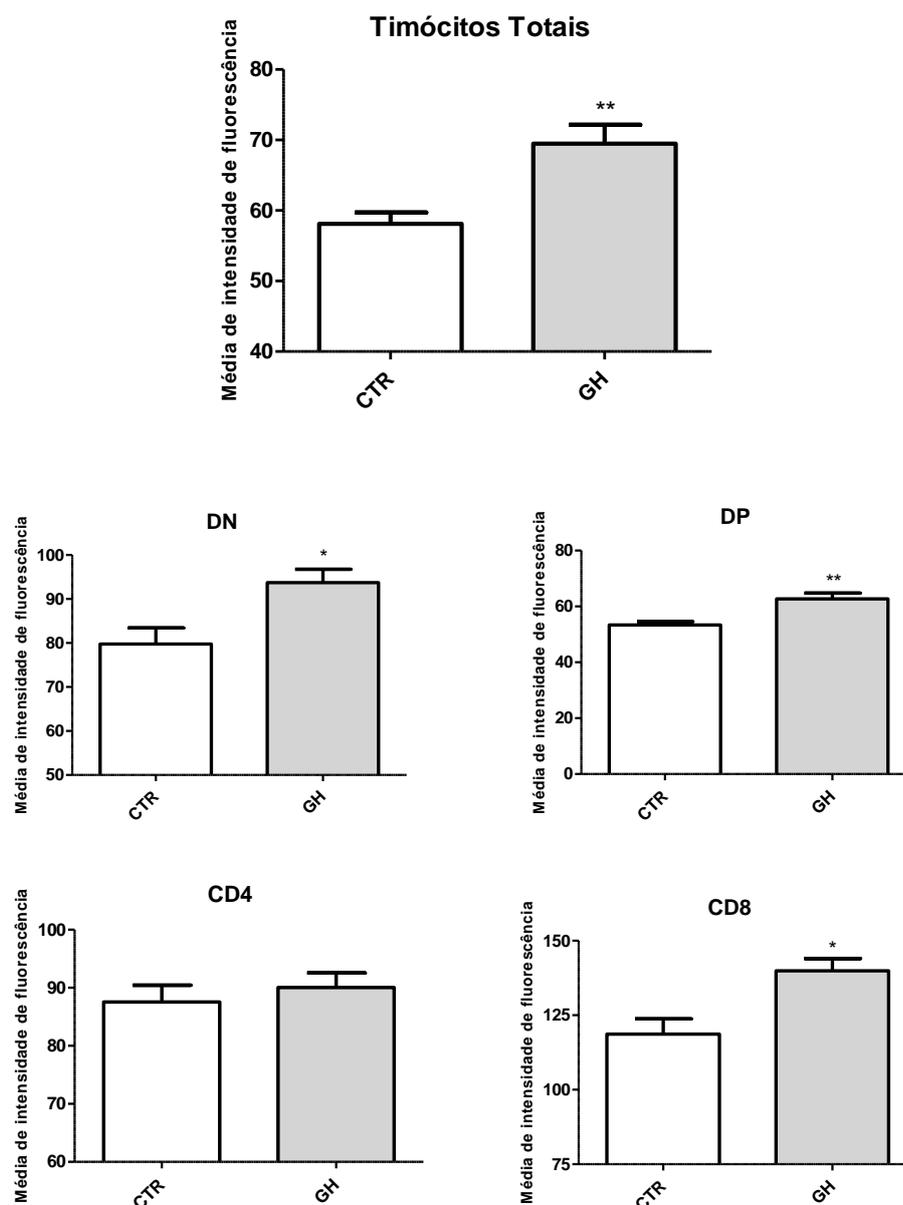
Tendo em vista os resultados supracitados, objetivou-se investigar se o GH está envolvido na polimerização do citoesqueleto de F-actina em timócitos *in vitro*. Para isto, os timócitos foram tratados com GH por 30 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>, e então, marcados com faloidina-FITC, analisados por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência.

Através da citometria, observou-se que a intensidade média de fluorescência dos timócitos tratados com GH e marcados com faloidina aumentou quando comparada à intensidade de fluorescência dos timócitos controle. Esse fenômeno foi observado nos timócitos totais e nas subpopulações, com exceção da subpopulação CD4<sup>+</sup> simples-positivo (figura 14).

**Figura 14. Quantificação da intensidade de fluorescência da marcação de F-actina em timócitos**



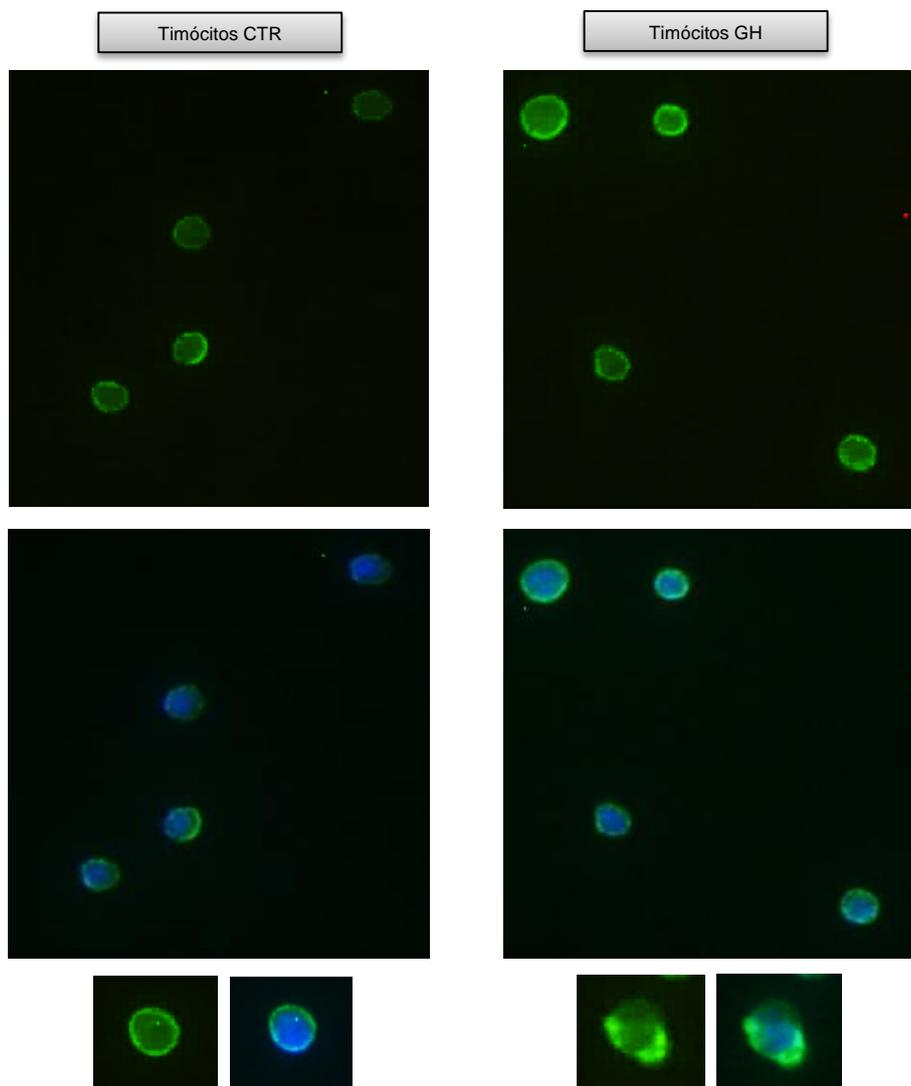
B)



A) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência obtida da marcação de F-actina com faloidina em timócitos frescos tratados *in vitro* durante 30 minutos com GH (100 ng/mL). Curva citofluorimétrica em branco representa o grupo controle e a curva em cinza representa o grupo GH. B) Gráficos demonstram a quantificação da intensidade média de fluorescência, as colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média.  $n=5$ . A análise estatística foi feita com o teste t de Student, sendo \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ .

Após verificar um aumento na expressão de F-actina por citometria de fluxo nos timócitos tratados com GH, foi também realizada uma avaliação por microscopia de fluorescência. Fotomicrografias foram utilizadas para se analisar o rearranjo desse citoesqueleto nos timócitos, conforme se demonstra na figura 15.

**Figura 15. Organização do citoesqueleto de F-actina em timócitos**



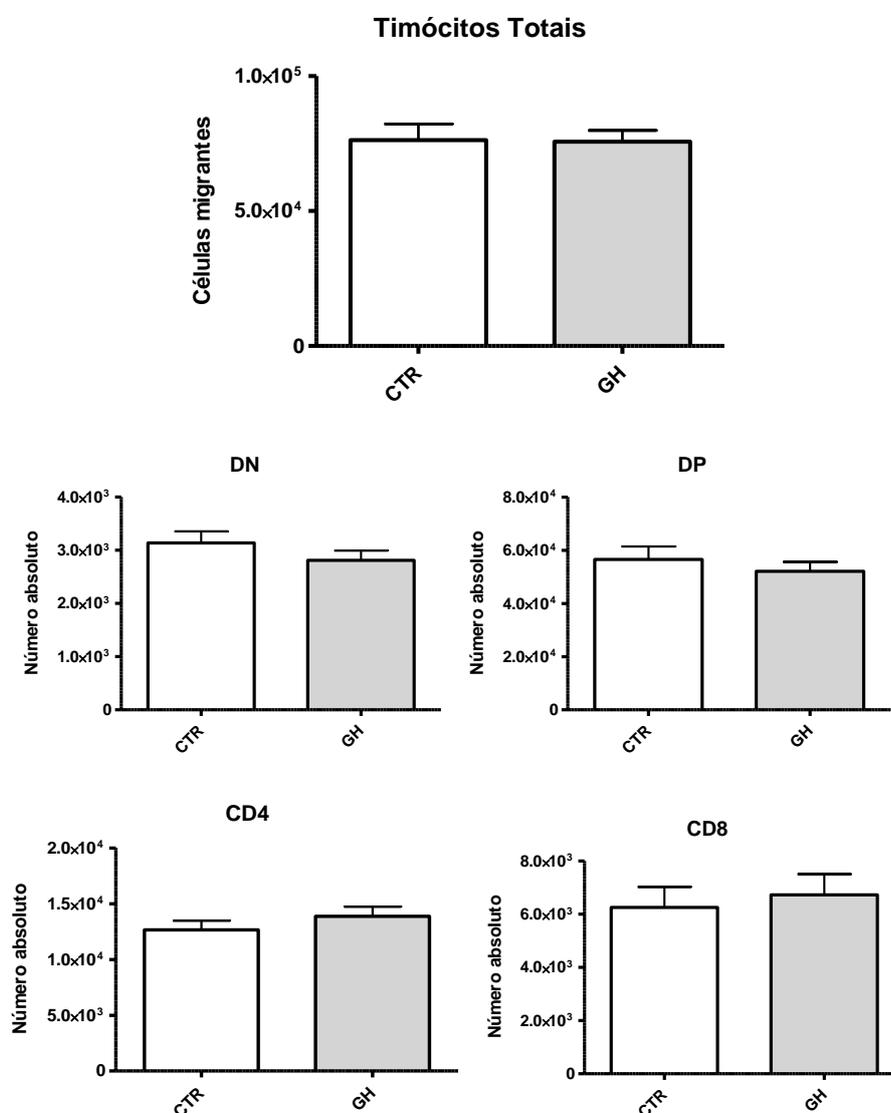
Fotomicrografias mostram timócitos marcados com faloidina e DAPI após 30 minutos de tratamento com GH (100 ng/mL). É possível observar um aumento na intensidade de fluorescência, indicando a polimerização de F-actina. Os insertos abaixo mostram células individuais e sua organização característica do citoesqueleto de actina. Aumento: 400x.

Através das fotomicrografias, constatou-se que as células tratadas exibiram uma maior quantidade de F-actina, indicada pelo aumento na intensidade de fluorescência. Além disso, foram observadas células com a morfologia polarizada, o que pode ser observado nos timócitos individualizados na figura 15. Nos insertos, observam-se o ponto de ancoramento (*leading edge*) e o uropódio, que são estruturas típicas de células leucocitárias em migração.

