

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

JENIFFER ESTEVÃO DOS SANTOS

**AÇÃO CONJUNTA DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA
(IGF-1) E DA QUIMIOCINA CXCL12 NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS.**

MACEIÓ - ALAGOAS

2017

JENIFFER ESTEVÃO DOS SANTOS

AÇÃO CONJUNTA DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-1) E DA QUIMIOCINA CXCL12 NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS.

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 a obtenção do grau de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Salete Smaniotto

MACEIÓ - ALAGOAS

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237a Santos, Jeniffer Estevão dos.
Ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos / Jeniffer Estevão dos Santos. – 2017.
72 f. ; il.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 63-72.

1. Linfócitos. 2. Migração. 3. Fator de crescimento semelhante à insulina I. 4. IGF1. 5. Quimiocina CXCL12. I. Título.

CDU: 572.786:576.5



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

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Jeniffer Estevão dos Santos

Ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de junho de 2017.

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Karen Steponavicius Cruz Borbely – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Klaysa Moreira Ramos - (UNCISAL)

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

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu quero agradecer a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Ele foi meu refúgio e minha força para continuar. Sem Ele isto não seria possível. Sou grata à Ele pela sua infinita bondade e por nunca me abandonar. À minha família por acreditarem nos meus sonhos e me deixarem sonhar. Muito obrigada por todo esforço, paciência e amor dedicados a mim. Em especial a minha mãe, pelo seu cuidado, dedicação e amor durante esta etapa da minha vida. Aos meus amigos queridos, Anderson Rafael, Anderson Deygley, Robson, Lizzie, Luana, Aquiles e Anyeila pela amizade, companheirismo, confiança e pelo carinho durante todos esses anos. Em especial, eu quero agradecer as minhas amigas-irmãs Danielle, Cileide e Taise, pela amizade de todas as horas, apoio incondicional, torcida organizada e paciência inesgotável. Vocês são anjos em minha vida, sempre me incentivaram em todos os momentos da minha vida. Minha gratidão e amor serão eternos a vocês. Não posso deixar de agradecer as minhas amigas queridas Day, Emanuelle, Caroline, Suamy e Taciana que mesmo à distância torcem por mim e pelo meu sucesso. Vocês são muito especiais em minha vida. Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, levarei para minha vida profissional todos os ensinamentos e experiências obtidas durante esses anos. À minha orientadora, Salete Smaniotto pela sua dedicação, confiança, carinho e por acreditar em mim. Agradeço por ter sido sempre tão atenciosa e gentil. Todos os ensinamentos que obtive durante estes anos como sua aluna acrescentaram bastante na minha vida e foram cruciais para me guiar no direcionamento da minha vida profissional. À todos do laboratório de Biologia Celular, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Quero agradecer especialmente aos meus grandes amigos, Larissa, Clarice, Marvin e Návylla. Essa caminhada foi muito mais feliz e divertida com vocês ao meu lado. Muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas risadas e principalmente pela amizade de vocês durante todo esse tempo. Vocês foram essenciais para realização deste trabalho. Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a minha formação e que torcem pelo meu sucesso.

RESUMO

O fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e a quimiocina CXCL12 são moléculas produzidas por células do sistema imunológico, e têm sido alvo de estudos que demonstram efeitos quimiotáticos sobre leucócitos. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* a ação conjunta do IGF-1 e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos. Foram utilizados linfócitos obtidos dos linfonodos subcutâneos de camundongos da linhagem C57BL/6. Análise por citometria de fluxo demonstrou que as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como os linfócitos B expressaram os receptores IGF-1R, CXCR4, CD62L, VLA-4 e VLA-5 na superfície celular. O tratamento com IGF-1+CXCL12 aumentou o percentual de linfócitos B que expressam a integrina VLA-5 e o receptor CD62L. Entretanto, tratamento com a CXCL12 diminuiu o percentual de linfócitos B que expressam o VLA-5. No ensaio de adesão, linfócitos co-cultivados com células endoteliais, revelou que o IGF-1 diminuiu o número total de linfócitos aderidos as células endoteliais nas diferentes subpopulações de linfócitos. Porém, não foram observadas alterações na expressão da integrina VLA-4 na superfície dos linfócitos após a adesão. No ensaio de migração em câmaras de *transwell* com IGF-1 e/ou CXCL12 como fatores quimioatraentes e na presença ou ausência de fibronectina (FN), evidenciou que o IGF-1 e a quimiocina CXCL12 isolados ou em combinação com FN aumentou a migração de linfócitos totais e das subpopulações de células T, CD4⁺ e CD8⁺, e linfócitos B. Interessantemente, na presença da quimiocina, ocorreu um aumento na expressão do receptor CD62L nas células migrantes T CD4⁺, T CD8⁺ e nos linfócitos B. Por RT-PCR, verificou-se que a quimiocina CXCL12 atuou como um bloqueador da transcrição gênica do IGF-1R. Estes dados mostram *in vitro* que o IGF-1 e/ou CXCL12 em combinação com a fibronectina aumentam a migração das subpopulações de linfócitos T, CD4⁺ e T CD8⁺, e linfócitos B.

Palavras-chave: Migração, Linfócitos, Fator-1 de crescimento semelhante à insulina, IGF-1, Quimiocina CXCL12.

ABSTRACT

Insulin-like growth factor-1 and CXCL12 chemokine are produced by immune cells and several studies have been published about their effects on leukocytes. Aim of this study was evaluate combined effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and CXCL12 chemokine on lymphocyte migration *in vitro*. Fresh lymphocytes were obtained from subcutaneous lymph nodes of C57BL/6 mice, and their subsets (B cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells) expressed diverse membrane receptors, as IGF-1R, CXCR4, CD62L, VLA-4 and VLA-5. IGF-1+CXCL12 treatment increased VLA-5⁺ and CD62L⁺ B cells. However, CXCL12 treatment decreased VLA-5⁺ B cells. Furthermore, in cell adhesion assay, IGF-1 promoted a decline in the number of lymphocytes (all subsets) adhered to endothelial cells, although VLA-4 expression was unaltered. In cell migration assay, IGF-1 and CXCL12, separately or jointly, improved rates of migrating lymphocytes (all subsets), applying fibronectin coating or not. Interestingly, in CXCL12 group, CD62L receptor was augmented on migrating cells and this chemokine blocked IGF-1R transcription. This results indicate that IGF-1 and/or CXCL12, combined to fibronectin, enhance B and T cell migration *in vitro*.

Key-words: Cell migration, Lymphocyte, Insulin-like growth factor-1, IGF-1, Chemokine CXCL12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um linfonodo	20
Figura 2- Esquema ilustrando a motilidade de linfócitos T em uma rede de células reticulares fibroblásticas	21
Figura 3- Representação da transmigração de linfócitos T em HEVs de linfonodos	23
Figura 4- Via de sinalização induzida por CXCL12	26
Figura 5- Representação esquemática da matriz extracelular.....	27
Figura 6- Representação esquemática da fibronectina.....	29
Figura 7- Representação esquemática do IGF-1R	31
Figura 8- Densitplot representativo das populações de linfócitos	34
Figura 9- Histograma representativo	34
Figura 10- Populações de linfócitos em linfonodos	40
Figura 11- Expressão do IGF-1R em linfócitos	41
Figura 12- Expressão de receptores de superfície celular envolvidos em adesão e migração nas populações de linfócitos de linfonodos	42
Figura 13- Efeito do IGF-1 e/ou CXCL12 na expressão de receptores de superfície celular de linfócitos	43
Figura 14- Padronização da co-cultura linfócitos/ tEnd.1 <i>in vitro</i>	46
Figura 15- Efeito do IGF-1 na adesão linfócitos/ células endoteliais	47
Figura 16- Efeito quimiotático do IGF-1 e/ou CXCL12 na migração de linfócitos periféricos	50
Figura 17- Expressão de CD62L na superfície de linfócitos após migração.....	52
Figura 18- Expressão gênica do IGF-1R em linfócitos.....	53
Figura 19- Representação esquemática dos resultados.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências dos primers utilizados na RT-PCR.....	38
Tabela 2- Expressão do VLA-4 pelas subpopulações de linfócitos após os ensaios de adesão.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – Aloficocianina (*Allophycocyanin*)
- BSA** – Albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- CCL19** – CC-quimiocina ligante 19 (*C-C motif chemokine 19*)
- CCL21** – CC-quimiocina ligante 21 (*C-C motif chemokine 21*)
- CCR7** – CC-receptor de quimiocina 7 (*C-C chemokine receptor*)
- CD** – Grupo de diferenciação (cluster of differentiation)
- CXCL12** – CXC-quimiocina ligante 12 (*C-X-C motif chemokine 12*)
- DP** – Desvio padrão (*Standard deviation*)
- FITC** – Isocianato de fluoresceína (*Fluorescein isocyanate*)
- FRC** – Célula reticular fibroblástica (*Fibroblastic reticular cells*)
- GH** – Hormônio do crescimento (*Growth hormone*)
- HEV** – Vênula de endotélio alto (*High endothelial venule*)
- IGFs** – Fatores de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factors*)
- IGF-1** – Fator-1 de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor-1*)
- IGF-1R** – Receptor do IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1 receptor*)
- IGFBP** – Proteínas ligadoras de IGF (*IGF binding proteins*)
- LFA-1** – Antígeno-1 funcional de leucócitos (*Leukocyte function-associated antigen 1*)
- MEC** – Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)
- NOD** - Diabéticos não-obesos (*Non-obese diabetic*)
- PBS** – Solução tampão fosfato (*Phosphate-buffered saline*)
- PE** – Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
- PerCP** – Proteína peridina de clorofila (*Pyridin-chlorophyll-a-protein*)
- SBF** – Soro bovino fetal (*Fetal bovine serum*)

SDF-1 – Fator-1 derivado de célula estromal (*Stromal cell-derived fator 1*)

S1P – Esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate*)

tEnd.1 – Linhagem de células endoteliais tímicas 1 (*thymic endothelial cell 1*)

TEC – Célula epitelial tímica (*Thymic epithelial cell*)

VLA – Antígeno de ativação tardio (*Very late activation antigen*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Sistema imunológico	18
3.1.1 Órgãos e células	18
3.2 Linfonodos	19
3.2.1 Estrutura e função	19
3.2.2 Migração de linfócitos T em linfonodos	20
3.2.3 Recirculação de linfócitos	21
3.3 Quimiocinas	24
3.4 Matriz extracelular	27
3.4.1 Matriz extracelular.....	27
3.4.2 Fibronectina	28
3.5 Fator-1 de crescimento semelhante à insulina	30
3.5.1 Fator-1 de crescimento semelhante à insulina e o sistema imunológico.....	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 Animais	33
4.2 Obtenção de linfócitos	33
4.3 Citometria de fluxo	33
4.3.1 Análise da citometria de fluxo	34
4.4 Análise de receptores de superfície celular	35
4.5 Cultura de células endoteliais	35
4.6 Ensaio de adesão linfócitos / células endotelial	35
4.7 Microscopia eletrônica de varredura	36
4.8 Ensaio de quimiotaxia celular	36
4.9 RT-PCR	37
4.10 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Determinação das populações de linfócitos obtidos de linfonodos	

subcutâneos	40
5.2 Verificação da expressão do IGF-1R na superfície de linfócitos periféricos obtidos de linfonodos subcutâneos	40
5.3 Análise da expressão de receptores envolvidos em adesão e migração nas subpopulações de linfócitos	41
5.4 Análise da expressão de receptores de superfície celular envolvidos na adesão e migração de linfócitos após o tratamento com IGF-1 e/ou CXCL12	42
5.5 Análise da adesão linfócitos/ células endoteliais após o tratamento com IGF-1	45
5.6 Análise da expressão da integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) após a adesão linfócitos/células endoteliais.....	47
5.7 Análise do efeito quimiotático do IGF-1 e/ou CXCL12 na migração de linfócitos periféricos	48
5.8 Efeito do IGF-1 e/ou CXCL12 na expressão do receptor CD62L na superfície de linfócitos após a migração	51
5.9 Expressão gênica do IGF-1R em linfócitos após o tratamento com o IGF-1 e/ou CXCL12 na presença ou ausência de fibronectina.....	53
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é composto por órgãos, células especializadas e moléculas solúveis que têm o objetivo de reconhecer os elementos estranhos ao organismo e elaborar uma reação dirigida a esses antígenos, com a finalidade de eliminá-los do organismo e preservar a saúde (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007). Uma das principais células que auxiliam nesse processo de defesa são os linfócitos, uma vez que podem atuar reconhecendo os antígenos estranhos, sintetizando anticorpos, atacando e destruindo patógenos, além de regular a resposta imune, mantendo a tolerância a elementos do próprio organismo (MURPHY et al., 2010).

Os linfócitos estão divididos em duas populações, os linfócitos T e B, que desempenham um papel crucial para a homeostasia do organismo, pois eles são os responsáveis por coordenar e estimular as demais células de defesa, desencadeando uma resposta imunológica eficiente (CAMARA et al., 2012). Durante o seu desenvolvimento, os linfócitos necessitam migrar para áreas distintas do corpo. Este processo de migração contribui para que estas células desempenhem sua função na vigilância imunológica. A recirculação constante de linfócitos nos tecidos linfoides periféricos é um evento crucial para a manutenção de um sistema imunológico eficiente em reconhecer e eliminar patógenos do corpo (ABBAS, 2008).

A migração celular é um evento fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência das células. Várias moléculas estão envolvidas neste processo, dentre elas, as moléculas de adesão, os fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas, além de moléculas de matriz extracelular (MEC). Já foi visto na literatura, que linfócitos obtidos de órgãos linfoides secundários de camundongos transgênicos para o hormônio do crescimento (GH) demonstraram aumento na migração destas células na presença de laminina ou fibronectina, em combinação com a quimiocina CXCL12/SDF-1 α (SMANIOTTO et al., 2010). As quimiocinas são proteínas que atuam principalmente na quimiotaxia de leucócitos, recrutando estas células para locais de infecção. Estudos mostram que a produção de quimiocinas em órgãos linfoides secundários, como os linfonodos, baço, tonsilas e tecidos linfoides associados a mucosa (MALT), tem um papel essencial na manutenção da arquitetura destes órgãos, pois diferentes quimiocinas guiam a localização e o tráfico de células para estes locais (LUSTER, 1998; GRIFFITH et al., 2014).

O fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é um polipeptídeo, produzido por diversas células, mas principalmente pelos hepatócitos, quando estimuladas pelo GH e tem a maioria dos seus efeitos mediados através do receptor IGF-1R, presente em uma grande variedade de tipos celulares (JONES; CLEMMONS, 1995). Estudos mostraram que a sinalização através do sistema IGF tem um importante papel na sobrevivência e prevenção da apoptose celular. A ativação do IGF-1R, é importante durante o desenvolvimento dos diferentes tipos celulares (VINCENT; FELDMAN, 2002). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que IGF-1 em combinação com a quimiocina CCL2 aumentam a adesão e a migração de células endoteliais (VIANA et al., 2015). E ainda, foi observado um efeito quimiotático do IGF-1 sobre as subpopulações de linfócitos periféricos quando pré-tratadas com o GH por 24 horas, e posteriormente, submetidos a um ensaio de migração em *transwell* (Dados não publicados).

O conhecimento das interações moleculares e dos diferentes fatores que estão envolvidos na migração celular é bastante relevante para aplicação médica. Diante disso, neste estudo, buscamos avaliar *in vitro* a participação do IGF-1 e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos periféricos ampliando assim, o conhecimento das ações destas moléculas na resposta biológica das células do sistema imune.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* os efeitos da ação conjunta do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos provenientes de linfonodos subcutâneos de camundongos.

2.2 Específicos:

- a) Determinar as populações de linfócitos obtidos de linfonodos subcutâneos;
- b) Verificar a expressão do IGF-1R na superfície de linfócitos obtidos de linfonodos subcutâneos;
- c) Analisar a expressão de receptores envolvidos em processos de adesão e de migração na superfície dos linfócitos;
- d) Investigar o efeito do IGF-1 na adesão de linfócitos T e B em células endoteliais;
- e) Avaliar o efeito combinado do IGF-1 com a quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos;
- f) Analisar o efeito combinado do IGF-1 com a quimiocina CXCL12 na expressão gênica do IGF-1R em linfócitos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Sistema imunológico

3.1.1 Órgãos e células

O sistema imunológico é composto por órgãos, células e moléculas solúveis, que atuam na proteção do corpo contra patógenos e substâncias nocivas fornecendo constantemente um equilíbrio entre a remoção e neutralização de patógenos, bem como a tolerância para antígenos próprios. Os órgãos linfoides são divididos em órgãos linfoides centrais ou primários, que são a medula óssea e o timo, e órgãos linfoides periféricos ou secundários, que são os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides das mucosas. Estes órgãos são compostos por células estromais, que fornecem um microambiente para que os diferentes tipos de células hematopoiéticas possam se diferenciar e amadurecer. Dentre as células hematopoiéticas que compõem os órgãos linfoides, estão os linfócitos T, os linfócitos B, as células *Natural Killer* (NK), os macrófagos e as células dendríticas, que atuam na elaboração de respostas imunes celulares e humorais, para a manutenção de um sistema imunológico eficiente no combate à antígenos (MURPHY et al., 2010).

Os linfócitos podem ser classificados em dois tipos principais, os linfócitos T e os linfócitos B, atuando na resposta imune adaptativa celular e humoral. Os linfócitos T apresentam duas subpopulações, os linfócitos T CD4⁺, que são responsáveis por coordenar as demais células imunológicas durante uma resposta imune, principalmente pela síntese e liberação de moléculas solúveis, como citocinas e interleucinas. Já os linfócitos T CD8⁺, atuam na citotoxicidade celular contra patógenos. Os linfócitos B ou plasmócitos, auxiliam na defesa do organismo pela síntese e secreção de anticorpos que contribuem para a neutralização de patógenos, facilitando seu reconhecimento pelas diferentes células do sistema imunológico. Além disso, os linfócitos B podem fazer apresentação de antígenos para os linfócitos T, assim como os macrófagos e células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos profissionais. Por fim, as células *Natural killer* (NK) atuam induzindo a apoptose dos patógenos que invadem o organismo (CAMARA et al., 2012).

3.2 Linfonodos

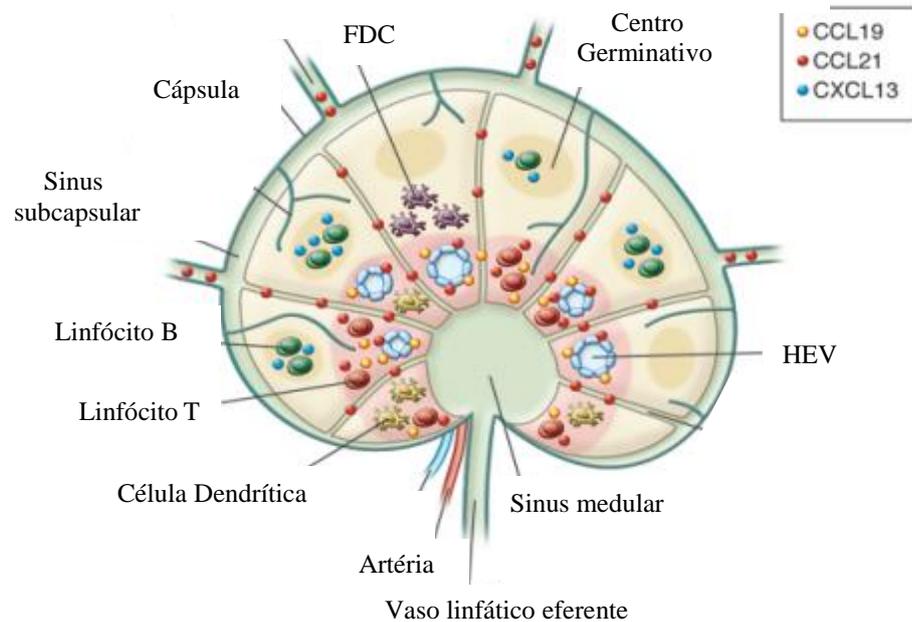
3.2.1 Estrutura e função

Os linfonodos são órgãos linfoides secundários estrategicamente posicionados e altamente organizados para permitir o encontro entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e os linfócitos. A manutenção da estrutura destes órgãos e a sua compartimentalização são essenciais para o desenvolvimento de respostas imunes efetoras (WILLARD-MACK, 2006).

Os linfonodos possuem um lado convexo, onde estão localizados os vasos aferentes, e outro com reentrância, denominado hilo, onde estão os vasos eferentes e pelo qual penetram as artérias encarregadas de nutrir o órgão. O tamanho dos linfonodos varia, apresentando desde 1 mm até 2 cm de comprimento. Estes órgãos estão circundados por uma cápsula de tecido conjuntivo denso a partir da qual septos se estendem para dentro do parênquima. Histologicamente, os linfonodos são subdivididos em três regiões: o córtex, o paracórtex e a medula (WILLARD-MACK, 2006). O córtex é composto por uma área rica em linfócitos B que estão organizados em folículos linfoides. O paracórtex, uma área intermediária, é composto principalmente por linfócitos T e células dendríticas. A medula é constituída por seios linfáticos e cordões medulares com linfócitos B, macrófagos e células plasmáticas secretoras de anticorpos. A distribuição e organização celular nos linfonodos são coordenadas pela presença de quimiocinas, como a CCL21 e CCL19, que são produzidas por células estromais, e que direcionam o tráfego de linfócitos para os diferentes compartimentos celulares deste órgão (Figura 1) (RUDDLE, 2014).

Os linfonodos desempenham um papel crucial no sistema imunológico, pois é o local onde os linfócitos virgens maduros, provenientes da medula óssea e do timo, estão em constante recirculação e podem encontrar antígenos, sendo ativados para gerar respostas imunes efetoras, contribuindo para a manutenção de um sistema imunológico eficiente no combate a patógenos (WILLARD-MACK, 2006).

Figura 1- Representação esquemática de um linfonodo.



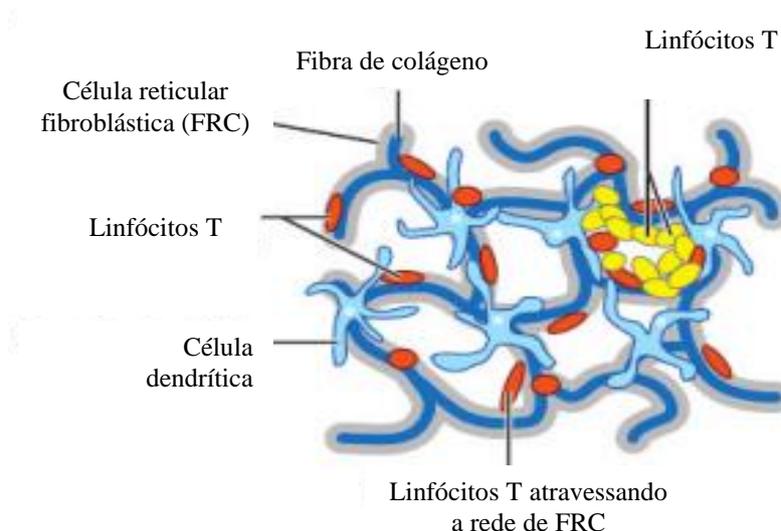
Observa-se a cápsula, as regiões do córtex e medula com seus principais tipos celulares e quimiocinas. FDC: célula dendrítica folicular; HEV: vênula do endotélio alto; CCL19: CC-quimiocina ligante 19; CCL21: CC-quimiocina ligante 21; CXCL13: CXC-quimiocina ligante 13 (Adaptado de RUDDLE, 2014).

3.1.2 Migração de linfócitos T em linfonodos

Os linfócitos T estão continuamente em migração dentro dos órgãos linfoides, principalmente nos linfonodos. Diversos eventos contribuem para o processo migratório, dentre eles a presença de células estromais, que secretam fatores solúveis, como hormônios e quimiocinas que auxiliam o direcionamento da migração celular. Além disso, a presença da matriz extracelular (MEC) formando uma rede de proteínas e polissacarídeos, que fornece um suporte para os tecidos linfoides, permitindo assim, o contato célula-célula e célula-MEC, possibilitando eventos de proliferação, adesão e migração (VAKONAKIS; CAMPBELL, 2007). Receptores de MEC, tais como integrinas, promovem a entrada eficiente de linfócitos T nos linfonodos e fornecem forças de adesão que possibilitam a interação entre os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos. Porém, a sua expressão é regulada de acordo com a necessidade das células (DeNUCCI; MITCHELL; SHIMIZU, 2009). Na região do paracórtex, as células reticulares fibroblásticas (FRC) formam uma rede

juntamente com as células dendríticas e moléculas de MEC fornecendo um arcabouço que possibilita o tráfego de linfócitos (Figura 2) (MUNOZ *et al.*, 2014).

Figura 2. Esquema ilustrando a motilidade de linfócitos T em uma rede de células reticulares fibroblásticas.



Observa-se os linfócitos T (laranja) ao longo e através de uma rede de células reticulares fibroblásticas, na presença de células dendríticas e moléculas de matriz extracelular. Esta estrutura permite o reconhecimento do antígeno apresentado pelas células dendríticas aos linfócitos T. Nota-se o excesso de linfócitos T (amarelo). FRC: célula reticular fibroblástica (Adaptado de CAHALAN; PARKER, 2008).

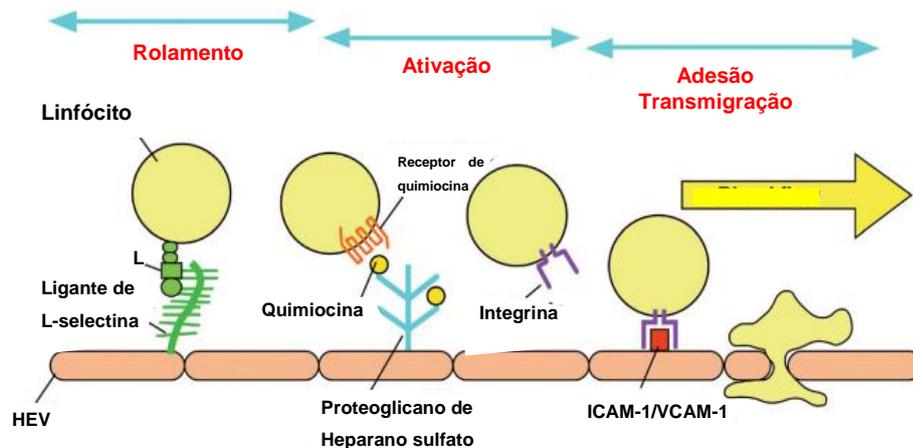
3.1.3 Recirculação de linfócitos

A recirculação dos linfócitos entre o sangue e os tecidos linfoides é um mecanismo homeostático essencial que regula as respostas imunes humoral e celular. Este evento promove o encontro dos linfócitos T e B virgens com seus antígenos, apresentados por células apresentadoras de antígenos, para a manutenção de respostas imunes eficientes (TAKEDA *et al.*, 2017). A apresentação de antígenos ocorre principalmente nos linfonodos, devido aos tipos celulares que residem neste órgão. As células estromais presentes nos linfonodos fornecem estrutura e secretam substâncias que controlam e coordenam o movimento de linfócitos nestes órgãos, permitindo que os linfócitos estejam em constante recirculação na busca de antígenos

(CHANG; TURLEY, 2015). A recirculação de linfócitos entre o sangue e órgãos linfoides é mediada pela ação coordenada de diferentes moléculas e fatores solúveis, como selectinas, integrinas e quimiocinas (KRUGER; MOOREN, 2007).

Constantemente, os linfócitos T virgens presentes no sangue entram nos linfonodos através das vênulas de endotélio alto (HEVs). As HEVs são delgadas e suas células endoteliais apresentam morfologia alta e cubóide, expressam várias moléculas de adesão com diferentes funções que auxiliam a entrada de linfócitos T nos linfonodos. Esta entrada é regulada por moléculas de adesão e quimiocinas, que direcionam os linfócitos T durante uma cascata de eventos, que inicia com o rolamento destes linfócitos sobre o endotélio vascular, através da associação com receptores de adesão, como a L-selectina. Subsequentemente, ocorre a ativação destes linfócitos através da ligação com receptores de quimiocinas, principalmente CCR7/CCL21. A ligação com quimiocinas induz uma adesão firme dos linfócitos ao endotélio, provocando um arrasto destas células na superfície das células endoteliais das HEVs, onde a integrina LFA-1 exerce um papel importante, ligando-se ao receptor ICAM-1 presente na superfície das células endoteliais das HEVs. Finalmente, os linfócitos T transmigram através das células endoteliais e penetram no parênquima do tecido (Figura 3). No parênquima dos linfonodos, estes linfócitos migram para as áreas paracorticais, onde encontram as células dendríticas. Os linfócitos T que encontram seu antígeno específico na superfície de uma célula dendrítica param de migrar. Estes linfócitos proliferam e se diferenciam em linfócitos T efetoras, capazes de deixar os linfonodos e migrar para os sítios de infecção. Entretanto, os linfócitos T que não encontram seu antígeno específico saem dos linfonodos pelos vasos linfáticos eferentes e retornam ao sangue, permitindo sua recirculação (TANAKA *et al.*, 2004; MASOPUST; SCHENKEL, 2013).

Figura 3 - Representação da transmigração de linfócitos T em HEVs de linfonodos.



Os linfócitos iniciam a interação com as vênulas endoteliais altas (HEVs) através da ligação da L-selectina com seu ligante, seguido pela ativação induzida por quimiocinas, adesão e transmigração induzidas por integrinas. Glicanos sulfatados funcionam na primeira e segunda etapa dessas interações adesivas sequenciais (Adaptado de KAWASHIMA, 2006).

O tráfico de linfócitos e a migração através de células endoteliais vasculares nos tecidos linfoides secundários é crítico para a proteção imunológica. O endotélio vascular consiste em uma monocamada contínua de células que reveste todo o sistema vascular. Estas células endoteliais apresentam moléculas de adesão celular, como L-selectinas e caderinas, que formam complexos de junção intercelular. Estes complexos são importantes para controlar a permeabilidade endotelial e criar um local de regulação da adesão e transmigração de células, tais como leucócitos, da corrente sanguínea para os órgãos linfoides secundários ou tecidos subjacentes (GIRARD; SPRINGER, 1995).

A L-selectina (CD62L) é uma importante molécula de adesão expressa pela maioria dos leucócitos e interage com receptores expressos nas vênulas do endotélio alto (HEVs) de órgãos linfoides secundários, em particular os linfonodos. Permitindo a entrada de linfócitos virgens nestes órgãos e auxiliando o extravasamento destas células para locais de inflamação (ZANTE; ROSEN, 2003). LAFOURESSE e colaboradores (2015) demonstraram um aumento na expressão de L-selectina nos linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica, desencadeando um aumento

no tráfico destas células nos linfonodos dos pacientes, ocasionando uma progressão da doença.

3.2 Quimiocinas

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas com peso molecular entre 7-12 kDa que atuam na defesa imunológica dirigindo e controlando a migração, ativação, diferenciação e sobrevivência de leucócitos em nosso corpo. Algumas quimiocinas são constitutivamente secretadas em tecidos linfoides e estão envolvidas no *homing* de leucócitos durante a vigilância imunológica. A grande maioria das quimiocinas, no entanto, são secretadas em resposta a mediadores inflamatórios, fazendo o recrutamento de leucócitos para locais de inflamação (LUSTER, 1998; VIOLA; LUSTER, 2008; KUFAREVA et al., 2015).

As quimiocinas são classificadas em quatro classes diferentes (C, CC, CXC, e CXXXC), de acordo com o número e o espaçamento dos resíduos de cisteína conservados na região da posição N-terminal (ALEXANDER et al., 2011). As quimiocinas solúveis podem ligar-se as glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície de células endoteliais, formando um gradiente quimiotático, que orienta a passagem de células imunes em relação à fonte de secreção de quimiocinas (PROUDFOOT et al., 2003; LAU et al., 2004).

As quimiocinas exercem os seus efeitos biológicos através de receptores de superfície celular pertencentes à superfamília de receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs). Pelo menos 22 receptores de quimiocinas foram caracterizados, alguns podem se ligar à várias quimiocinas, enquanto outros são altamente específicos. Os receptores de quimiocinas são expressos em células que migram e sua ligação com as quimiocinas resulta na ativação de vias de sinalização dentro da célula. Além disso, esta interação resulta na imobilização de quimiocinas e permite a formação de gradientes locais fixos que, em modelos *in vitro*, regulam a coordenação sincronizada da motilidade celular e adesão celular dependente de integrinas (KUFAREVA et al., 2015; ALEXANDER et al., 2011)

Dentre as quimiocinas, uma das mais estudadas é o fator-1 α derivado de células estromais (SDF-1 α), também chamada CXCL12. Esta quimiocina foi originalmente descrita como um produto secretado por linhagens de células de estroma da medula óssea (TASHIRO et al., 1993). A CXCL12 também pode ser

secretada por vários tecidos e órgãos do corpo, como medula óssea, linfonodos, músculos e pulmão (PAWIG et al., 2015).