## 5.5 Timócitos tratados com GH migram em maiores números na presença de IGF-1 como quimioatraente

Os resultados até agora descritos demonstram que os timócitos tratados com GH exibem alterações que favorecem a migração celular. Assim sendo, o último objetivo foi verificar o efeito do GH sobre a migração transendotelial. Como demonstrado na figura 16, o tratamento com GH não foi capaz de alterar o número total de timócitos migrantes e nem as subpopulações destas células quando comparado ao grupo controle.

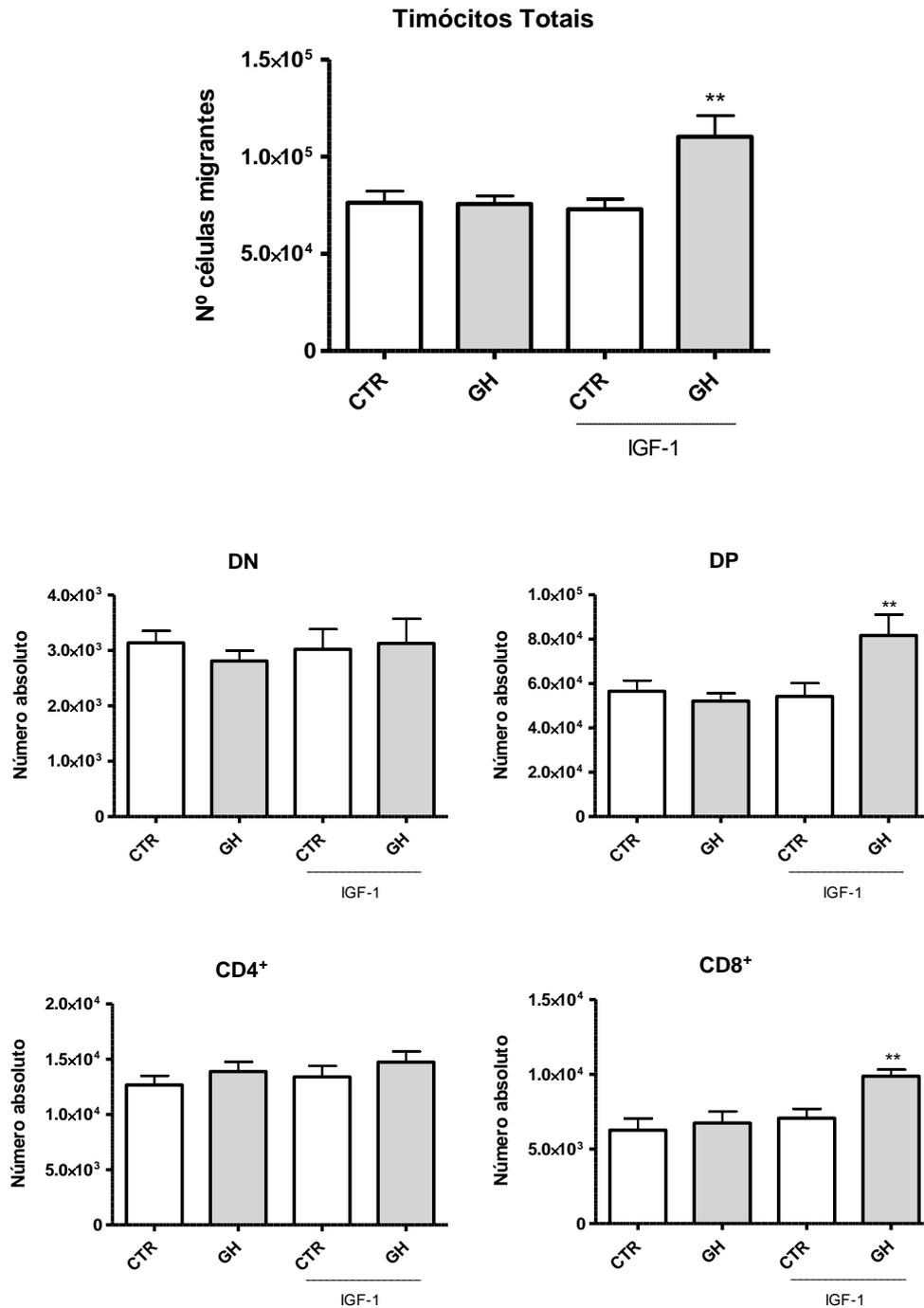
Figura 16. Número de timócitos que migraram através de endotélio tímico.



Timócitos pré-tratados ou não com GH foram submetidos à transmigração por 18 horas e então recuperados para contagem e fenotipagem CD4/CD8. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média. n=6.

Subsequentemente, esse modelo de transmigração foi utilizado, aplicando-se o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) como fator quimioatraente na câmara inferior. E desta forma, constatou-se que os timócitos, quando pré-tratados com GH, migram em maiores números frente ao IGF-1, e este aumento foi observado nas subpopulações duplo-positivo e CD8<sup>+</sup> simples-positivo (figura 17), quando comparados ao grupo controle.

Figura 17. Timócitos tratados com GH migram em maiores números na presença de IGF-1 como quimioatraente



Timócitos pré-tratados ou não com GH foram submetidos à transmigração na presença de IGF-1 como fator quimiotático na câmara inferior e então recuperados para contagem e fenotipagem CD4/CD8. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média, com n=6. A análise estatística foi feita com o teste ANOVA, pós-teste Newman-Keuls, sendo \*\* p≤0,01.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o hormônio do crescimento contribui com o processo de transmigração de timócitos, através da modulação positiva de integrinas em sua membrana, reorganização do citoesqueleto de F-actina, e por estimular sua adesão às células endoteliais. Esses dados somados aos já descritos na literatura corroboram nos efeitos do GH sobre a fisiologia tímica, mostrando que esse órgão é alvo de diversos estímulos neuroendócrinos.

O GH é um polipeptídeo secretado majoritariamente pelos somatotrofos da pituitária anterior e, além disso, é produzido em tecidos extra-pituitários, indicando os seus efeitos locais parácrinos e autócrinos. Após a ligação ao seu receptor (GHR), ocorre a fosforilação das moléculas JAK2 associadas ao domínio citoplasmático do receptor, e a translocação de STAT5 para o núcleo, modulando a transcrição de genes-alvo. Esse processo evoca diversas respostas pleiotrópicas a depender do tipo celular (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2013).

Neste estudo mostrou-se que o tratamento com GH induz uma maior adesão de timócitos às células endoteliais *in vitro*. Um aspecto relevante da diferenciação intratímica concerne às interações célula-célula que ocorrem entre timócitos e células estromais tímicas, pois a adesão celular é uma etapa necessária para a migração. Sabe-se que a adesão de timócitos a TECs pode ser aumentada pelo tratamento com os hormônios triiodotironina (T3), prolactina, GH e IGF-1. Além disso, anticorpos anti-GH e anti-IGF-1 são capazes de diminuir a capacidade adesiva dos timócitos (RIBEIRO-CARVALHO et al., 2003, DE MELLO-COELHO et al., 1997).

Ao lado de fatores que modulam positivamente a adesão de timócitos, estão as moléculas que inibem esta interação com as células do microambiente tímico. Pode-se citar a galectina-3, uma lectina produzida pelas células estromais tímicas, que se acumula na membrana destas células ou está associada com a MEC tímica. Foi visto, *in vitro*, que a galectina-3 diminui as interações TEC/timócito, atuando como uma molécula de de-adesão (VILLA-VERDE et al., 2002). Da mesma maneira, a semaforina-3A, uma molécula estritamente relacionada com o sistema nervoso, inibe a adesão de timócitos humanos de maneira dose-dependente (LEPELLETIER, et al., 2007). Então, a associação de diversos estímulos pró e anti-adesivos promovem a movimentação dos timócitos através do órgão, e o GH participa ativamente dessa modulação durante a adesão dos timócitos.

Apesar de as interações heterocelulares envolverem a ligação de receptores e contra-receptores na superfície das células, deve-se frisar o importante papel desempenhado pelas moléculas da MEC nos eventos de adesão e migração. Nesse contexto, a MEC tímica interage com os timócitos dirigindo seu tráfego durante a diferenciação. Dentre todas as moléculas de MEC produzidas pelo estroma tímico, as mais estudadas são a fibronectina e a laminina, que também estão presentes na composição da membrana basal dos vasos sanguíneos (GAMEIRO et al., 2010).

Após verificar que o GH promove a adesão de timócitos, o próximo passo foi analisar a deposição de MEC durante a adesão dos timócitos ao endotélio tímico, por meio do ensaio de imunocitoquímica. No tocante à fibronectina, observou-se que o contato dos timócitos previamente tratados com GH sobre a monocultura de células endoteliais estimulou estas células a secretarem mais fibronectina. Resultados previamente obtidos pelo nosso grupo demonstraram que células endoteliais tímicas tratadas com GH aumentam a deposição de moléculas de MEC (RAMOS, 2008). Além disso, foi constatado por Smaniotto e colaboradores (2005) que o timo de camundongos transgênicos para o GH (animais que apresentam altos níveis de GH no plasma sanguíneo) apresenta uma maior deposição de fibronectina. E, na presença desta molécula, há um aumento da adesão de timócitos às TECs (DE MELLO-COELHO et al., 1997).

Os nossos resultados demonstram que o aumento na deposição de fibronectina pelas tEnd.1 é decorrente do contato com timócitos tratados com GH. É interessante ressaltar que esse achado mostra que o GH age de maneira indireta na célula endotelial, modulando positivamente a síntese de MEC através da interação timócitos/endotélio. A fibronectina, uma glicoproteína adesiva da MEC, é essencial para a morfogênese e homeostase dos vasos sanguíneos. Ela está presente na membrana basal do endotélio, juntamente com outras moléculas de MEC e, embora seus níveis ao redor de vasos quiescentes sejam reduzidos, há uma marcante deposição em vasos ativos (ASTROF & HYNES, 2009). Dessa forma, a adesão aumentada dos timócitos tratados pode ser devida ao aumento de fibronectina sobre o endotélio, favorecendo sua posterior migração.

Quanto à deposição de laminina, foi visto que a adesão dos timócitos foi um estímulo para a célula endotelial aumentar a síntese dessa glicoproteína. Esse fato mostrou que o contato timócito/tEnd.1 gerou um efeito capaz de modular o

comportamento da célula endotelial. A comunicação intercelular acontece entre diversas células no organismo. Por exemplo, a adesão de neutrófilos ao endotélio microvascular tem um efeito direto na permeabilidade endotelial durante a inflamação, isto permite que fatores derivados do neutrófilo ajam de maneira mais eficiente sobre o endotélio. E também, a ligação de moléculas de adesão do neutrófilo (principalmente integrinas  $\beta 2$ ) aos seus receptores na superfície endotelial gera sinais intracelulares, resultando no aumento de cálcio citosólico, produção de ROS e reorganização do citoesqueleto (YUAN et al., 2012). Assim, nossa hipótese é que o timócito interage por meio de receptores e contra-receptores com a célula endotelial, estimulando-a a depositar mais laminina em sua membrana.

Esse aumento na quantidade de MEC sobre o endotélio também é importante para a ligação e apresentação de fatores solúveis, como quimiocinas, aos leucócitos em transmigração. No entanto, células T podem alternativamente migrar através de endotélio por um processo independente de quimiocinas, via MHC/TCR (MANES & POBER, 2013). Outra importância do aumento de MEC é a sinalização intracelular para o citoesqueleto, através dos principais receptores de MEC, as integrinas. E esses eventos são necessários tanto para capacitar o timócito a migrar, quanto para permeabilizar a barreira endotelial.

Após constatar as modulações na deposição das moléculas de matriz, fibronectina e laminina, pelas células endoteliais, mostrou-se relevante a investigação dos seus respectivos receptores (VLA-5 e VLA-6) na superfície dos timócitos, após o tratamento com GH. Como resultado, a porcentagem de timócitos VLA-5<sup>+</sup> aumentou no total e em todas as subpopulações celulares. No entanto, o percentual de timócitos VLA-6<sup>+</sup> não foi alterado, com exceção da subpopulação CD4<sup>+</sup>, que diminuiu o percentual de células que expressam essa integrina. Vielkind e colaboradores (2005) conceituam que integrinas têm baixa atividade em células em repouso, mas podem ser estimuladas para mediar a adesão em resposta a quimiocinas e citocinas. Esses estímulos induzem um processo de sinalização “*inside-out*” que é tipicamente associado ao aumento da avidéz da integrina pelo seu ligante (como resultado de um agrupamento dos receptores e de sua maior mobilidade lateral) e do aumento de sua afinidade por eles.