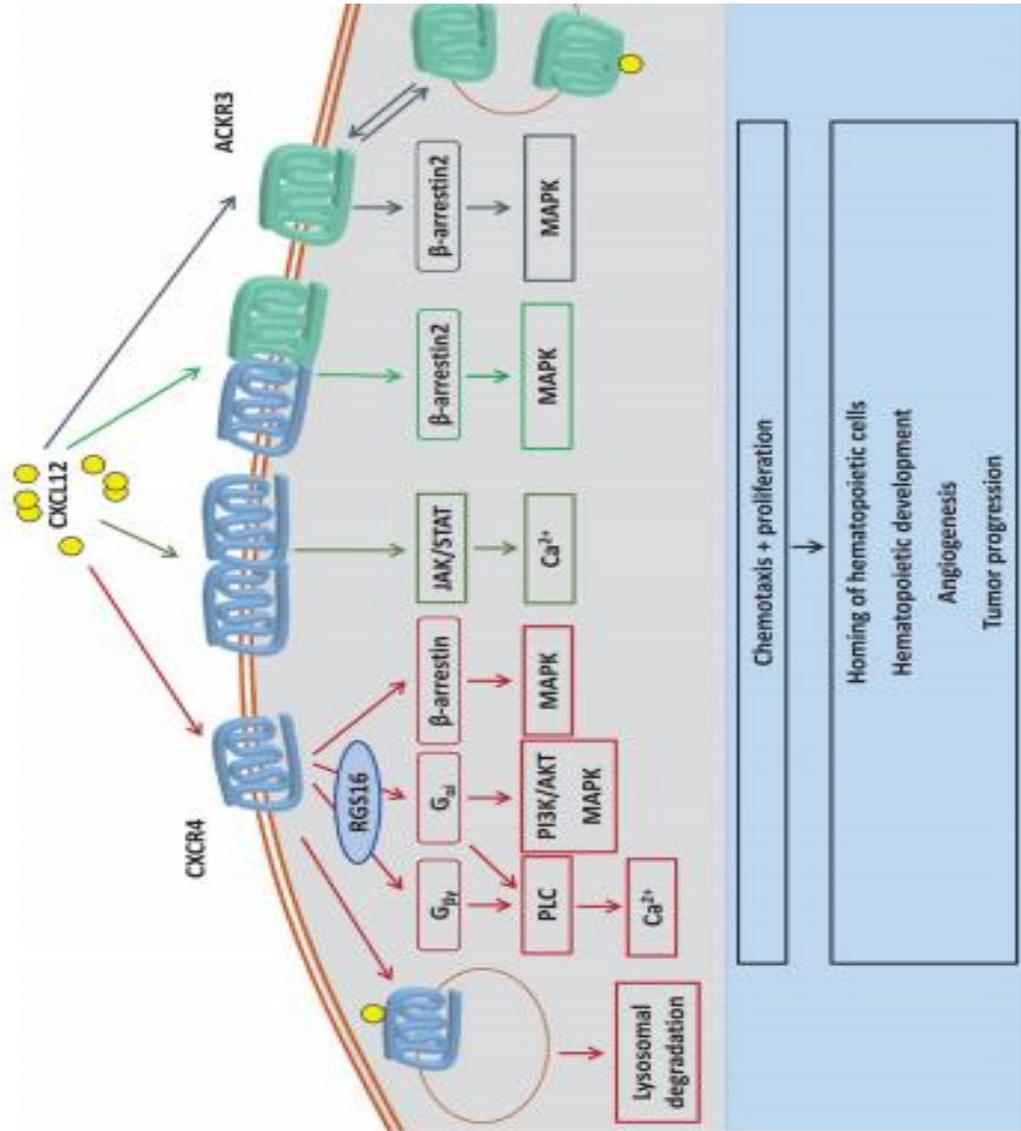
A quimiocina CXCL12/SDF-1 α é composta por 67 aminoácidos e age através da ligação com o seu principal receptor, o CXCR4, porém ela também se liga ao receptor CXCR7. O CXCR4 é expresso em vários tipos de células incluindo linfócitos, células dendríticas, células *Natural killer* (NK), células hematopoiéticas, células endoteliais, células epiteliais e células cancerosas. No sistema imunológico, a ligação CXCL12 / CXCR4-7 induz a sinalização intracelular que resulta na iniciação de vários eventos celulares (Figura 4) (PAWIG et al., 2015).

Os principais efeitos biológicos da quimiocina CXCL12 estão relacionados com a capacidade desta quimiocina induzir motilidade, respostas quimiotáticas, adesão, secreção de metaloproteinases e fatores angiogênicos em diferentes tipos celulares (MARQUEZ-CURTIZ et al., 2001). A CXCL12 possui um papel importante durante a inflamação, atuando na quimiotaxia de linfócitos e direcionando a migração de fibroblastos durante o reparo tecidual (RATAJCZAK et al., 2004).

Esta quimiocina dirige a proliferação e diferenciação de células progenitoras imaturas, através da ativação de vias de sinalização que modulam a adesão, rearranjo do citoesqueleto e controle do ciclo celular (DAR et al., 2006). A CXCL12 tem um papel importante durante o desenvolvimento e maturação dos linfócitos B na medula óssea. Ainda, a CXCL12 pode atuar nas células endoteliais como um quimioatraente *in vitro* e como um fator angiogênico *in vivo* (VANDERCAPPELLEN et al., 2008). Além disso, dados da literatura mostram que a quimiocina CXCL12 pode desempenhar um papel fundamental na atração de células tumorais aos seus órgãos-alvo para facilitar a formação de metástases (SUN et al., 2005).

Em linfonodos, a CXCL12 tem um papel importante na recirculação, estruturação e recrutamento celular para sítios inflamatórios. Esta quimiocina está presente na superfície luminal das vênulas endoteliais altas (HEVs), atuando na entrada, regulação do tráfico e localização dos linfócitos do sangue periférico no parênquima deste órgão (HAO et al., 2007).

Figura 4 - Via de sinalização induzida por CXCL12.



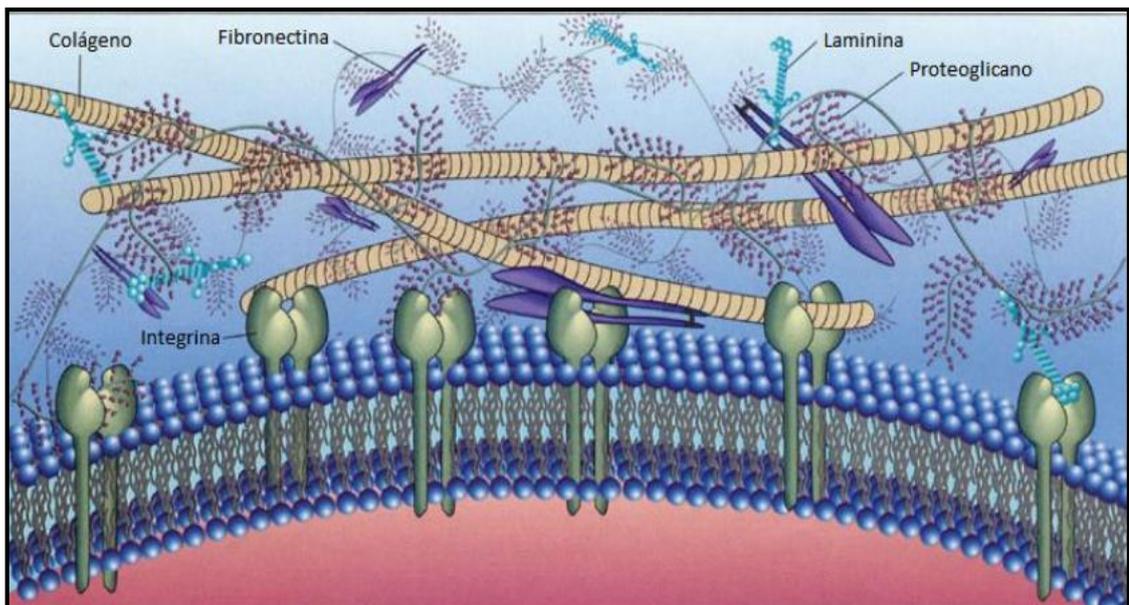
CXCL12 pode desencadear a sinalização intracelular por ligação com os receptores CXCR4, CXCR4/CXCR4, CXCR4/ACKR3 ou ACKR3. CXCR4 ativa a proteína G de sinalização, que é regulado negativamente por RGS16. O ACKR3 (anteriormente chamado CXCR7) também sinaliza via β-arrestina. Além disso, o complexo formado entre CXCR4 e ACKR3 desloca a sinalização induzida por CXCL12 longe da sinalização clássica da proteína G, ocorrendo a sinalização via β-arrestina. Por dimerização induzida pela CXCL12, CXCR4 também induz a sinalização via JAK/STAT. Considerando que o CXCR4 é principalmente degradado após a internalização de CXCL12, ACKR3 é continuamente reciclado, um processo que também promove degradação CXCL12. CXCL12 é conhecida por induzir a quimiotaxia e proliferação, suportando vários processos biológicos, tais como o desenvolvimento hematopoiético, a angiogênese ou a progressão do tumor. AKT (proteína quinase B); Ca²⁺ (ions de cálcio); JAK (Janus quinase); MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno); PI3K (phosphatidylinosítide 3-quinase); PLC (fosfolipase C); RGS16 (regulador da sinalização da proteína G 16); STAT (transdutor e ativador de transcrição de sinal) (Adaptado de PAWIG et al., 2015)

3.3 Matriz extracelular

3.3.1 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede estrutural que fornece suporte físico para a regulação de vários eventos celulares incluindo o crescimento, a migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese. Esta rede acelular consiste em uma grande variedade de macromoléculas cuja composição varia de tecido para tecido. Os principais constituintes da MEC são proteínas fibrosas, tais como colágeno e elastina, e glicoproteínas, como a fibronectina e laminina, além de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Figura 5) (THEOCHARIS *et al.*, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática da matriz extracelular.



A matriz extracelular consiste em uma rede de proteínas e carboidratos. (Adaptado de biocelmembrana.blogspot.com).

A interação entre MEC e as células ocorre através de receptores de superfície celular, tais como integrinas, receptor celular de proteoglicanos e o receptor de ácido hialurônico CD44. As células do sistema imunológico sintetizam e secretam moléculas de MEC, que auxiliam na formação da estrutura e propriedades biomecânicas dessa

rede, como também os sinais transmitidos para as células pelos componentes da MEC modulam suas respostas (LABAT-ROBERT, 2012).

As integrinas são receptores de superfície celular que regulam interações célula-célula e célula-matriz extracelular. A família das integrinas compreende 24 membros em mamíferos, formados por uma combinação de 18 subunidades α e 8 subunidades β . Desempenham um papel crítico em vários eventos celulares, incluindo o tráfico de leucócitos, fagocitose de patógenos, sinalização para respostas imunes inata e adaptativa. Vários membros da família das integrinas, atuam regulando os eventos de adesão e migração em linfócitos, dentre eles o LFA-1 (α L β 2; CD11a / CD18), Mac-1 (α M β 2; CD11b), VLA-4 (α 4 β 1; CD49d) e o VLA-5 (α 5 β 1; CD49e) (HYNES, 1992; HYNES, 2002).

A interação dos linfócitos com os componentes da matriz extracelular (colágeno, fibronectina e laminina), regulam várias atividades de linfócitos *in vitro*, incluindo adesão, migração, diferenciação e proliferação / sobrevivência (SHIMIZU; SHAW, 1991). Dados da literatura mostram que diferentes isoformas de laminina, predominantemente, a laminina-411 e laminina-511, através da ligação com a integrina α 6 β 1, contribuem para a adesão e migração de linfócitos do sangue periférico através das paredes das HEVs, promovendo a transmigração dessas células em linfonodos e em outros órgãos linfoides (GORFU et al., 2008).

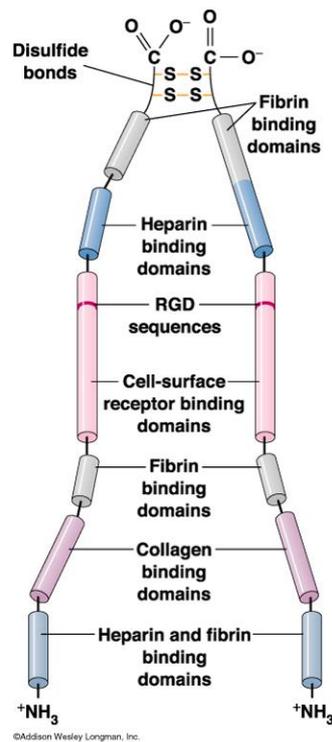
3.3.2 Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma proteína de matriz extracelular, composta por duas subunidades, cada uma possuindo um peso aproximado de 250 kDa que são covalentemente ligados por ligações dissulfeto na sua região C-terminal. O papel primário da fibronectina é ligar as células à MEC, mas também se liga a outros constituintes da MEC, incluindo a fibrina, colágeno e heparina. Estas interações são mediadas por vários domínios estruturais e funcionais presentes na fibronectina que foram definidos por fragmentação proteolítica ou análises de DNA recombinante (Figura 6). A fibronectina está envolvida na diferenciação embrionária, morfologia celular, migração celular e trombose. Com base na sua solubilidade, a fibronectina pode ser classificada em duas formas, fibronectina solúvel (plasma) e insolúvel (matriz extracelular e intracelular). A forma funcional da fibronectina *in vivo* está no seu estado

fibrilar. Estas fibras formam uma rede interligada abrangendo os tecidos em desenvolvimento (PANKOV; YAMADA, 2002; DAVIDSON *et al.*, 2004).

A fibronectina se liga às células, principalmente através de receptores do tipo integrinas, sendo a integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) o seu principal receptor celular. Além disso, a fibronectina também pode ligar-se a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4). Estas integrinas medeiam a adesão celular, ligando o citoesqueleto de actina com moléculas de matriz extracelular, auxiliando na ancoragem e aderência das células. Vários estímulos podem agir sobre estes receptores modulando a transmissão de sinais intracelulares para o exterior da célula, influenciando a afinidade dessas integrinas com ligantes da MEC, afetando vários processos celulares, como a adesão e migração (LIAO *et al.*, 2002).

Figura 6 - Representação esquemática da fibronectina.



Uma molécula de fibronectina consiste em duas cadeias polipeptídicas quase idênticas unidas por duas ligações dissulfeto perto das suas extremidades carboxila. Cada cadeia polipeptídica é dobrada numa série de domínios globulares ligados por segmentos curtos e flexíveis. Os domínios globulares têm locais de ligação para componentes da MEC ou para receptores específicos na superfície celular. O domínio de ligação ao receptor contém a sequência tripeptídica RGD (arginina-glicina-aspartato), que é reconhecida pelos receptores de fibronectina. A fibronectina também tem locais de ligação para heparan sulfato, hialuronato e gangliósidos (glicosfingolípídeos que contêm grupos de ácido siálico) (Adaptado de: <http://openstaxcnx.org>).

Dados da literatura, mostram que a fibronectina desempenha um papel crítico durante alguns tipos de câncer. XIA e colaboradores (2017), observaram que em ensaios de migração em *transwell* e de cicatrização de feridas, que a capacidade invasiva de células de pacientes com câncer de tireoide papilar foi aumentada na presença de fibronectina, contribuindo para o desenvolvimento de metástase.

3.4 Fator-1 de crescimento semelhante à insulina

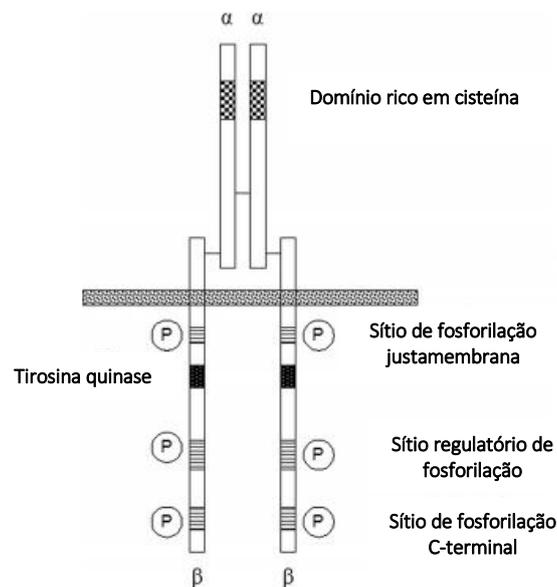
O fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é membro de um grupo de polipeptídeos que estão estruturalmente relacionados, incluindo o IGF-2 e a insulina. O IGF-1 é composto por 70 aminoácidos organizados em cadeias α e β ligados por ligações dissulfeto. O IGF-1 e o IGF-2 circulam no plasma, em complexos formados com as proteínas ligadoras de IGFs (IGFBPs). A família de IGFBPs compreende seis proteínas plasmáticas, que são sintetizadas por muitos tecidos e células, e são importantes moduladoras da ação dos IGFs. Essas proteínas ligam-se aos IGFs, prolongando a sua meia-vida no sangue e servindo como carreadores para transportá-los até células específicas. Elas possuem uma afinidade relativamente elevada para os IGFs, possibilitando sua interação com receptores presentes nas células-alvo, desencadeando vários eventos celulares (DENLEY et al., 2005; CLEMMONS, 1997).

CHEN e colaboradores (2004) observaram que o tratamento com IGF-1/IGFBP-3 e IGF-1, reduziu a inflamação nas ilhotas pancreáticas e a apoptose das células β em camundongos NOD. Em seres humanos, foi visto uma redução nos níveis de IGF-1 e IGFBPs no plasma de crianças com síndrome nefrótica ou com uso prolongado de glicocorticoides, o que pode levar a um retardamento do crescimento (DONG; REN, 2003).

A síntese de IGF-1 ocorre predominantemente no fígado, através da regulação pelo hormônio do crescimento (GH), que estimula expressão de genes para IGF-1 nos hepatócitos. Entretanto, o IGF-1 também pode ser produzido localmente por muitos tipos de células, como células epiteliais, leucócitos do sangue periférico e células endoteliais, em condições basais (SMITH, 2010). A maioria das ações do IGF-1 são mediadas pelo seu receptor, o IGF-1R, um membro de uma família de receptores transmembrana tirosina quinase, que possui duas cadeias α e duas cadeias β . Estas

quatro cadeias são ligadas por pontes dissulfetos formando uma estrutura tetramérica, onde a subunidade α é extracelular, enquanto a subunidade β é transmembrana (Figura 7). Após sua ligação com IGF-1, ocorre a ativação de vias de sinalização intracelulares, desencadeando vários eventos celulares (VINCENT; FELDMAN, 2002).

Figura 7 - Representação esquemática do IGF-1R.



Demonstração da distribuição de seus domínios e cadeias, e a localização da ligação dissulfetos. (Adaptado de SMITH, 2010).

3.4.1 Fator-1 de crescimento semelhante à insulina e o sistema imune

A sinalização do sistema IGF tem um importante papel em diversas respostas celulares, tais como a proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência e prevenção da apoptose celular (DUAN; XU, 2005). Foi demonstrado que o IGF-1 promove a hematopoiese (ZUMKELLER; BURDACH, 1999), prolonga a sobrevivência dos linfócitos (WALSH; SMITH; O'CONNOR, 2002) e modula a sinalização das células T (BERNABEI et al, 2003). Dados da literatura mostram que o IGF-1 estimula a produção de matriz extracelular por células epiteliares tímicas (TEC) humanas. Além disso, o pré-tratamento de TEC murinas com IGF-1 aumenta sua adesão com timócitos (DE MELLO COELLO et al., 2002). Através do uso de camundongos *knock-out* para IGF-1R específico dos linfócitos T, foi demonstrado que o IGF-1 aumenta a

timopoiese principalmente por uma expansão das células epiteliais tímicas (CHU et al, 2008).

Em linfonodos humanos, nas zonas de linfócitos B e T várias células expressam proteínas e o gene para o IGF-1, como a maioria dos macrófagos, células dendríticas foliculares, células dendríticas interdigitantes, alguns linfócitos e HEVs. Demonstrando que o IGF-1 pode modular eventos de sobrevivência, diferenciação e manutenção dos vários tipos celulares em linfonodos (OBERLIN et al., 2009). Ainda, o IGF-1 promove o desenvolvimento de células NK derivadas de células-tronco hematopoiéticas humanas CD34 (NI et al., 2013).

VIANA e colaboradores (2015), observaram que o IGF-1 em combinação com a quimiocina CCL2 aumenta a adesão de células endoteliais *in vitro*. Além disso, demonstraram que o IGF-1 isolado ou em conjunto com a quimiocina CCL2 aumenta a migração *in vitro* de células endoteliais sobre um substrato de fibronectina. NAALDIJK e colaboradores (2015), em um modelo de migração em *transwell*, verificaram que o IGF-1 quando utilizado como um fator quimioatraente aumenta significativamente a migração de células-tronco mesenquimais de camundongos. Ao longo dos anos, estudos vêm demonstrar o envolvimento do IGF-1 nas células do sistema imunológico, modulando várias de suas ações e conseqüentemente contribuindo nas funções imunológicas. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da ação conjunta do IGF-1 com a quimiocina CXCL12 na migração dos linfócitos. O conhecimento das ações de diferentes substâncias na modulação dos eventos de adesão e migração de células imunológicas é bastante relevante, pois permite o desenvolvimento de novas terapias para diferentes desordens imunológicas.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Neste trabalho, para a obtenção dos linfócitos, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 a 8 semanas, de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Uso de Animais (CEUA), sob o número de processo: 14/2015.

4.2 Obtenção de linfócitos

Os camundongos foram eutanasiados com tiopental (120 mg/Kg) via intraperitoneal, e os linfonodos subcutâneos (axilares, braquiais e inguinais) foram removidos e macerados em placa de 24 poços contendo 1 mL de solução salina de fosfato (PBS) acrescida de 4% de soro bovino fetal (SBF). O sobrenadante foi recolhido e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de Trypan 0,02%.

4.3 Citometria de fluxo

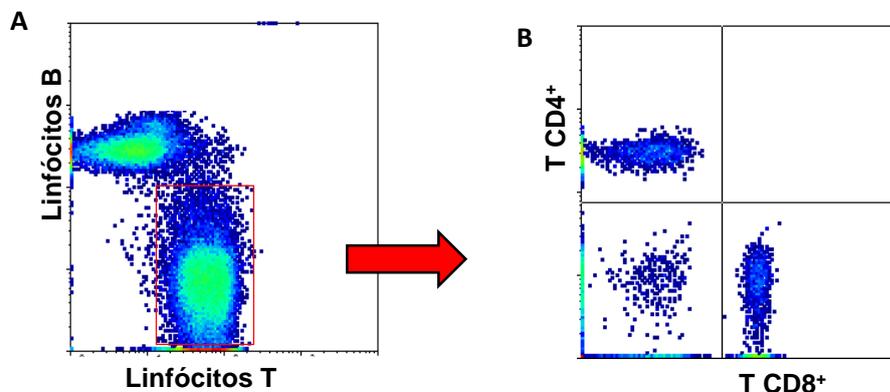
Para verificar o fenótipo dos linfócitos obtidos dos linfonodos subcutâneos e para analisar a expressão de receptores envolvidos na adesão e migração linfocitária foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Antes e após os ensaios de adesão e migração, foram verificados os marcadores de superfície celular CD4, CD8, CD3, CD45R(B220). Antes dos ensaios de migração também foram analisados a expressão do IGF-1R, CXCR4, CD62L, VLA-4 e VLA-5. Os anticorpos foram diluídos em PBS, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C. Após marcação, as células foram lavadas com PBS-SBF 2% e fixadas em formaldeído a 2%, para posterior análise. As células devidamente marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto II equipado com o programa de computador Diva (BD biosciences).

As análises foram realizadas utilizando o software WinMDI versão 2.9 e os resultados foram expressos na forma de densitplots e histogramas. As células foram selecionadas a partir dos parâmetros de tamanho x granulidade pré-estabelecidos para os linfócitos. Foram adquiridos 20.000 eventos (células) em cada experimento.

4.3.1 Análise da Citometria de fluxo

Os densitplots são representações gráficas capazes de individualizar e quantificar as populações de linfócitos baseado na presença ou ausência das moléculas de superfície CD3 e CD45R (ou outras moléculas de interesse). No quadrante superior esquerdo encontram-se os linfócitos B e no quadrante inferior direito ao linfócitos T (Figura 8A). Através da expressão das moléculas de superfície CD4/CD8 também é possível individualizar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ (Figura 8B).

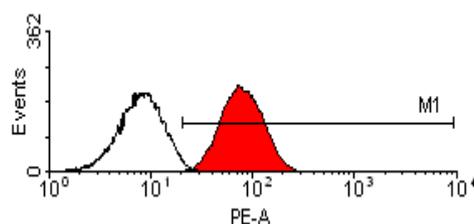
Figura 8 - Densitplot representativo das populações de linfócitos.



(A) Densitplot indicando as populações de linfócitos definidas pela expressão das moléculas CD3/CD45R. (B) Densitplot indicando as subpopulações de linfócito T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ através da expressão das moléculas de superfície CD4/CD8. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

Os histogramas (figura 9) indicam o número de eventos e a intensidade de fluorescência resultantes da expressão dos receptores presentes na célula. O traço citofluorimétrico em branco (vazado) indica a marcação obtida com a imunoglobulina não- relacionada e o traço em vermelho (preenchido) indica a marcação para o IGF-1R, CXCR4, CD62L, VLA-4 ou VLA-5.

Figura 9 - Histograma representativo.



Demonstração da expressão de receptores na superfície de linfócitos. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

4.4 Análise de receptores de superfície celular

Após a eutanásia, os linfonodos subcutâneos (axilares, braquiais e inguinais) foram removidos e macerados em placa de 24 poços. Os linfócitos foram recolhidos, contados e avaliados por citometria de fluxo, para verificar o percentual das populações de linfócitos T e B, e analisar a expressão do IGF-1R na sua superfície celular em ambas as populações. Para isto, foram utilizados os anticorpos anti-CD3-APC, anti-CD45R(B220)-PE e anti-IGF-1R-PercP.

Para analisar a ação do IGF-1 e/ou CXCL12 na expressão de receptores de superfície celular, os linfócitos foram contados e plaqueados (1×10^5 células) em placas de 24 poços em meio RPMI 1640, acrescido de 2% SBF. Em seguida, foi feito o tratamento com IGF-1 (100 ng/mL) e/ou CXCL12 (200ng/mL), durante 1 hora. Grupos de células cultivadas sem o tratamento foram utilizados como controles. O cultivo celular foi realizado em estufa de atmosfera úmida, a 37°C com 5% de CO₂. Após o tempo de tratamento, os linfócitos foram recolhidos, contados e avaliados por citometria de fluxo a expressão dos receptores de superfície celular, CXCR4, CD62L, VLA-4/ $\alpha 4\beta 1$ (CD49d) e VLA-5/ $\alpha 5\beta 1$ (CD49e). Para isto, foram utilizados os anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD8-PercP.Cy5, anti-CD45R(B220)-PE, anti-CXCR4-PE, anti-CD62L-APC, anti-CD49d-PE e anti-CD49e- PE. O controle negativo para análise foi feito com anticorpos primários de imunoglobulinas não relacionadas, que não geram marcação significativa.

4.5 Cultura de células endoteliais

As células da linhagem endotelial tEnd.1 derivadas de timo murino, foram cultivadas em garrafas de cultura com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, 100UI/ml de penicilina e 100µl/ml de estreptomicina. As células foram mantidas em condições estéreis, em estufa a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. A passagem destas células foi realizada quando estas se encontravam em estado de semi-confluência por meio do tratamento com solução de Tripsina 0,25% - EDTA 0,02% em solução livre de cálcio e magnésio, pH 7,2.

4.6 Ensaio de adesão linfócitos/células endotelial

Células da linhagem endotelial tEnd.1 foram cultivadas em garrafas de cultura celular (1×10^5 células), e deixadas por 16 horas em estufa de CO₂ a 37°C para

aderirem. Após este período, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi feita a co-cultura das células endoteliais com linfócitos (na proporção de 50 linfócitos por célula endotelial) na presença ou ausência de IGF-1, na concentração de 100 ng/mL, durante 1 hora. Após este tempo, foi feita a remoção dos linfócitos não-aderentes, os linfócitos aderidos às células tEnd.1 foram recolhidos, por meio de lavagens com PBS gelado e quantificados. Em seguida, pela técnica de citometria de fluxo, os linfócitos foram marcados com anticorpos anti-CD4-APC, anti-CD8-PerCP.Cy5, anti-CD45R-FITC(B220) e anti-CD49d-PE para se determinar o fenótipo dos linfócitos aderentes e a expressão do receptor VLA-4 após o ensaio de adesão.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para verificar a adesão linfócitos/células endoteliais (tEnd.1) em nosso modelo experimental, foram plaqueadas 2×10^4 tEnd.1 em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro no interior de cada poço. As células foram cultivadas com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF, e mantidas por 16 horas em estufa de CO₂ a 37°C para aderirem. Após este período, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi feita a co-cultura das células endoteliais com linfócitos (1×10^5 células) durante 1 hora. Após este tempo, foi feita a remoção dos linfócitos não-aderentes, por meio de lavagem com PBS, os linfócitos aderidos às células endoteliais foram fixados com glutaraldeído por 5 minutos. Em seguida, foi retirado o glutaraldeído e as células foram lavadas com água MilliQ por 5 minutos. Posteriormente, a lamínula de cada poço foi retirada e colada para secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as células foram metalizadas por 6 minutos com alvo de ouro com corrente de 10Ma em metalizador Sanyu Electron Quick Coater SC-701. Em seguida, as células foram analisadas e fotografadas através de microscopia eletrônica de varredura (Shimadzu SSX-550 Superscan).

4.8 Ensaio de quimiotaxia celular

Os ensaios foram realizados utilizando o sistema de *transwell* (Corning Costar, Cambridge, USA) empregando insertos com membranas de policarbonato com poros de 5 µm. A membrana dos insertos foram previamente tratadas com a molécula de matriz extracelular, fibronectina, na concentração de 10 µg/mL, por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-

BSA 0,1% por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após o bloqueio, foi adicionado aos poços inferiores das câmaras 600 µL de meio de cultura RPMI/BSA 1% contendo IGF-1 e/ou CXCL12, nas concentrações de 100 ng/mL e 200 ng/mL, respectivamente, como fatores quimiotáticos. Os linfócitos (2x10⁶ células) foram colocados na parte superior da câmara em 100 µL de meio de cultura RPMI/BSA 1%. Após 3 horas, a 37°C em incubadora de CO₂, os linfócitos migrantes depositados na câmara inferior foram coletados e contados. A fim de determinar as subpopulações migrantes, os linfócitos foram marcados com os anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD8-PercP.Cy5, anti-CD45R-PE(B220), também foi avaliada a expressão da molécula CD62L na superfície dos linfócitos utilizando o anticorpo anti-CD62L-APC para análise por citometria de fluxo.

4.9 RT-PCR

Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços de fundo chato. Os poços da placa foram previamente tratados com a molécula de matriz extracelular, fibronectina, na concentração de 10 µg/mL, por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂, ou BSA na mesma concentração (usada como controle basal). Posteriormente, os poços foram bloqueados com PBS-BSA 0,1% por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após o bloqueio, os linfócitos (5x10⁷ células) foram adicionados aos poços da placa em 100 µL de meio de cultura RPMI/BSA 1% contendo IGF-1 e/ou CXCL12, nas concentrações de 100ng/mL e 200ng/mL, respectivamente, e mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 1 hora, os linfócitos foram recolhidos, centrifugados e lavados com PBS. Em seguida, foram submetidos às etapas de extração do RNA total, síntese e amplificação do cDNA pela metodologia reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação do gene-alvo: *IGF-1R*.

A descrição das etapas encontra-se a seguir:

a) Desenho dos oligonucleotídeos: Os oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com o software Primer3, disponível na página de internet do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Na tabela 1 estão descritos os oligos usados para o gene-alvo e o controle endógeno.

b) Extração do RNA total: Amostras de RNA total dos foram extraídas pelo método fenol-clorofórmio. Brevemente, as células dos grupos de tratamento foram coletadas em 1 mL de Trizol (TRIzol Reagent, Life Technologies), incubadas com 200 µl de clorofórmio (Anidrol, Brasil), agitadas por 15 segundos e centrifugadas por 15 minutos

a 4°C na velocidade de 12000 G. Após centrifugação, a fase aquosa das amostras foi separada em um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol P.A. (Merk, Alemanha) seguido de uma leve mistura pela inversão do tubo. A solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida novamente centrifugada por 10 minutos a 4°C na velocidade de 12000 G. Após centrifugação, o sobrenadante das amostras foi retirado, preservando o precipitado contendo RNA. Os precipitados foram lavados com 1 mL de álcool 75% e centrifugados por 5 minutos a 4°C na velocidade de 7500 G. Após secagem, o RNA foi ressuspenso com água livre de RNases e DNases, e colocado no gelo para posterior quantificação. O RNA total de cada amostra foi quantificado com auxílio de espectrofotômetro e submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5%) para verificação da integridade da molécula. As amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C até o uso.

c) Síntese do cDNA e PCR: Primeiramente, foi realizada uma etapa de remoção do DNA genômico residual utilizando tratamento com DNase I (Ambion), seguido da síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, EUA), que contém todos os reagentes para a reação de transcriptase reversa. Para reação de PCR foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), em que 1 µL de cDNA foi misturado com 2,5 µL de tampão de PCR (10X; PCR buffer, Invitrogen), 2,5 µL de dNTPs (0,2 mM; Invitrogen), 1,25 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM; MgCl₂) e 500 nM dos oligos específicos para os genes-alvo constitutivo β-2-microglobulina, acrescido de água livre de RNases e DNases, em um volume total de 20 µL. Após reação, 5 µL de cada reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% por 25 minutos sob 80 volts. As bandas amplificadas foram visualizadas sob a luz ultravioleta pela coloração com brometo de etídio. A análise da intensidade das bandas foi realizada através do programa de computador ImageJ.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na RT-PCR.

<i>Gene</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
<i>IGF-1R</i>	5'- ATGCTTCAGTCCCTTCCATTC-3'	5'- TGTCTTTGGAGCAGTAGTTGT-3'
<i>β-2-microglobulina</i>	5'- CTGCTACGTAACACAGTTCCACCC-3'	5'- CATGATGCTTGATCACATGTCTCG-3'

4.10 Análises estatísticas

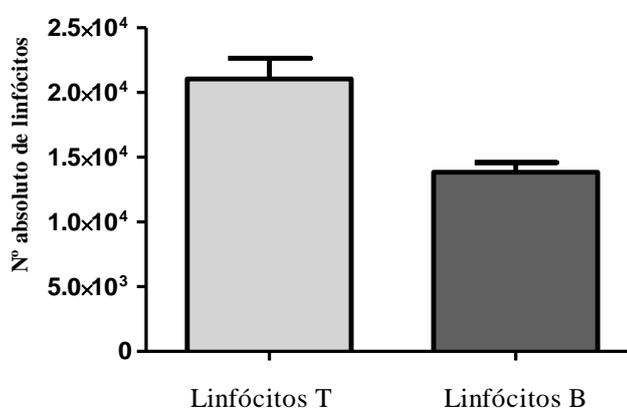
Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste *t Student* e teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Turkey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação das populações de linfócitos obtidos de linfonodos subcutâneos.

Inicialmente, verificou-se o número absoluto de cada população de linfócitos em linfonodos subcutâneos. Como resultado, observou-se que na população linfocitária presente nos linfonodos subcutâneos há um maior número de linfócitos T em relação aos linfócitos B (Figura 10).

Figura 10 - Populações de linfócitos em linfonodos.