A exposição dos timócitos ao GH causou mudanças na expressão dos receptores integrinas supracitados, ora modulou positiva ou negativamente, ora não

alterou a expressão. No entanto, como referenciado acima, não basta apenas verificar o número de receptores na superfície celular, mas também é necessário analisar o estado de ativação e avidéz em que estas moléculas se encontram, visto que células com alta expressão de receptores podem tê-los em estado de repouso, enquanto que menores quantidades de receptores na membrana, se ativados, podem gerar respostas celulares efetivas.

Smaniotto e colaboradores (2005) notificaram que camundongos tratados com GH intratímico ( $10^{-5}$  M) ou transgênicos para o GH mostram uma grande deposição de laminina no timo e seus timócitos são mais aptos a migrar, *in vitro*, do que aqueles obtidos de animais-controle. No entanto, a expressão de VLA-6 nos timócitos desses animais não muda significativamente, indicando um aumento nos níveis de ativação dessa integrina sem o aumento na expressão do gene correspondente. Semelhantemente, Nagib e colaboradores (2010) discutem que timócitos provenientes de camundongos diabéticos expressam níveis mais baixos de VLA-5 e VLA-6, porém este fato não altera a capacidade migratória *in vitro* dessas células, nem reduz seus números nos órgãos linfoides periféricos, indicando que apenas a menor expressão de integrinas na superfície celular não é suficiente para prejudicar a migração dos timócitos.

Aos resultados apresentados até aqui, cabe sugerir que a adesão aumentada dos timócitos às células endoteliais pode devida ao incremento na deposição de fibronectina, bem como pela maior expressão de VLA-5. Experimentos futuros com bloqueadores específicos para VLA-5 serão realizados para avaliar tal hipótese. A ligação entre integrinas e MEC durante a adesão celular capacita a célula para exercer forças de tração sobre o substrato, resultando na movimentação do corpo celular. No citosol, proteínas acessórias como talina e vinculina constituem a ponte entre a MEC/integrina e o citoesqueleto de actina (HIRATA et al., 2014). Tendo em vista que o GH aumentou a expressão de VLA-5, foi do nosso interesse verificar se este hormônio promove a polimerização de F-actina nos timócitos.

Após 30 minutos de exposição ao GH, os timócitos exibiram uma maior quantidade de F-actina em seu citoplasma, conforme demonstrado pelo aumento da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência. Pela microscopia também foi possível constatar que os timócitos têm uma distribuição cortical de F-actina, e o tratamento induziu a formação de um “anel

de actina” mais evidenciado na periferia da célula. Além disso, algumas células mostraram uma morfologia polarizada, com o *leading edge* (polo anterior) e o uropódio (polo posterior).

Sobre o tempo de tratamento diferenciado nesse experimento em relação aos demais, justifica-se pelo fato de os anéis de F-actina se formarem a partir de 5 minutos após ao estímulo e estarem presentes durante 30 minutos em células T, por isso foi escolhido este tempo para se analisar o citoesqueleto de timócitos. Em células T alongadas, os filamentos de actina sempre estão alinhados com o eixo longitudinal da célula, capacitando-a para migrar direcionalmente em resposta a um estímulo ou substrato (WONG et al., 2008). O posicionamento de integrinas de alta e baixa afinidades, formando *clusters* nos polos da membrana, juntamente com as selectinas, permitem à célula formar contatos adesivos no *leading edge*, aderir firmemente o corpo celular para exercer tração sobre o substrato e desaderir o uropódio. Tudo isso contribui na biologia normal da célula T e na sua recirculação pelo organismo (XU et al., 2014).

Os resultados obtidos mostraram que o GH é capaz de polimerizar o citoesqueleto de actina em timócitos. Esse fato indica que este hormônio induz alterações na forma celular, promovendo, de maneira mais eficaz, interações célula-célula e a migração dos timócitos através do microambiente tímico. Nossa hipótese é que o GH favoreça a sinapse imunológica entre os timócitos e células do estroma tímico, para a recepção de sinais durante a diferenciação. Sabe-se que timócitos usam ativamente seu citoesqueleto para mover-se dentro de TNCs e fazem contatos com seu citoplasma, interagindo com moléculas do MHC. Dentro desses complexos celulares, os timócitos evidenciam os filamentos de F-actina e podem, inclusive, interagir com macrófagos por meio do seu *leading edge* (PHEE et al., 2014; WEBB et al., 2004).

Deve-se destacar também o papel das proteínas acessórias ao citoesqueleto durante o processo de migração. Por exemplo, a L-plastina, proteína ligadora de actina, é regulada positivamente durante a seleção positiva dos timócitos e muito expressa em células T maduras. Essa proteína é requerida para induzir a motilidade de timócitos SP via CCR7 e S1P<sub>1</sub>, sendo que timócitos nocaute para L-plastina falham em deixar o timo normalmente e exibem uma quimiotaxia diminuída *in vitro*. Outra importante molécula é a quinase Mst1, que atua como um sinal chave para a

polarização da célula T, via miosina IIa, e ativação de integrinas, posicionando-as nos polos da membrana. Em timócitos deficientes para Mst1 são observados um prejuízo na migração celular em resposta à CCL21, bem como a ocorrência de apoptose excessiva e linfopenia no organismo (MORLEY et al., 2010; MOU et al., 2012). Com esses dados, ressalta-se a necessidade de se continuar os estudos sobre o mecanismo molecular pelo qual o GH promove a reorganização do citoesqueleto de actina em timócitos.

O último grupo de resultados foi concernente à transmigração de timócitos *in vitro*, após o tratamento com GH, em modelo de transwell. Para mimetizar a entrada ou saída de timócitos no microambiente tímico, utilizou-se uma monocamada de células endoteliais tímicas, através das quais os timócitos foram desafiados a transmigrar por 18 horas. Como resultado, observou-se que na ausência de fatores quimioatraentes, o GH não foi capaz de alterar o número de células migrantes. A migração celular é um processo complexo, que envolve diversos parâmetros. Há variações na expressão de genes relacionados com os eventos migratórios, alterações na afinidade de integrinas, reorganização do citoesqueleto e polarização celular (GAMEIRO et al., 2010). Os resultados até aqui apontam que o GH modulou esses parâmetros positivamente, capacitando o timócito a migrar, no entanto não foi observado esse efeito.