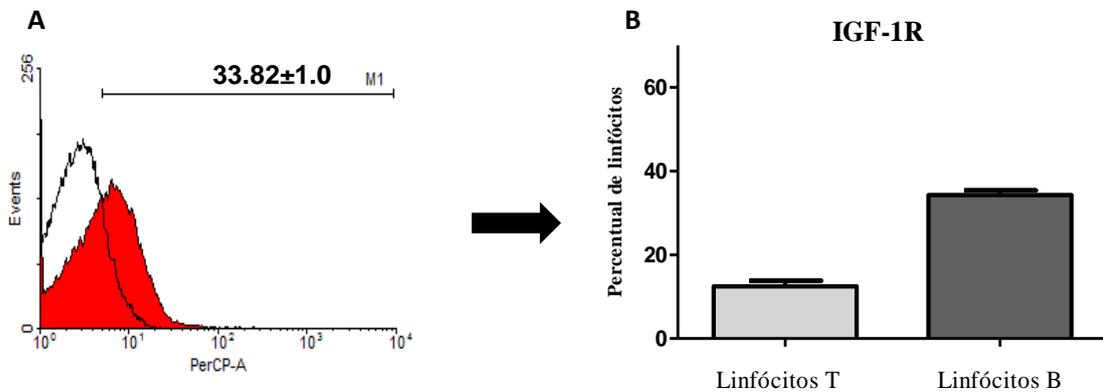


Número absoluto de linfócitos das populações celulares em linfonodos subcutâneos após análise por citometria de fluxo, n=9. Os valores estão expressos como média ± DP. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.2 Verificação da expressão do IGF-1R na superfície de linfócitos periféricos obtidos de linfonodos subcutâneos.

Para verificar a expressão do IGF-1R na superfície de linfócitos, foram utilizados os anticorpos anti-CD3-APC, anti-CD45R-PE e anti-IGF-1R-PerCP. Quando analisada a expressão do receptor para IGF-1, o IGF-1R, na superfície das células, foi constatado que na população total de linfócitos, um baixo percentual de células expressavam o IGF-1R (Figura 11A). Quando foram analisadas as populações individualmente, verificou-se que um maior percentual de linfócitos B expressavam o IGF-1R na sua superfície, quando comparado aos linfócitos T (Figura 11B).

Figura 11- Expressão do IGF-1R em linfócitos.

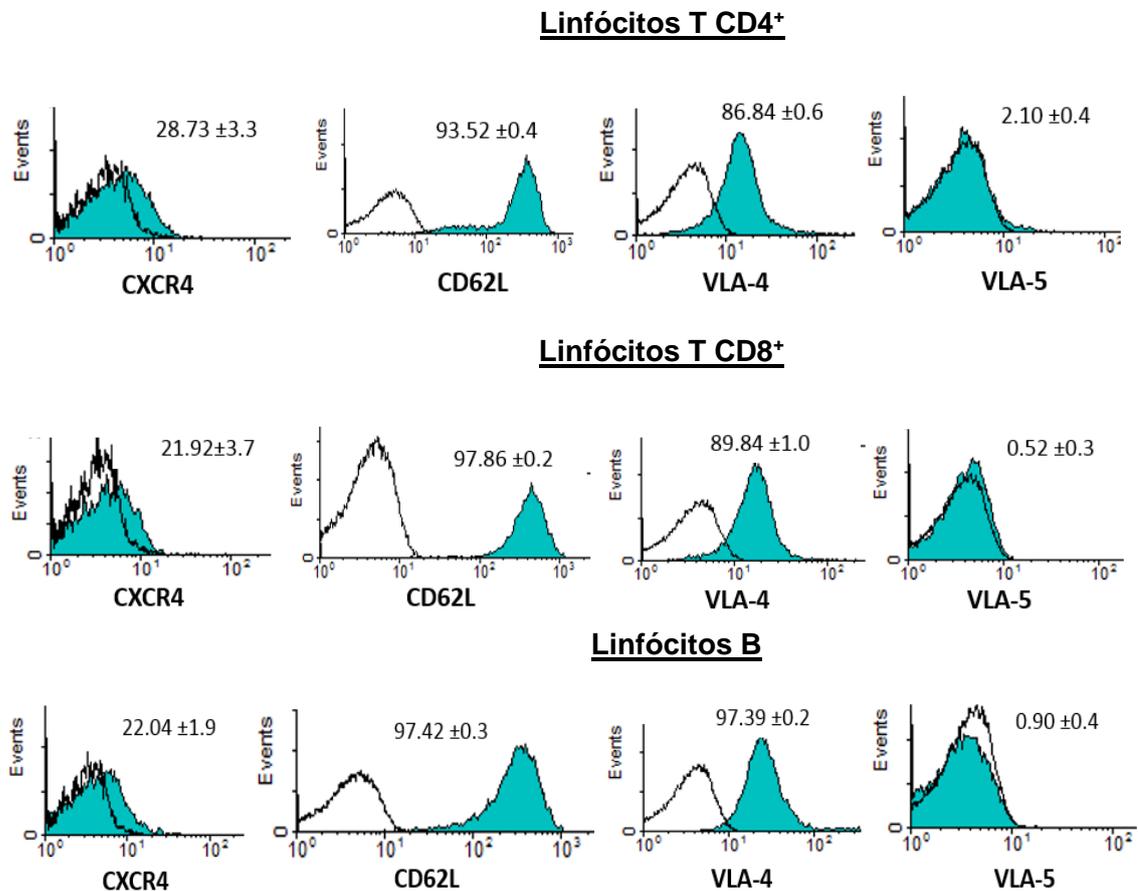


(A) Histograma representativo do percentual de linfócitos que expressavam em sua superfície o IGF-1R em linfócitos totais. (B) Percentual de linfócitos que expressavam em sua superfície o IGF-1R nas populações de linfócitos T e B. A expressão do receptor foi obtida através da análise por citometria de fluxo, $n=9$. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.3 Análise da expressão de receptores envolvidos em adesão e migração nas subpopulações de linfócitos.

Inicialmente, investigou-se a expressão de receptores de superfície celular em linfócitos frescos e notou-se que estes receptores estavam presentes nas diferentes populações de linfócitos. Foi observado que na subpopulação de linfócitos T $CD4^+$ 28,7% expressavam o receptor CXCR4, 93,5% expressavam o receptor CD62L, e em relação as integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) 86,8% e 2,10% de linfócitos expressavam estas integrinas, respectivamente. Já na subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ 21,9% expressavam o receptor CXCR4, 97,8% expressavam o receptor CD62L, 89,8% dos linfócitos expressavam a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e 0,52% expressavam a integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5). Em relação a população de linfócitos B, foi observado que estas células expressavam os diferentes receptores: 22 % dos linfócitos expressavam o receptor CXCR4, 97,4% expressavam o receptor CD62L, 97,3% expressavam a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e 0,9% expressavam a integrina $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) em sua superfície celular (Figura 12).

Figura 12 - Expressão de receptores de superfície celular envolvidos em adesão e migração nas populações de linfócitos de linfonodos subcutâneos.



Histograma representativo do percentual de linfócitos que expressavam em sua superfície os receptores CXCR4, CD62L e as integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) nas subpopulações de linfócitos. A expressão dos receptores foi obtida através da análise por citometria de fluxo, $n=4$. Os valores estão expressos como média \pm DP. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.4 Análise da expressão de receptores de superfície celular envolvidos na adesão e migração de linfócitos após o tratamento com IGF-1 e/ou CXCL12.

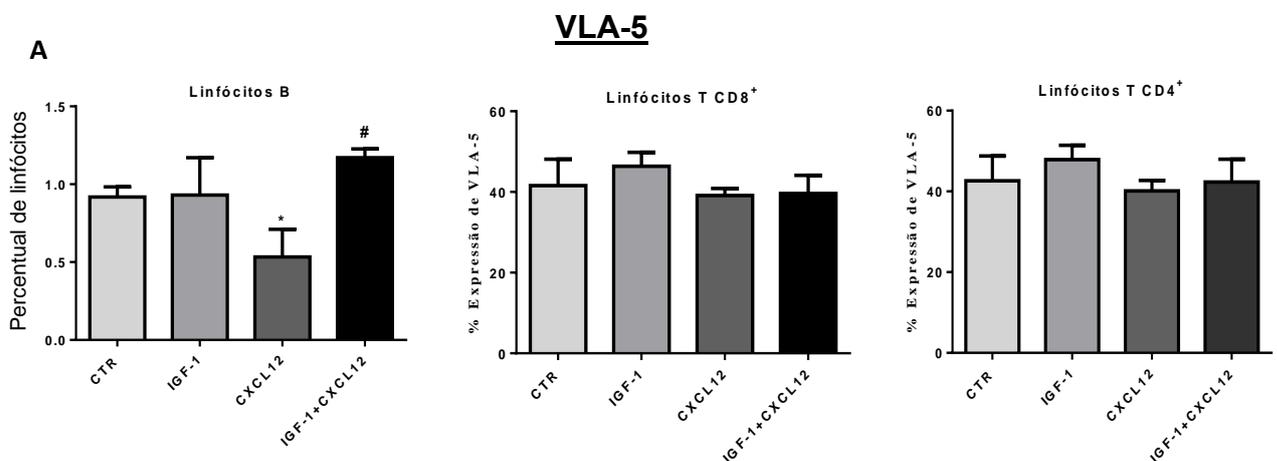
A expressão dos receptores de superfície celular, CXCR4, CD62L e as integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5), na superfície dos linfócitos foi avaliada após o tratamento com IGF-1 e/ou CXCL12, por 1 hora.

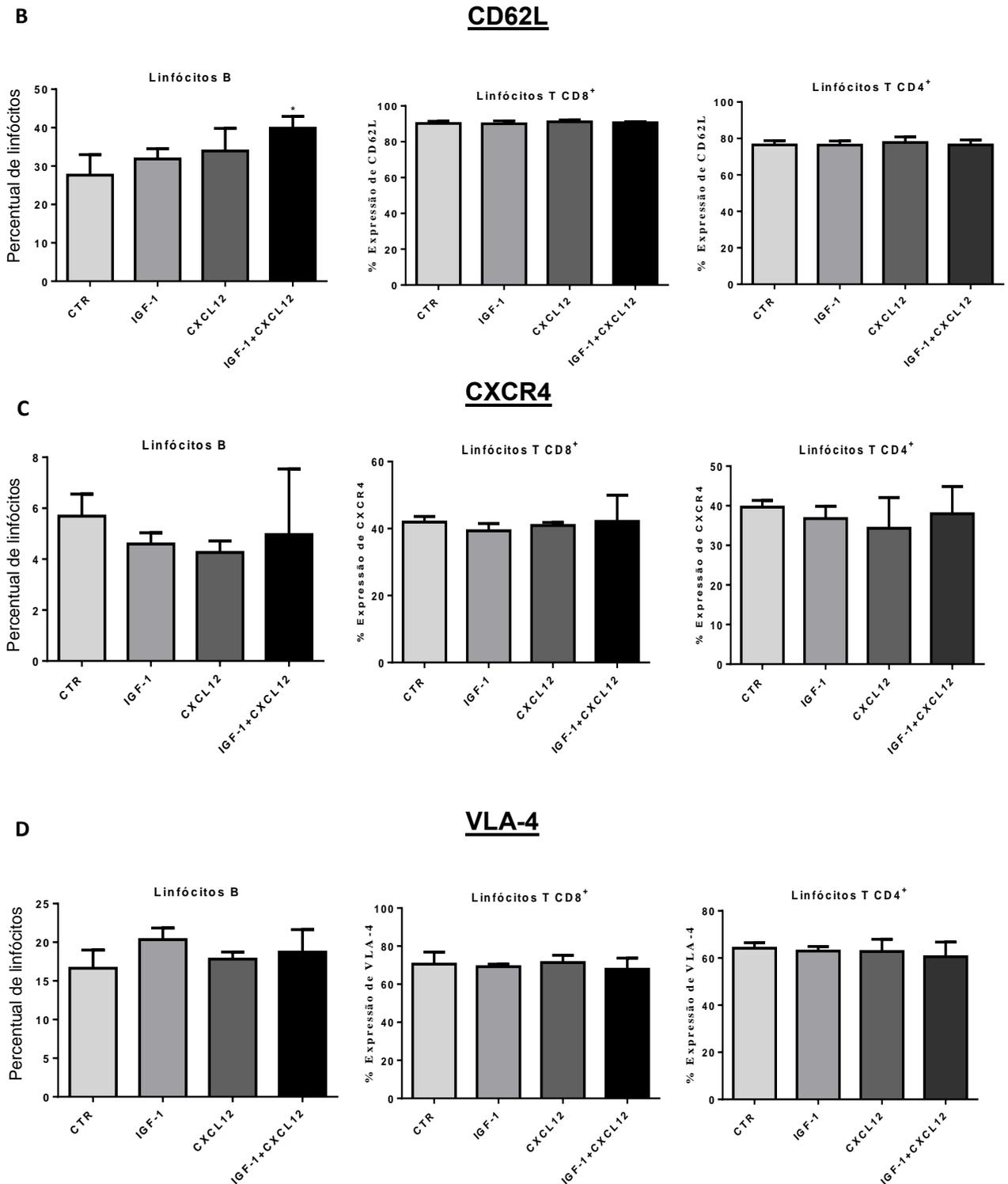
Como resultado, em relação a expressão da integrina VLA-5, verificou-se que apenas na população de linfócitos B ocorreu uma diminuição no percentual de células que expressavam esta integrina no grupo tratado com CXCL12 quando comparado ao grupo controle. Porém, após 1 hora de tratamento com IGF-1+CXCL12 ocorreu um aumento no percentual de linfócitos B que expressavam esta integrina, quando

comparado ao grupo tratado somente com CXCL12 (Figura 13A). Porém, nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não foram observadas mudanças estatísticas nos percentuais de células que expressavam esta integrina entre os tratamentos testados.

No que se refere a expressão do receptor CD62L, observou-se que após 1 hora em cultura, ocorreu uma diminuição na expressão deste receptor na população de linfócitos B, porém o tratamento com IGF-1+CXCL12 foi capaz de aumentar o percentual de células que expressavam o CD62L quando comparado ao grupo controle (Figura 13B). Entretanto, nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não foram observadas mudanças estatísticas no percentual de células que expressavam o receptor CD62L entre os tratamentos testados. Após o tempo de 1 hora, observou-se que 39% dos linfócitos T CD4⁺, 41% linfócitos T CD8⁺ e 5% dos linfócitos B expressavam o receptor CXCR4 em sua superfície celular. Entretanto, não foram observadas alterações no percentual de linfócitos que expressavam o CXCR4 entre os tratamentos testados (Figura 13C). Em relação a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), verificou-se 63% dos linfócitos T CD4⁺, 71% linfócitos T CD8⁺ e 19% dos linfócitos B expressavam a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) em sua superfície celular. Porém, não houve alterações na expressão desta integrina nas subpopulações de linfócitos entre os tratamentos testados durante 1 hora (Figura 13D).

Figura 13 - Efeito do IGF-1 e/ou CXCL12 na expressão de receptores de superfície celular de linfócitos.





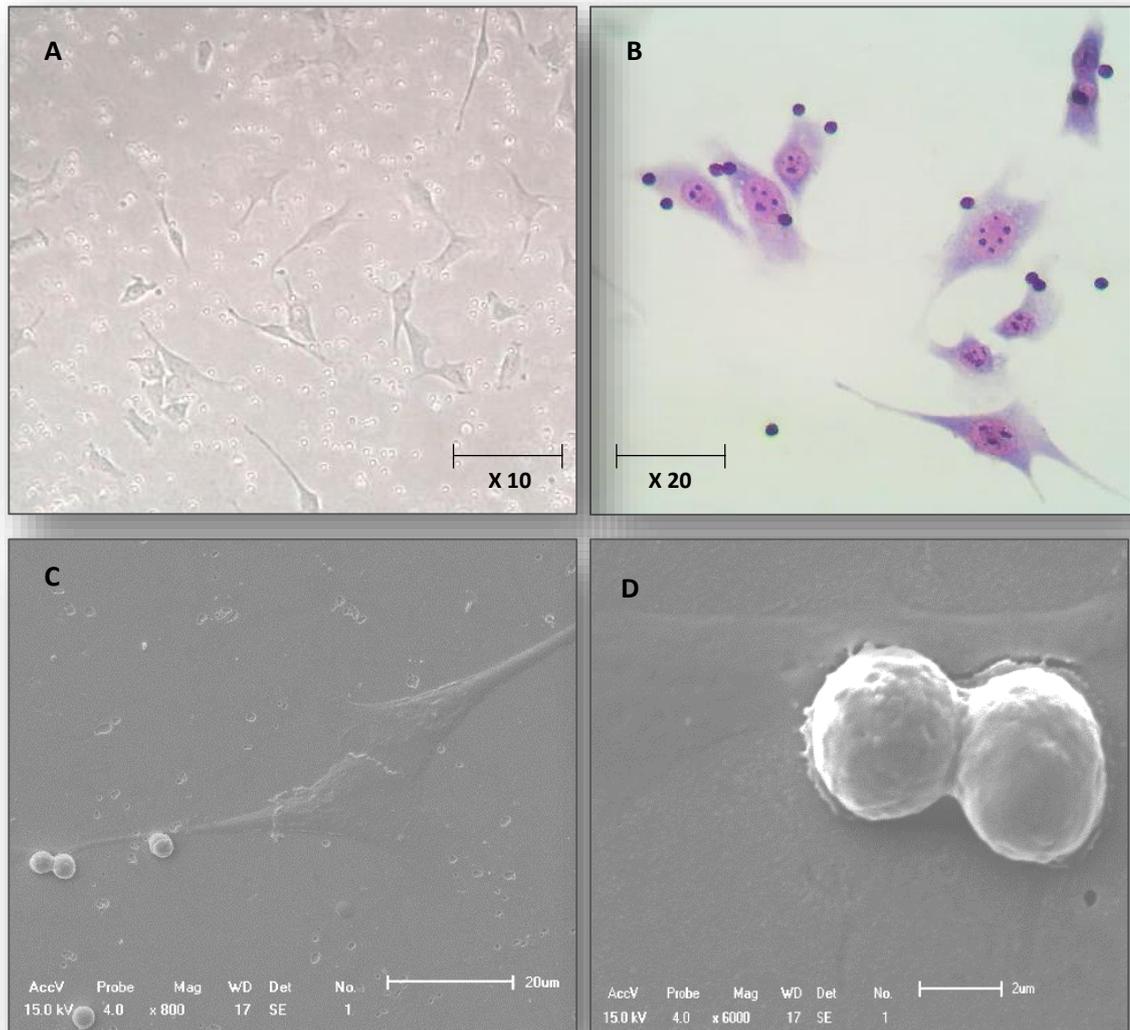
A expressão dos receptores foi obtida através da análise por citometria de fluxo que demonstrou o número percentual de linfócitos que expressavam em sua membrana os receptores VLA-5 e CD62L. Os gráficos representam a porcentagem de linfócitos que expressavam os receptores VLA-5 e CD62L na presença ou ausência de tratamentos por 1 hora, n=4. Os valores estão expressos como média \pm DP. A análise estatística foi feita com o teste one-way ANOVA $p < 0,05$. (* comparado com CTR e # comparado com CXCL12). (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.5 Análise da adesão linfócitos/células endoteliais após o tratamento com IGF-1.

Para analisar a adesão entre linfócitos e células endoteliais (tEnd.1) *in vitro*, inicialmente foi necessário a padronização do nosso modelo experimental. As células endoteliais foram cultivadas em garrafas de cultura por 16 horas, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os linfócitos foram adicionados às monoculturas de tEnd.1 e mantidas em co-cultura durante 1 hora. Como observado na figura 12, em nosso modelo *in vitro* de adesão os linfócitos foram capazes de aderir as células endoteliais de maneira eficiente (Figura 14A). Após 1 hora de adesão, os linfócitos que não aderiram às tEnd.1 foram removidos e os linfócitos que aderiram foram corados (Figura 14B). A viabilidade do nosso modelo experimental de adesão *in vitro* entre linfócitos e t.End1 também foi verificada através de microscopia eletrônica de varredura, notando-se que este modelo permite o contato entre estas células através de suas membranas celulares (Figura 14C e 14D).

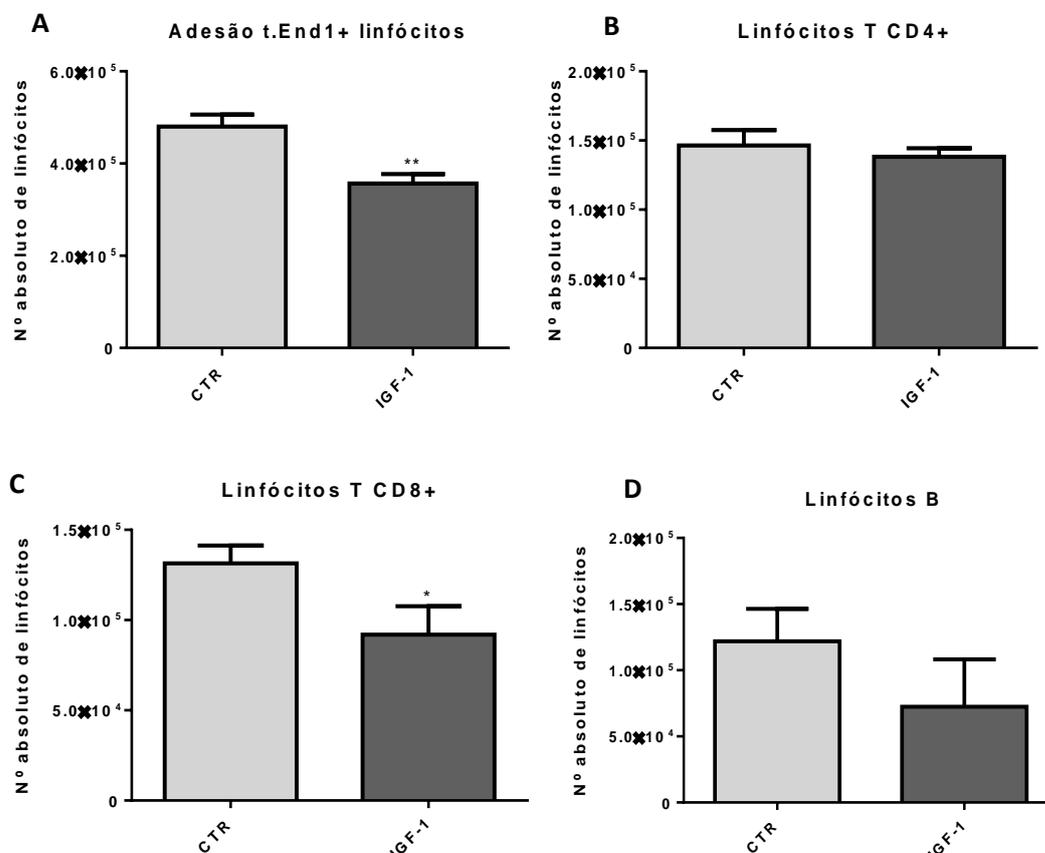
Após a padronização do modelo de adesão *in vitro*, foi avaliada a adesão de linfócitos às tEnd.1 após o tratamento por 1 hora com o IGF-1. Os linfócitos aderidos foram recolhidos, contados e marcados com anticorpos específicos para análise por citometria de fluxo das subpopulações de linfócitos. Os resultados demonstram que houve uma redução significativa no número absoluto de linfócitos totais aderidos às tEnd.1 após 1 hora de tratamento com o IGF-1 (Figura 15A). Quando analisadas as subpopulações de linfócitos individualmente, verificou-se que este efeito foi mantido na subpopulação de linfócitos T CD8⁺, onde ocorreu uma redução significativa no número de linfócitos aderidos às tEnd.1 (Figura 15C). Porém, na subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B não ocorreu alteração significativa no número absoluto de linfócitos aderidos às células endoteliais (Figura 15B e 15D).

Figura 14 - Padronização da co-cultura linfócitos/ tEnd.1 *in vitro*.



Co-cultivo de células endoteliais tÍmicas (tEnd.1) e linfócitos. As fotomicrografias mostram a adesão dos linfócitos às tEnd.1. (A) As fotos foram obtidas através de microscopia óptica no momento em que os linfócitos foram adicionados às monoculturas de células endoteliais (tEnd.1). (B) Após 1 hora de adesão, os linfócitos que aderiram foram corados e fotografados através de microscopia óptica. (C e D) Através de microscopia eletrônica de varredura verificou-se que adesão entre as células endoteliais e os linfócitos ocorre pelo contato entre as membranas celulares destas células. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

Figura 15. Efeito do IGF-1 na adesão linfócitos/ células endoteliais.



Os gráficos mostram o número absoluto de linfócitos totais e em cada subpopulação. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste *t student*, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.6 Análise da expressão da integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) após a adesão linfócitos/ células endoteliais.

Após verificar que o tratamento com o IGF-1 diminuiu a adesão entre linfócitos e células endoteliais, fomos investigar o percentual de linfócitos que expressavam a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), visto que esta integrina é fundamental para o evento de adesão e transmigração, pois liga-se ao receptor VCAM-1 presente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos.

Conforme observado na tabela 2, após os ensaios de adesão *in vitro* na presença de IGF-1, não ocorreu alteração na expressão do receptor VLA-4 nas subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e linfócitos B. Além disso, verificamos a intensidade média de fluorescência do VLA-4 nas subpopulações de linfócitos, porém

não foram observadas alterações estatisticamente significativas em nenhuma das subpopulações.

Tabela 2. Expressão de VLA-4 pelas subpopulações de linfócitos após os ensaios de adesão.

	Percentual de expressão de VLA-4		Intensidade média de fluorescência	
	CTR	IGF-1	CTR	IGF-1
Linfócitos T CD4 ⁺	99,13 ± 0,75	99,49 ± 0,02	28,56 ± 0,74	27,40 ± 1,57
Linfócitos T CD8 ⁺	99,79 ± 0,20	99,85 ± 0,03	28,59 ± 1,46	29,80 ± 1,61
Linfócitos B	99,35 ± 0,64	99,99 ± 0,00	75,23 ± 0,44	76,58 ± 2,26

Os valores representam a porcentagem e intensidade média de fluorescência do receptor VLA-4 na superfície celular das subpopulações de linfócitos após os ensaios de adesão. Os dados estão representados pela média ± erro padrão da média de dois experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste *t Student*. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

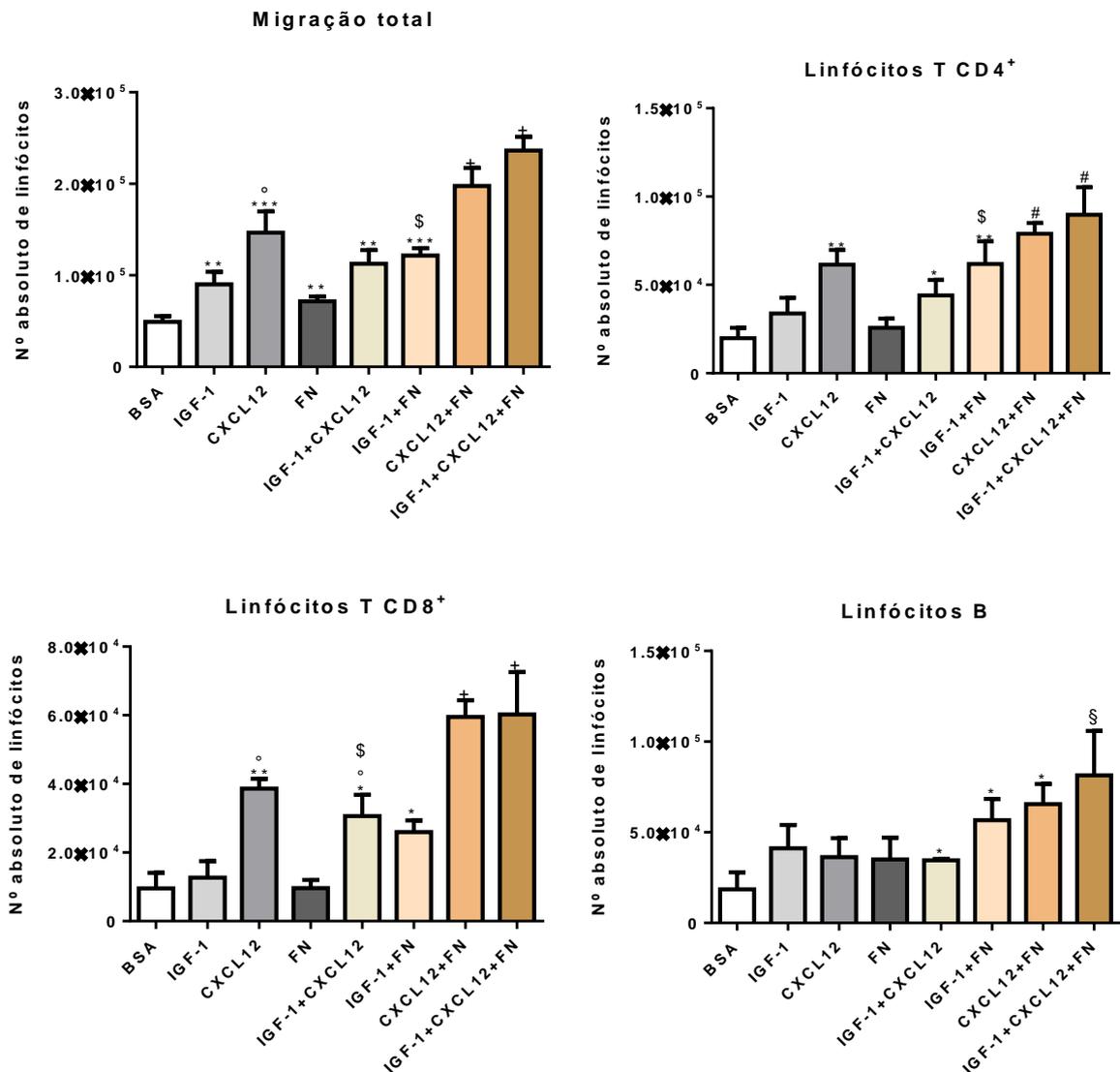
5.7 Análise do efeito quimiotático do IGF-1 e/ou CXCL12 na migração de linfócitos periféricos.

Para analisar o efeito quimiotático do IGF-1 e da quimiocina CXCL12 na migração de linfócitos, foi utilizado o sistema de *transwell* com IGF-1 e/ou CXCL12 como fatores quimioatraentes e com as membranas revestidas ou não com fibronectina (FN). Após 3 horas de migração, os linfócitos migrantes foram recolhidos, contados, marcados com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo.

No que se refere a migração de linfócitos totais, observou-se que ocorreu um aumento no número absoluto de linfócitos migrantes na presença do IGF-1 e/ou quimiocina CXCL12 isolados ou em combinação com a FN. Ainda, o aumento no número de linfócitos migrantes foi evidenciado principalmente no grupo IGF-1/CXCL12/FN (Figura 16A). Quando observou-se as subpopulações isoladamente, verificou-se que na subpopulação de linfócitos T CD4⁺, ocorreu um aumento significativo no número absoluto de linfócitos migrantes nos grupos CXCL12, IGF-1+CXCL12, IGF-1+FN, CXCL12+FN e IGF-1+CXCL12+FN (Figura 16B). Em relação aos linfócitos T CD8⁺, verificou-se que houve um aumento significativo nos grupos com a presença da quimiocina CXCL12 isolada ou em combinação com IGF-1 e/ou

FN. Também foi notado um aumento na migração de células T CD8⁺ no grupo IGF-1+FN (Figura 16C). Por fim, na subpopulação de linfócitos B, observou-se que ocorreu um aumento significativo no número absoluto de linfócitos migrantes apenas nos grupos IGF-1+CXCL12, IGF-1+FN, CXCL12+FN e IGF-1+CXCL12+FN (Figura 16D).

Figura 16. Efeito quimiotático do IGF-1 e/ou CXCL12 na migração de linfócitos periféricos.



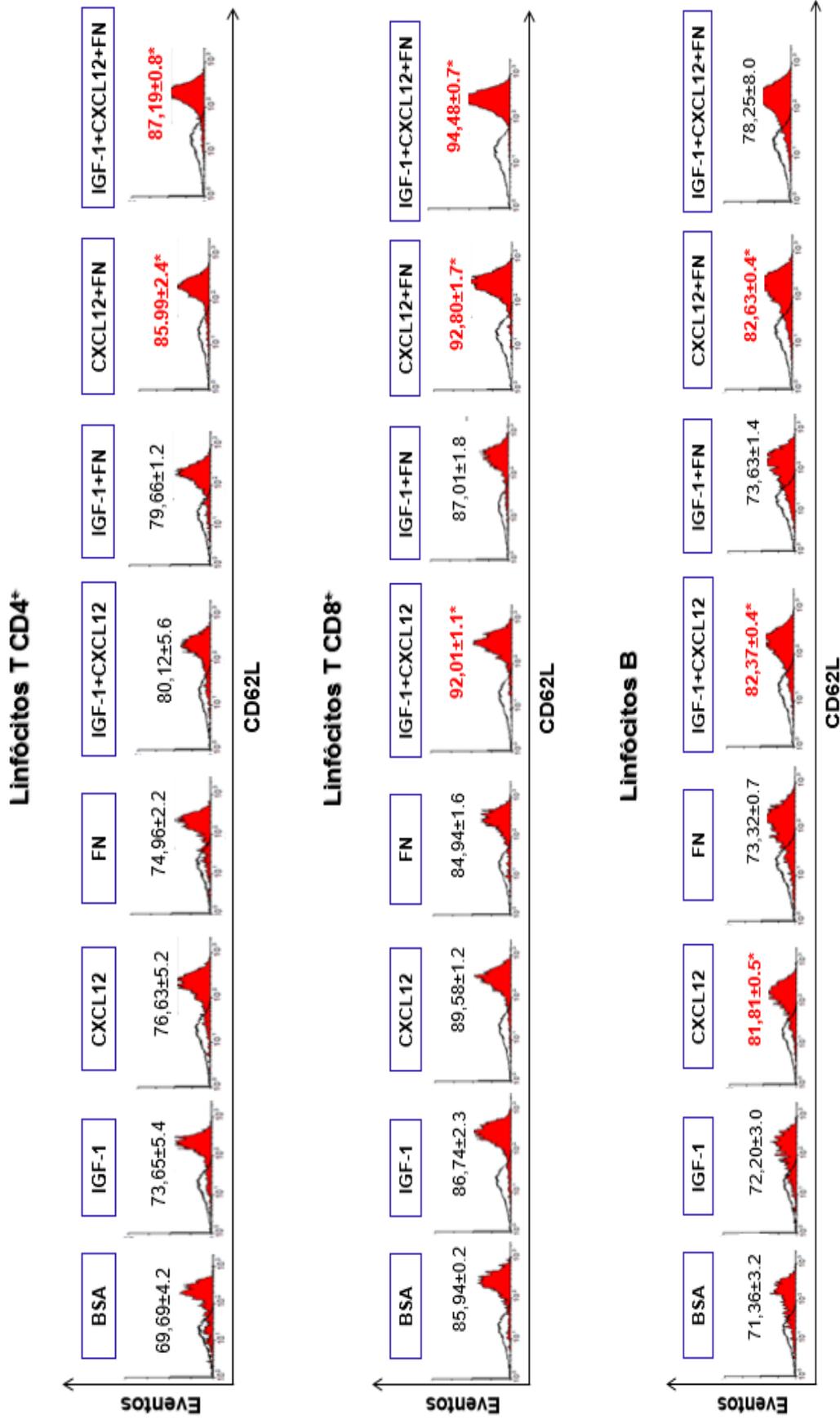
O número absoluto de linfócitos migrantes foi obtido após a análise por citometria de fluxo que demonstrou o número percentual de linfócitos que expressaram em sua membrana os co-receptores CD4, CD8 ou CD45R. Os gráficos mostram a média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita com o teste one-way ANOVA e teste *t student* * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (*), (**), (***) Valores estatisticamente significativos em relação ao grupo BSA; (°) valor estatisticamente significativo em relação ao grupo IGF-1; (\$) valor estatisticamente significativo em relação ao grupo FN; (#) valor estatisticamente significativo em relação aos grupos BSA, IGF-1, FN e IGF-1+CXCL12; (+) valor estatisticamente significativo em relação aos grupos BSA, IGF-1, CXCL12, FN, IGF-1+CXCL12 e IGF-1+FN; (\$) valor estatisticamente significativo em relação aos grupos BSA, CXCL12, FN e IGF-1+CXCL12. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.8 Efeito do IGF-1 e/ou CXCL12 na expressão do receptor CD62L na superfície de linfócitos após a migração.