Estudos prévios demonstraram que o GH atua na migração de monócitos humanos *in vitro*, de maneira quimiotática (quando o GH é adicionado na câmara inferior do well) e quimocinética (presente na câmara superior) (WIEDERMANN et al., 1993). Semelhantemente, em células T humanas, ativadas ou não com anti-CD3, o GH se mostrou um estimulador (quimiotático e quimocinético) de sua migração *in vitro* (TAUB et al., 1994). Macrófagos murinos da linhagem RAW ou cultura primária, migram em maiores números quando o GH é colocado na câmara inferior do well (SU et al., 2013). Dados do nosso grupo demonstram que timócitos humanos são estimulados a migrar na presença do GH sobre o substrato de laminina, levantando a ideia de que o efeito geral do GH na migração de timócitos resulta da sua interação com a MEC e outros fatores solúveis no timo.

No tocante aos timócitos murinos, Smaniotto e colaboradores, 2011, demonstraram que o tratamento com GH não aumenta o número de timócitos migrantes, mas os torna mais responsivos à presença de quimioatraentes, como a

CXCL12, indicando assim a ação do GH. E o mesmo fato foi atestado por Smaniotto e colaboradores, 2005, mostrando que timócitos provenientes de camundongos transgênicos para GH migram mais eficientemente através câmara *transwell* em resposta a CXCL12. Assim, sabendo-se que o IGF-1 é um importante mediador das ações do GH no organismo, este peptídeo foi utilizado como fator quimioatraente durante a transmigração dos timócitos.

Os resultados mostraram um aumento no número total de timócitos transmigrantes e das subpopulações DP e CD8<sup>+</sup> quando tratados com GH e na presença de IGF-1. Esse achado mostra-se bastante promissor, por confirmar que o GH modula diversos parâmetros referentes à migração e torna os timócitos mais responsivos a estímulos quimiotáticos, ao mesmo tempo em que elenca mais uma ação para o IGF-1, como quimioatraente para timócitos murinos. Também fez-se a observação de que timócitos CD4<sup>+</sup> não responderam à presença do IGF-1, nem ao tratamento com GH durante a migração. Talvez isso esteja justificado pela não-reorganização dos filamentos de F-actina e pela diminuição de VLA-6 nesta subpopulação nos resultados previamente observados.

Em suma, tendo em vista a importante função do timo em produzir continuamente novos linfócitos T para manter a homeostasia do organismo, é razoável apontar que a involução tímica observada em patologias ou pelo envelhecimento deva prejudicar a resposta imune dos indivíduos. Assim, estudos sobre a fisiologia deste órgão são necessários para se entender melhor o seu funcionamento, especialmente o processo de migração de timócitos e os fatores exógenos ao timo que o modulam, como o GH (GAMEIRO et al., 2010).

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que o GH tem efeitos sobre os timócitos, no tocante à sua adesão ao endotélio tímico, bem como a síntese de matriz extracelular pelas células endoteliais durante o contato com timócitos. A integrina VLA-5 é expressa em maiores quantidades na superfície de timócitos tratados pelo GH e o citoesqueleto de actina é reorganizado nestas células, permitindo a polarização e contribuindo para tornar os timócitos mais responsivos ao IGF-1 na transmigração.

Em conjunto, nossos dados demonstram a participação do GH nas interações timócitos/endotélio tímico, em especial à reorganização do citoesqueleto e migração transendotelial de timócitos.

## REFERÊNCIAS

- ASTROF S, HYNES RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. (2009) 12(2):165–175.
- AW D, TAYLOR-BROWN F, COOPER K, PALMER DB. Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice. *Biogerontology* (2009) 10(3):311-322.
- BAHIA L, AGUIAR LGK, VILLELA NR, BOTTINO D, BOUSKELA E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* (2006) 50(2):291-303.
- 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) 15:7–18.
- CASTELLANO G, AFFUSO F, DI CONZA P, FAZIO S. The GH/IGF-1 axis and heart failure. *Current Cardiology Reviews* (2009) 5:203-215.
- CHU Y, SCHMITZ S, CHOUDHURY B, TELFORD W, KAPOOR V, GARFIELD S, HOWE D, GRESS R. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* (2008) 112: 2836-2846.
- DAVID JR, TERHORST C. Organs and cells of the immune system. *Decker Intellectual Properties* (2010).
- 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) 76:39-49.
- DELON I, BROWN NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. (2007) 19(1):43-50.
- DZHAGALOV I, PHEE H. How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell. Mol. Life Sci* (2012) 69:663-682.
- FAUSTO CS, CHAMMAS MC, SAITO OC, GARCIA MRT, JULIANO AG, SIMÕES CA, CERRI GG. Timo: caracterização ultra-sonográfica. *Radiol Bras* (2004) 37(3):207-210.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ L, GUERRA B, DÍAZ-CHICO JC, FLORES-MORALES A. Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2013) 4:66.
- FERONE D, VAN HAGEN M, PIVONELLO R, COLAO A, LAMBERTS SWJ, HOFLAND LJ. Physiological and pathophysiological role of somatostatin receptors in the human thymus. *European Journal of Endocrinology* (2000) 143:S27-S34.

FINK PJ. The biology of recent thymic emigrants. *Annu Rev Immunol.* (2013) 31:31-50.

FRANTZ C, STEWART KM, WEAVER VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* (2010) 123:4195-4200.

FURUKAWA S, WINGENFELD L, MORITA S, TAKAYA A, NAKAGAWA T, SAKAGUCHI I, MATSUDA W, NISHI K. Histochemical and Morphological Characteristics of the Hassall's Corpuscles. The Stress Affects Involution of the Ectopic Intra-Thyroidal and the Normal Position Thymus and Morphological Changes of the Hassall's Corpuscles. *J Forensic Res* (2012) 3(165):1-4.

GAMEIRO J, NAGIB P, VERINAUD L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhesion & Migration* (2010) 4(3):382-390.