Após 3 horas de migração *in vitro*, utilizando o sistema de *transwell*, os linfócitos migrantes foram recolhidos, contados e marcados com anticorpos específicos, para avaliar a expressão do receptor CD62L nas subpopulações celulares após a migração.

Como demonstrado na figura 17, verificou-se que na subpopulação de linfócitos T CD4⁺ ocorreu um aumento significativo no percentual de linfócitos que expressavam o receptor CD62L em sua superfície celular após a migração nos grupos CXCL12+FN e IGF-1+CXCL12+FN quando comparados ao grupo BSA. Na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ observou-se um aumento significativo no percentual de células que expressavam este receptor nos grupos IGF-1+CXCL12, CXCL12+FN e IGF-1+CXCL12+FN quando comparados ao grupo BSA. No que se refere a população de linfócitos B, verificou-se que o mesmo efeito foi mantido, ocorreu um aumento estatisticamente significativo no percentual de linfócitos que expressavam o CD62L nos grupos CXCL12, IGF-1+CXCL12 e CXCL12+FN quando comparados ao grupo BSA.

Figura 17. Expressão de CD62L na superfície de linfócitos após migração.



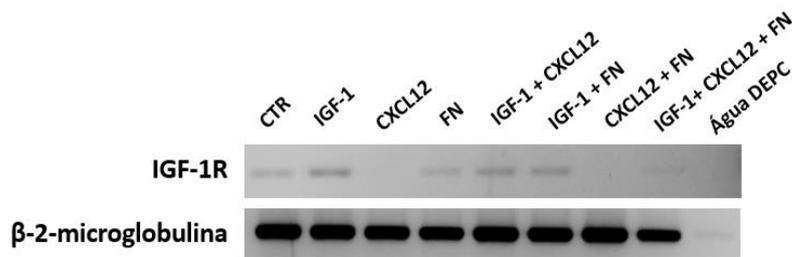
Histogramas representativos do percentual de cada subpopulação de linfócitos que expressaram em sua superfície o receptor CD62L após 3h de migração em câmaras de *transwell*. A expressão dos receptores foi obtida através da análise por citometria de fluxo, n=3. Os valores mostram a média ± desvio padrão da média. A análise estatística foi feita com o teste one-way ANOVA *p<0,05 em relação ao grupo BSA. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

5.9 Expressão gênica do IGF-1R em linfócitos após o tratamento com o IGF-1 e/ou CXCL12 na presença ou ausência de fibronectina.

Na análise do ensaio de migração, foi observado que a resposta migratória dos linfócitos na presença do estímulo com IGF-1 variou nos diferentes grupos de tratamento. Para entender melhor este efeito, foi investigada a expressão do gene para o receptor de IGF-1, o IGF-1R, em linfócitos utilizando a técnica de RT-PCR. Para isso, os linfócitos foram cultivados em placa de 96 poços com IGF-1 e/ou CXCL12 na presença ou ausência de fibronectina, durante 1 hora.

Como resultado, observou-se que os linfócitos expressam o gene IGF-1R. Nos grupos CTR, IGF-1, FN, IGF-1+CXCL12, IGF-1+FN e IGF-1+CXCL12+FN verificou-se a expressão do gene IGF-1R nos linfócitos. Entretanto, foi constatado que no grupo da quimiocina CXCL12 isolada e no grupo da quimiocinas associada com a fibronectina (CXCL12+FN) não ocorreu a expressão do gene IGF-1R pelos linfócitos (Figura 18).

Figura 18. Expressão gênica do IGF-1R em linfócitos.



Expressão de mRNA do IGF-1R foi mensurada por RT-PCR. A imagem representa a expressão relativa do IGF-1R em dois experimentos independentes. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

6 DISCUSSÃO

A manutenção das populações celulares em órgãos linfoides contribui para um sistema imunológico eficiente, capaz de recrutar células no combate aos antígenos. Em nosso estudo, inicialmente foi evidenciado por citometria de fluxo que nos linfonodos subcutâneos a população de linfócitos T é maior que a população de linfócitos B. Este dado corrobora com um estudo anterior que demonstrou um maior número de linfócitos T presente nos linfonodos (SMANIOTTO *et al.*, 2010).

A expressão de receptores na superfície das células é fundamental para desencadear as ações do seu ligante específico. Assim, a ação de IGF-1 é mediada pela expressão do IGF-1R. Por citometria de fluxo foi avaliada a expressão deste receptor de superfície celular e constatou-se que linfócitos expressavam o IGF-1R na superfície celular. Ainda, foi constatado que um maior percentual de linfócitos B expressavam o IGF-1R na sua superfície, quando comparado aos linfócitos T. Assim, podemos sugerir que, mesmo os linfócitos B estando em menor porcentagem na população celular, eles podem ser cruciais para responder a estímulos desencadeados pela presença do IGF-1. Já foi visto que, o IGF-1R tem uma expressão elevada em células tumorais, incluindo melanomas, câncer de cólon e pâncreas, podendo atuar na proliferação e apoptose (HELLAWELL *et al.*, 2002).

Vários processos celulares são modulados por diferentes moléculas e por interações das células com o microambiente onde elas encontram-se inseridas. As integrinas presentes na superfície celular medeiam as interações entre o ambiente extracelular e o citoesqueleto de actina, sendo importantes na regulação da migração celular e nas adesões celulares a MEC (HUMPHRIES *et al.*, 2006). Neste estudo, ocorreu uma variação no percentual de linfócitos que expressavam as integrinas VLA-4 e VLA-5, desde o momento em que os linfócitos foram obtidos dos animais e no decorrer do tempo em que as células permaneceram em cultura, principalmente a integrina VLA-5. Observou-se que, no momento em que os linfócitos são retirados dos animais, um baixo percentual de células expressou este receptor, porém quando as células permaneceram em cultura houve um aumento no percentual de linfócitos que expressou o VLA-5, fato este independente do tratamento utilizado. Interessantemente VIELKIND e colaboradores (2005), demonstraram que integrinas têm baixa atividade nas células em repouso, mas podem ser estimuladas para mediar a adesão e migração em resposta a quimiocinas e citocinas.

Quando os linfócitos foram submetidos aos diferentes tratamentos com IGF-1 e/ou CXCL12 observou-se alterações na expressão da integrina VLA-5 nas populações de linfócitos no decorrer do tempo. Observou-se que o tratamento com CXCL12, diminuiu a expressão de VLA-5 em linfócitos B, porém o tratamento com IGF-1+CXCL12 foi capaz de aumentar o percentual de linfócitos B que expressavam o VLA-5. A expressão de uma integrina pode variar dependendo do estímulo que uma determinada célula recebe do microambiente no qual ela está presente. Ainda, foi mostrado que um alto percentual de linfócitos expressaram a integrina VLA-4 em sua superfície celular. Porém, o IGF-1 e/ou CXCL12 não foram capazes de alterar a expressão desta integrina na superfície das diferentes populações de linfócitos. Em conjunto, os resultados mostram que os receptores de MEC, as integrinas VLA-4 e VLA-5, estão presentes na membrana dos linfócitos, e que a porcentagem de linfócitos que expressam estes receptores pode ser alterada quando cultivados *in vitro* e na presença de diferentes fatores que causam oscilações no meio em que a célula se encontra.

Neste trabalho foi demonstrado que o receptor CXCR4 está presente na superfície celular nas populações de linfócitos, porém não foram observadas alterações na expressão deste receptor na presença de IGF-1 e/ou CXCL12. SUZUKI e colaboradores (2001), demonstraram que o receptor CXCR4, é expresso pelas subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺, e que a sinalização através do CXCR4 resulta na adesão das células T em células endoteliais e induz a quimiotaxia das subpopulações de linfócitos T. Em relação aos linfócitos B, foi observado que apenas um baixo percentual de células expressavam este receptor em sua superfície celular. Notou-se também, que quando estas células são mantidas em cultura em associação com o IGF-1 e/ou CXCL12 ocorre uma oscilação na expressão do CXCR4. Estes dados corroboram com a literatura, pois já foi observado que a quimiocina CXCL12 *in vitro* induz a expressão do receptor CXCR4 em linfócitos B, induzindo a migração destas células *in vitro* (STEWART-HUTCHINSON et. al., 2017).

Os dados obtidos neste estudo sobre a adesão de linfócitos e células endoteliais mostraram que o IGF-1 causou uma diminuição na adesão entre linfócitos e células endoteliais após 1 hora em co-cultura. Observamos também, que após a adesão não houveram alterações significativas na expressão da integrina VLA-4 nas subpopulações de linfócitos na presença de IGF-1. Entretanto, verificou-se que um

alto percentual de linfócitos expressavam está integrina, demonstrando que o IGF-1 pode modular positivamente a expressão de VLA-4 em linfócitos.

O processo de adesão é um evento complexo e crucial para a vigilância imunológica, sendo este mediado por ligantes e receptores de MEC, além de hormônios e citocinas. É sabido que estas moléculas podem modular positivamente ou negativamente o processo de adesão, dependendo do seu estado de ativação e interação com as células. No entanto, para que o processo de adesão ocorra é necessário que as células endoteliais expressem em sua superfície o receptor VCAM-1, principal ligante para o VLA-4. Diante disso, faz-se necessário estudos futuros sobre a expressão do VCAM-1 nas células endoteliais em nosso modelo experimental para o melhor entendimento dos resultados obtidos em nosso estudo.

Sabe-se que o endotélio tem um papel-chave na resposta inflamatória, pois atua modulando as interações de células inflamatórias com as células endoteliais presentes na parede dos vasos sanguíneos. As células endoteliais regulam a migração de leucócitos e o fluxo sanguíneo através da síntese e mediadores, como o óxido nítrico (NO) (SUMPIO et al.; 2002; DEANFIELD et al., 2007; AIRD, 2012). ABBAS e colaboradores (2011), observaram que a redução da expressão do IGF-1R aumenta a sensibilidade à insulina e a biodisponibilidade de óxido nítrico no endotélio. Já foi visto, que a alta expressão de IGF-1R no endotélio melhora a regeneração endotelial da artéria femoral de camundongos, além de aumentar a migração de células endoteliais pulmonares *in vitro* (IMRIE et al., 2012). É conhecido que a estimulação da adesão celular por prolactina ocorre devido a ativação das integrinas LFA-1 e VLA-4, importantes moléculas que medeiam a interação de leucócitos com o endotélio vascular (MONTES DE OCA P. et al., 2005). Este estudo corrobora com o nosso trabalho, pois demonstra que assim como o IGF-1, outro hormônio pode agir sobre células do sistema imunológico e modulando positivamente alguns eventos celulares, como a adesão e expressão de receptores.

O ensaio de migração em sistema de *transwell* demonstrou o efeito quimiotático do IGF-1 e da quimiocina CXCL12, na presença ou ausência de FN, sobre a migração das subpopulações de linfócitos. Neste estudo foi demonstrado que o IGF-1 e a quimiocina CXCL12 podem atuar na quimiotaxia de linfócitos. Adicionalmente, verificamos que ocorre um sinergismo entre o IGF-1 e /ou CXCL12 em combinação com a FN, na estimulação da migração de linfócitos *in vitro*.

Em estudos *in vitro*, evidenciou-se que o tratamento com IGF-1 aumenta a proliferação de linhagens celulares de glioblastoma multiforme. Além disso, o IGF-1 na concentração de 100 ng/mL, aumentou a migração destas células em um ensaio de migração em câmara de *Boyden* (SCHLENSKA-LANGE, et al., 2008). Este estudo mostra que a concentração de IGF-1 utilizada em nosso trabalho para estimular a migração de linfócitos em câmaras de *transwell*, também foi capaz de modular a migração de células tumorais em outro modelo experimental.

Outro estudo de migração *in vitro* demonstrou que o IGF-1 foi um potente quimioatraente para células-tronco mesenquerais derivadas de medula óssea, quando comparado a outros fatores de crescimento e quimiocinas (LOPEZ PONTES et al., 2007). Ainda, segundo THUM e colaboradores (2007), em ensaios de migração em câmara de *Boyden*, o IGF-1 foi capaz de aumentar a capacidade migratória de células endoteliais progenitoras humanas e murinas quando comparado ao controle. Sabe-se que durante a migração é necessário a reorganização do citoesqueleto, e este fenômeno pode acontecer pela ativação de vias de sinalização intracelulares, na presença de IGF-1. SPAZIANI e colaboradores (2014), demonstraram que doses elevadas de IGF-1 podem estimular *in vivo* a reorganização do citoesqueleto mediado pelo aumento de proteínas STAT-1, como também aumentar a produção de citocinas, indicando uma resposta imune e inflamatória, o que pode promover a migração transendotelial de linfócitos.

A migração celular promovida por quimiocinas é fundamental para hematopoiese, vigilância imunológica e angiogênese. Uma propriedade funcional das quimiocinas é a sua capacidade de controlar rapidamente a adesão firme de leucócitos, que regula a migração destas células até os locais de inflamação (RANSOHOFF, 2009).

Dados obtidos neste estudo demonstraram que o IGF-1 e a quimiocina CXCL12/SDF-1 α são quimioatraente para as diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Interessante, foi observado que os linfócitos B também são responsivos a quimiotaxia exercida por estes fatores quimiotáticos. Adicionalmente, verificamos que a ação quimiotática do IGF e da quimiocina CXCL12 foi potencializada na presença de fibronectina. Nos grupos onde o contato da CXCL12 com a fibronectina melhorou a resposta migratória de linfócitos, podemos inferir que ocorre uma eficiência na expressão e ativação de receptores que modulam o evento de

migração, em microambientes enriquecidos com moléculas de matriz extracelular. Estes resultados indicam que dentro dos órgãos linfoides, os linfócitos T e B devem migrar de maneira orquestrada e direcional considerando a concentração de quimiocinas e a presença de uma rede de matriz extracelular.

Nossos dados corroboram com estudos anteriores, que mostraram que em camundongos transgênicos para o hormônio do crescimento (GH), ocorre um aumento na migração de linfócitos nos órgãos linfoides secundários, na presença de laminina ou fibronectina, em combinação com a quimiocina CXCL12/SDF-1 α (SMANIOTTO et al., 2010). Adicionalmente, verificou-se um aumento na migração de linfócitos T de linfonodos mesentéricos em camundongos transgênicos para o GH, desencadeada pela quimiocina CXCL12 em combinação com a fibronectina, quando comparado com camundongos controle (SAVINO et al., 2012).

SEBASTIANI e colaboradores (2001), demonstraram o comportamento migratório dos subtipos de linfócitos T CD4⁺ de sangue de pacientes com dermatite de contato alérgica ao níquel, em câmaras de *transwell*, em resposta a diferentes quimiocinas por 1 hora. Foi visto, que os linfócitos possuem uma capacidade de migrar em resposta a uma ampla variedade de estímulos quimiotáticos, incluindo a quimiocina SDF-1 α . Além disso, foi demonstrado que o CXCR4 estava presente na superfície destas células e que sua expressão não foi modificada após sua ativação. Estes dados corroboram com nosso estudo, pois neste trabalho demonstramos que o IGF-1 não modificou a expressão do CXCR4. Entretanto, a migração de linfócitos foi aumentada na presença da CXCL12.

STEWART-HUTCHINSON e colaboradores (2017), observaram que em um modelo de transmigração *in vitro*, na presença da quimiocina CXCL12 houve um aumento na transmigração de linfócitos B através da monocamada de células endoteliais da pele. Ainda, verificaram que ocorreu um aumento na expressão de VCAM-1 e VLA-4, nas células endoteliais e linfócitos B, respectivamente.