GERMAIN RN. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* (2002) 2:309–322.

GRAY DHD, UENO T, CHIDGEY AP, MALIN M, GOLDBERG GL, TAKAHAMA W, BOYD RL. Controlling the thymic microenvironment. *Current Opinion in Immunology* (2005) 17:137–143.

GUIDOS C. Thymus and T-lymphocyte development: what is new in the 21st Century? *Immunol Rev* (2006) 209:5-9.

HIGHAM CE, TRAINER PJ. Growth hormone excess and the development of growth hormone receptor antagonists. *Exp Physiol* (2008) 93.11:1157–1169.

HIRATA H, SOKABE M, LIM CT. Molecular mechanisms underlying the force-dependent regulation of actin-to-ECM linkage at the focal adhesions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* (2014) 126:135-154.

HYNES RO. Cell–matrix adhesion in vascular development. *J Thromb Haemost* (2007) 5: 32–40.

JEKER LT, BARTHLOTT T, KELLER MP, ZUKLYS S, HAURI-HOHL M, DENG C, HOLLANDER GA. Maintenance of a normal thymic microenvironment and T-cell homeostasis require Smad4-mediated signaling in thymic epithelial cells. *Blood* (2008) 112:3688-3695.

JOHNSON-LÉGER CA, 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.

KERMANI, H.; GOFFINET, L.; MOTTET, M.; BODART, G.; MORRHAYE, G.; DARDENNE, O.; RENARD, C.; OVERBERGH, L.; BARON, F.; BEGUIN, Y.; GEENEN, V.; MARTENS, HJ. Expression of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during balb/c thymus ontogeny and effects of growth hormone upon ex vivo T cell differentiation. *Neuroimmunomodulation* (2012) 19:137–147.

LANNES-VIEIRA J, CHAMMAS R, VILLA-VERDE DM, VANNIER-DOS-SANTOS MA, MELLO-COELHO V, DE SOUZA SJ, BRENTANI RR, SAVINO W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA-6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. *Int Immunol* (1993) 5:1421-1430.

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 U S A.* (2007) 104(13):5545-50.

LIMA FA, CARNEIRO-SAMPAIO M. The role of the thymus in the development of the immune system. *Pediatria (São Paulo)* (2007) 29(1):33-42.

LINHARES-LACERDA L, RIBEIRO-ALVES M, NOGUEIRA ACMA, MENDES-DA-CRUZ DA, MAGALHÃES DA, DARDENNE M, PASSOS GA, SAVINO W. RNA interference-mediated knockdown of CD49e ( $\alpha 5$  integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics* (2010) 11(Suppl 5):S2.

MANES TD, POBER JS. T cell receptor-driven transendothelial migration of human effector memory CD4 T cells involves Vav, Rac and Myosin IIA. *J Immunol.* (2013) 190(7):3079–3088.

MARTINS-NETO AA. O papel do hormônio do crescimento na transmigração de tímócitos. *Dissertação de Mestrado* (2009). Universidade Federal de Alagoas.

MAKI RG. Small is beautiful: Insulin-Like Growth Factors and their role in growth, development and cancer. *J Clin Oncol* (2010) 28:4985-4995.

MARTENS H, GEENEN V. Clinical and *ex-vivo* studies on the thymotropic properties of the somatotrope growth hormone (GH)/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis. *Tese de PhD in Biomedical and Pharmaceutical Sciences* (2011) University of Liege Medical School.

MILLER JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* (2002) 185:7-14.

MILLER JF. Immunological function of the thymus. *Lancet* (1961) 2:748-749.

MILLER JF. Revisiting thymus function. *Front Immunol.* (2014) 5:411.

MORALE MC, GALLO F, TIROLO C, TESTA N, CANIGLIA S, MARLETTA N, SPINA-PURRELLO V, AVOLA R, CAUCCI F, TOMASI P, DELITALA G, BARDEN N, MARCHETTI B. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunology and Cell Biology* (2001) 79:400–417.

MORLEY SC, WANG C, LO WL, LIO CW, ZINSELMAYER BH, MILLER MJ, BROWN EJ, ALLEN PM. The actin-bundling protein L-plastin dissociates CCR7 proximal signaling from CCR7-induced motility. *J Immunol.* (2010) 184(7):3628-3368.

MORRHAYE G, KERMANI H, LEGROS J-J, BARON F, BEGUIN Y, MOUTSCHEN M, CHEYNIER R, MARTENS HJ, GEENEN V. Impact of Growth Hormone (GH) Deficiency and GH Replacement upon Thymus Function in Adult Patients. *PLoS ONE* (2009) 4(5): e5668.

MOU F, PRASKOVA M, XIA F, VAN BUREN D, HOCK H, AVRUCH J, ZHOU D. The Mst1 and Mst2 kinases control activation of rho family GTPases and thymic egress of mature thymocytes. *J Exp Med.* (2012) 209(4):741-759.

NAGIB PRA, GAMEIRO J, STIVANIN-SILVA LG, ARRUDA MSP, VILLA-VERDE DMS, SAVINO W, VERINAUD L. Thymic microenvironmental alterations in experimentally induced diabetes. *Immunobiology* (2010) 215:971–979.

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* (2000) 16:1103-1111.

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) 118:1085-1098.

NISHINO M, ASHIKU SK, KOCHER ON, THURER RL, BOISELLE PM, HATABU H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics* (2006) 26:335-48.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic Pathology* (2006) 34:504-514.

PERRINI S, LAVIOLA L, CARREIRA MC, CIGNARELLI A, NATALICCHIO A, GIORGINO F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *Journal of Endocrinology* (2010) 205:201–210

PETRIE HT, ZUNIGA-PFLUCKER JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu.Rev.Immunol.* (2007) 25:649-679.

PHEE H, AU-YEUNG BB, PRYSHCHEP O, O'HAGAN KL, FAIRBAIRN SG, RADU M, KOSOFF R, MOLLENAUER M, CHENG D, CHERNOFF J, WEISS A. Pak2 is required for actin cytoskeleton remodeling, TCR signaling, and normal thymocyte development and maturation. *Elife* (2014) 3:e02270.

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

RETTORI V. Neuroimmune interactions. *Exp Physiol* (2007) 92(5):799-800.

REZZANI R, BONOMINI F, RODELLA LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Elsevier* (2008) 43:73-120.

RIBEIRO-CARVALHO MM, FARIAS-DE-OLIVEIRA DA, VILLA-VERDE DM, SAVINO W. Triiodothyronine modulates extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells. *Neuroimmunomodulation*. (2003) 10(3):142-2.

ROELFSEMA V, CLARK RG. The growth hormone and insulin-like growth factor axis: its manipulation for the benefit of growth disorders in renal failure. *J Am Soc Nephrol*. (2001) 12(6):1297-306.

SARAN N, POMMERENCKE J, WITZLAU K, REGELIN M, KRUEGER A. Extrathymic physiological T lineage progenitor activity is exclusively confined to cells expressing either CD127, CD90, or high levels of CD117. *PLoS ONE* (2012) 7(2):1-8.

SAVINO W, DALMAU SR, COTTA-DE-ALMEIDA V. Role of Extracellular Matrix-Mediated Interactions in Thymocyte Migration. *Developmental Immunology* (2000) 2-4: 279-291.

SAVINO W, AYRES MARTINS S, NEVES-DOS-SANTOS S, SMANIOTTO S, OCAMPO JSP, MENDES-DA-CRUZ DA, TERRA-GRANADO E, KUSMENOK O, VILLA-VERDE DMS. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2003) 36:1015-1025.

SAVINO W, MENDES-DA-CRUZ DA, SMANIOTTO S, SILVA-MONTEIRO E, VILLA-VERDE DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukocyte Biol*. (2004) 75:951-961.

SAVINO W, POSTEL-VINAY MC, SMANIOTTO S, DARDENNE M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* (2002) 55:442-452.

SAVINO W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog* (2006) 2(6):e62.

SAVINO W, DARDENNE M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. *Current Opinion in Pharmacology* (2010) 10:434-442.

SAVINO W, SMANIOTTO S, DE MELLO-COELHO V, DARDENNE M. Is there a role for growth hormone upon intrathymic T-cell migration? *Ann N Y Acad Sci*. (2000) 917:748-754.

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

SMANIOTTO S, MELLO-COELHO V, VILLA-VERDE DMS, PLÉAU JM, POSTEL-VINAY MC, DARDENNE M, SAVINO W. Growth hormone modulates thymocyte

development in vivo through a combined action of laminin and CXCL12. *Endocrinology* (2005) 146:3005-3017.

SMANIOTTO S, MARTINS-NETO AA, DARDENNE M, SAVINO W. Growth hormone is a modulator of lymphocyte migration. *Neuroimmunomodulation* (2011) 18(5):309-13.

SU H-W, LANNING NJ, MORRIS DL, ARGETSINGER LS, LUMENG CN, CARTER-SU C. Phosphorylation of the adaptor protein SH2B1 $\beta$  regulates its ability to enhance growth hormone-dependent macrophage motility. *J Cell Sci.* (2013) 126(8):1733–1743.

SWAT W, MONTGRAIN V, DOGGETT TA, DOUANGPANYA J, PURI K, VERMI W, DIACOVO TG. The essential role of PI3K $\delta$  and PI3K $\gamma$  in thymocyte survival. *Blood* (2006) 107:2415-2422.

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

TAKEOKA Y, CHEN SY, BOYD RL, TSUNEYAMA K, TAGUCHI N, MORITA S, YAGO H, SUEHIRO S, ANSARI AA, SHULTZ LD, GERSHWIN ME. A comparative analysis of the murine thymic microenvironment in normal, autoimmune, and immunodeficiency states. *Dev Immunol.* (1997) 5(2):79-89.

TAUB DD, TSARFATY G, LLOYD AR, DURUM SK, LONGO DL, 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) 94:293–300.

VAN BUUL-OFFERS SC, KOOIJMAN R. The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. *Cell Mol Life Sci.* (1998) 54(10):1083-94.

VIANA IMMUN, ALMEIDA MES, LINS MP, REIS MDS, VIEIRA LFA, SMANIOTTO S. Combined effect of insulin-like growth factor-1 and CC chemokine ligand 2 on angiogenic events in endothelial cells. PLOS ONE – Aceito em março de 2015.

VIELKIND S, GALLAGHER-GAMBARELLI M, GOMEZ M, HINTON HJ, CANTRELL DA. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J Immunol* (2005) 175:350-357.

VILLA-VERDE DM, SILVA-MONTEIRO E, JASIULIONIS MG, FARIAS-DE-OLIVEIRA DA, BRENTANI RR, SAVINO W, CHAMMAS R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol.* (2002) 5:1434-1444.

WEBB O, KELLY F, BENITEZ J, LI J, PARKER M, MARTINEZ M, SAMMS M, BLAKE A, PEZZANO M, GUYDEN JC. The identification of thymic nurse cells in vivo and the role of cytoskeletal proteins in thymocyte internalization. *Cell Immunol.* (2004) 228(2):119-129.

- WELNIAK LA, SUN R, MURPHY WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J. Leukoc. Biol.* (2002) 71:381–387.
- 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.
- WIESNER S, LEGATE KR, FÄSSLER R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci.* (2005) 62(10):1081-99.
- WILLAMS RL, COURTNEIDGE AS, WAGNER EF. Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* (1988) 52:121-131.
- WONG NK, LAI JC, BIRKENHEAD D, SHAW AS, JOHNSON P. CD45 down-regulates Lck-mediated CD44 signaling and modulates actin rearrangement in T cells. *J Immunol.* (2008) 181(10):7033-7043.
- XU X, JAEGER ER, WANG X, LAGLER-FERREZ E, BATALOV S, MATHIS NL, WILTSHIRE T, WALKER JR, COOKE MP, SAUER K, HUANG YH. Mst1 directs Myosin IIa partitioning of low and higher affinity integrins during T cell migration. *PLoS One.* (2014) 9(8):e105561.
- YUAN SY, SHEN Q, RIGOR RR, WU MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* (2012) 83(1): 82–88.
- ZHANG J, SHI F, BADOOR K, DENG Y, MCGAVIN MK, SIMINOVITCH KA. WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99(4):2240-5.
- ZLOTOFF DA, BHANDoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann N Y Acad Sci.* (2011) 1217:122-138.