Sabendo da importância do receptor CD62L para o processo de migração linfocitária em linfonodos, inicialmente, observou-se que nos linfócitos frescos um grande percentual de células expressavam em sua superfície o receptor CD62L. Constatou-se, que o receptor CD62L está presente em todas as subpopulações de linfócitos (93,5%) linfócitos T CD4⁺, (97,8%) linfócitos T CD8⁺ e (97,4%) linfócitos B. Porém, quando estas células permaneceram em cultura na presença de IGF-1 e/ou

CXCL12 por 1 hora apenas na população de linfócitos B ocorreu uma diminuição significativa no percentual de células que expressavam este receptor em sua superfície celular. Ainda, foi avaliada a expressão deste receptor após o ensaio de migração em *transwell*. Como resultado, observou-se que nas subpopulações de linfócitos ocorreu uma alta expressão deste receptor após 3 horas de migração. Interessante, nos grupos em que o IGF-1 e/ou CXCL12 estão em combinação com a fibronectina a expressão do CD62L é ainda maior, comparando-se com o percentual obtido no momento em que estas células são retiradas dos camundongos. Podemos inferir, que ocorreu uma regulação positiva na expressão do CD62L na superfície de linfócitos durante o ensaio de migração. Esta alta expressão do CD62L pode ter sido um fator crucial para o direcionamento da migração em direção às substâncias quimioatraentes utilizadas neste estudo, sendo assim, o CD62L pode ter modulado positivamente a taxa de migração de linfócitos *in vitro* em resposta a concentração de IGF-1 e/ou CXCL12 em combinação com a fibronectina.

É conhecido que camundongos deficientes para CD62L apresentam uma redução no número de linfócitos em seus linfonodos (ARBONES et al., 1994). Além disso, pacientes idosos infectados pelo HIV apresentam uma queda no número de linfócitos T CD4⁺CD8⁻ recém saídos do timo (DOUEK et al., 1998) e também um decréscimo na expressão de CD62L em linfócitos T virgens (DE MARTINI et al., 2000). SMANIOTTO e colaboradores (2004), verificaram que o percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressavam CD62L em linfonodos subcutâneos e mesentéricos foi maior em camundongos tratados com GH quando comparado ao grupo controle. Sugerindo que o tratamento com GH favorece a entrada de células T CD4⁺ em órgãos linfoides periféricos, através da regulação positiva da expressão de CD62L na superfície celular destas células imunológicas. O GH e o IGF-1 possuem efeitos biológicos semelhantes, que podem influenciar no desenvolvimento de diversos tipos celulares. Portanto, esses dados mostram que tanto o GH como o IGF-1 são capazes de modular a expressão do CD62L antes e após o processo de migração *in vitro*, e que a expressão deste receptor é fundamental para o direcionamento do fluxo migratório em linfócitos.

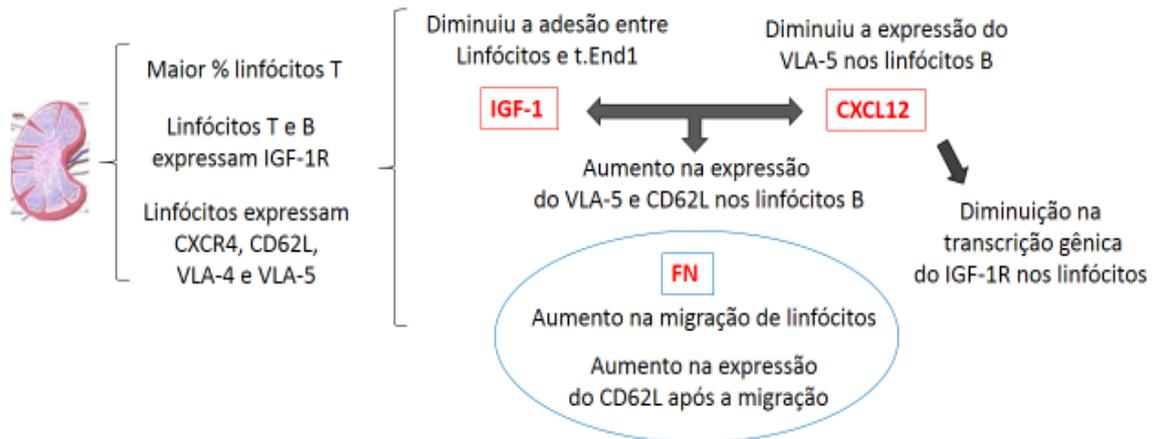
Buscando entender melhor os resultados obtidos em nosso ensaio de migração, analisamos a transcrição gênica o receptor de IGF-1, o IGF-1R, em linfócitos. Pois, este receptor é crucial para que as células possam responder ao

estímulo migratório pelo IGF-1. Como resultado, observou-se que ocorreu uma oscilação na expressão gênica do IGF-1R nos linfócitos nos diferentes grupos. Nos dados obtidos, foi constatado que a quimiocina CXCL12, regulou negativamente a transcrição gênica do IGF-1R nos linfócitos. Fato este, observado nos grupos CXCL12 e CXCL12+FN. Entretanto, nos grupos em que foi feito o estímulo com a CXCL12, mas o IGF-1 estava presente, observou-se uma regulação positiva na transcrição gênica do IGF-1R. Ainda, notou-se que a presença do IGF-1 fez com que os linfócitos expressassem o IGF-1R, mesmo na presença da quimiocina. Este resultado é bastante interessante, pois demonstra que a transcrição gênica pode ser modulada por diferentes moléculas. Porém, não encontramos estudos que demonstrassem a relação da quimiocina CXCL12 na expressão gênica do IGF-1R. Sendo este resultado, um novo dado na literatura, que precisa ser melhor estudado para que se possa entender quais são os mecanismos que controlam estes eventos de transcrição gênica do IGF-1R em linfócitos.

BENEIT e colaboradores (2016), observaram que *in vitro* a inibição de IGF-IR reduz fortemente a migração de células musculares lisas vasculares humanas (CMLVH), entretanto na presença do IGF-1 ocorreu um aumento elevado na expressão gênica de IGF-IR, estimulando um aumento migratório das CMLVH de pacientes com aterosclerose.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o IGF-1 e a CXCL12 podem ser importantes moduladores no *homing* de linfócitos, pois exercem uma ação direta sobre a migração celular. No entanto, seus efeitos podem ser potencializados na presença de moléculas de matriz extracelular, como a fibronectina. Além disso, o IGF1 e/ou CXCL12 são capazes de atuar sobre a expressão de receptores de superfície celular que são importantes para vários eventos celulares, como a adesão e migração.

Figura 19. Representação esquemática dos resultados



Esquema representando os resultados obtidos durante o estudo. (Fonte: elaborada pela autora, 2017).

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que a quimiotaxia exercida pelo IGF-1 e pela quimiocina CXCL12 sobre linfócitos é potencializada na presença de fibronectina. Este aumento na migração de linfócitos na presença de IGF-1 e/ou CXCL12 em combinação com a fibronectina pode ser positivamente correlacionado com a expressão aumentada do receptor CD62L na superfície dos linfócitos, bem como os receptores de fibronectina, em particular o VLA-5, podendo ser importantes moduladores no direcionamento da resposta migratória em linfócitos.

Além de sugerir, que quimiocina CXCL12 pode estar atuando na diminuição da transcrição gênica do IGF-1R, o que pode ocasionar uma diminuição na migratória dos linfócitos em resposta ao IGF-1.

REFERÊNCIAS

ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 6.ed., Rio de Janeiro. [Tradução Reali C. e outros], 2008.

ABBAS A., IMRIE H., VISWAMBHARAN H. The insulin-like growth factor-1 receptor is a negative regulator of nitric oxide bioavailability and insulin sensitivity in the endothelium. *Diabetes*, v.60, p. 2169–2178, 2011.

AIRD W.C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Vol. 2, 2012.

ALEXANDER S.P.H., MATHIE A., PETERS J.A. Guide to Receptors and Channels (GRAC). *Br J Pharmacol.*, v.164 (Suppl. 1): S1–S324, 2011.

ARBONES et al.. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, v.1, p. 247-260, 1994.

BENEIT et al.. Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol.*, v.15, p.161, 2016.

BERNABEI et al.. IGF-1 down-regulates IFN- γ R2 chain surface expression and desensitizes IFN- γ /STAT-1 signaling in human T lymphocytes. *Immunobiology*, v. 102, p. 2933-2939, 2003.

CAMARA N. O., LEPIQUE A. P., BASSO A. S. Lymphocyte Differentiation and Effector Functions. *Clin. Dev. Immunology*, v. 2012, p 510603, 2012.

CAHALAN M.D., PARKER L. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. *Annu. Rev Immunol.*, v. 26, p. 585-626, 2008.

CHANG J.E., TURLEY S.J. Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends in Immunology*, v. 36, p 1, 2015.

CHEN et al.. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I/IGF-Binding Protein-3 Complex: Therapeutic Efficacy and Mechanism of Protection against Type 1 Diabetes. *Endocrinology*, v. 145(2), p. 627– 638, 2004.

CHU et al.. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood*, v. 112, p.2836-2846, 2008.

CLEMMONS D.R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Vol. 8. No. 1, p. 45-62, 1997.

DAR A., KOLLET O., LAPIDOT T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp. Hematol.*, v. 34, p. 967–975, 2006.

DAVIDSON L.A., KELLER R., DeSIMONE D.W. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.*, v. 231, p. 888 –895, 2004.

DEANFIELD J.E., HALCOX J.P., RABELINK T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, v. 115, p. 1285–1295, 2007.

De MARTINS et al.. CD50 and CD62L adhesion receptor expression on naive (CD45RA+) and memory (CD45RO+) T lymphocytes in the elderly. *Pathobiology*, v. 68, p. 245-250, 2000.

DENLEY et al.. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 16, p. 421-439, 2005.

DE MELLO-COELHO et al.. Functional insulin-like growth factor-1/ insulin-like growth factor-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. *Neuroendocrinology*, v. 75, p. 139-150, 2002.

DENUCCI C.C., MITCHELL J.S., SHIMIZU Y. Integrin function in T cell homing to lymphoid and non-lymphoid sites: getting there and staying there. *Crit Rev Immunol.*, v. 29(2), p. 87–109, 2009.

DONG F., REN J. Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in nephrotic syndrome children on glucocorticoid. *Pharmacological Research*, v. 48, p. 319–323, 2003.

DOUEK et al.. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, v. 396, p. 690-695, 1998.

DUAN C., XU Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*, v. 142, p. 44–52, 2005.

GIRARD J., SPRINGER T.A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Imunology Today* , v. 16, p. 449-457, 1995.

GRIFFITH J.W., SOKOL C. L., LUSTER A. D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual of Review Immunology*, v. 32, p. 659–702, 2014.

GORFU et al.. Laminin isoforms of lymph nodes and predominant role of 5- laminin(s) in adhesion and migration of blood lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v.84, 2008.

HELLAWELL et al.. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Research*, v. 62, p. 2942–2950, 2002.

HUMPHRIES J. D., BYRON A., HUMPHRIES M. J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.*, v. 119, p. 3901-3903, 2006.

HYNES R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v.110, p. 673–687, 2002.

HYNES R. O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell Press*, v. 69, p. 1-25, 1992.

IMRIE et al.. Novel Role of the IGF-1 Receptor in Endothelial Function and Repair. Studies in Endothelium-targeted IGF-1R receptor Transgenic mice. *Diabetes*, v.61, 2012.

JONES J.I., CLEMMONS D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinology Review*, v. 16, p.3-34, 1995.

KAWASHIMA H. Roles of Sulfated Glycans in Lymphocyte Homing. *Biol. Pharm. Bull.* v. 29(12), p. 2343—2349, 2006..

KRUGER K., MOOREN F.C. T cell homing and exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* v. 13, p. 37-54, 2007.

KUFAREVA I., SALANGA C.L., HANDEL T.M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. Cell Biol.*, v. 93, p. 372–83, 2015.

LABAT-ROBERT J. Cell–Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathologie Biologie*, v. 60, p. 15–19, 2012.

LAFOUTESSE et al.. L-selectin controls trafficking of chronic lymphocytic leukemia cells in lymph node high endothelial venules in vivo. *Blood*, Volume 126, p. 11, 2015.

HAO et al.. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Letters*, vol. 253, no. 1, pp. 34–42, 2007.

LAU et al.. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *Journal Biol Chem.*, v. 279, p. 22294–22305, 2004.

LIAO et al.. The EIIIA Segment of Fibronectin Is a Ligand for Integrins $\alpha 9$ and $\alpha 4$ Providing a Novel Mechanism for Regulating Cell Adhesion by Alternative Splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 14467–14474, 2002.

LIMA, F. A., CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. *Pediatria*, v. 29, p. 33-42, 2007.

LOPEZ PONTES A., et al.. The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells Express*, 2007.

LUSTER A. D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, v. 338, p. 436–445, 1998.

MARQUEZ-CURTIS et al.. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures. *Br J Haematol.*, v. 115, p. 595–604, 2001.

MASOPUST D., SCHENKEL J.M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, p. 309-320, 2013.

MONTES DE OCA et al.. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Laboratory Investigation*, v. 85, p. 633–642, 2005.

MUNOZ M. A., BIRO M., WENINGER W. T cell migration in intact lymph nodes *in vivo*. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 30, p. 17–24, 2014.

MURPHY K., TRAVERS P., WALPORT M. *Imunobiologia de Janeway*. Artmed, 7. Ed., Porto Alegre. [Tradução Ana Paula L. e outros], 2010.

NAALDIJK et al.. Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging. *Experimental Cell Research*, v. 338, p. 97–104, 2015.

NI et al.. IGF-1 promotes the development and cytotoxic activity of human NK cells. *Nature Communications*, v. 4, p. 1479, 2013.

OBERLIN D., FELLBAUM C., EPPLER E. Insulin-like growth factor I messenger RNA and protein are expressed in the human lymph node and distinctly confined to subtypes of macrophages, antigen-presenting cells, lymphocytes and endothelial cells. *Immunology*, v. 128, p. 342–350, 2009.

PANKOV R., YAMADA K.M. Fibronectin at a glance, *Journal Cell Scin.*, v. 115, p. 3861–3863, 2002.

PAWIG L., KLASSEN C., WEBER C., BERNHAGEN J., NOELS H. Diversity and interconnections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 429, 2015.

PROUDFOOT et al.. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the *in vivo* activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 100, p. 1885–1890, 2003.

RANSOHOFF R. M. Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity*, v. 20;31(5), p. 711-21.

RATAJCZAK et al.. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia*, v. 18, p. 29–40, 2004.

RUDDLE N.H. Lymphatic vessels and tertiary lymphoid organs. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124(3), p. 953–959, 2014.

SAVINO et al.. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1261, p. 49-54, 2012.

SCHLENSKA-LANGE et al.. Cell Proliferation and Migration in Glioblastoma Multiforme Cell Lines are Influenced by Insulin-like Growth Factor I *In Vitro*. *Anticancer Research*, v. 28, p. 1055-1060, 2008.

SEBASTIANI et al.. Chemokine Receptor Expression and Function in CD41 T Lymphocytes with Regulatory Activity. *Journal of Immunology*, v. 166, p. 996-1002, 2001.

SHIMIZU Y., SHAW S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb*, v. 5, p. 2292–2299, 1991.

SMANIOTTO et al.. Growth Hormone Stimulates the Selective Trafficking of Thymic CD4+CD8– Emigrants to Peripheral Lymphoid Organs. *Neuroimmunomodulation*, v. 11, p. 299–306, 2004.

SMANIOTTO et al.. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain Behav Immun.*, v. 24(3), p. 451-456, 2010.

SMITH T. Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases? *Pharmacol Ver.*, v. 62, p. 199 –236, 2010.

SPAZIANI et al.. Insuline-like growth factor-1 receptor signaling induced by supraphysiological doses of IGF-1 in human peripheral blood lymphocytes. *Proteomics*, v. 14(13-14), p. 1623-1629, 2014.

STEWART-HUTCHINSON et al., Technical Advance: new in vitro method for assaying the migration of primary B cells using an endothelial monolayer as substrate. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 102, 2017.

SUMPIO B.E., RILEY J.T., DARDIK A. Cells in focus: endothelial cell. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, p. 1508–1512, 2002.

SUN et al.. Skeletal localization and neutralization of the SDF- 1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J. Bone Miner.*, v. 20, p. 318–329, 2005.

SUZUKI Y., RAHMAN M., MITSUYA H. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *Journal Immunology*, v. 167, p. 3064–3073, 2001.

TAKEDA A., SASAKI N., MIYASAKA M. The molecular cues regulating immune cell trafficking. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B Phys. Biol. Sci.*, v. 93(4), p. 183-195, 2017.

TANAKA et al.. Molecular Determinants Controlling Homeostatic Recirculation and Tissue-Specific Trafficking of Lymphocytes. *Allergy Immunol.*, v. 134, p. 120–134, 2004.

TASHIRO et al.. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, v. 261(5121), p. 600-3, 1993.

THEOCHARIS et al.. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 97, p. 4 –27, 2016.

HUM et al.. Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, v. 92, p. 4172–4179, 2007.

VAKONAKIS, L., CAMPBELL, I. D. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 19, p. 578-583, 2007.

VANDERCAPPELLEN J., VAN DAMME J., STRUYF S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer. Lett.*, v. 267, p. 226–244, 2008.

VIANA et al.. Combined effect of insulin-like growth factor-1 and CC chemokine ligand 2 on angiogenic events in endothelial cells. *Plos One*, v. 1;10(4), 2015.

VINCENT A. M., FELDMAN E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research*, v. 12, p. 193–197, 2002.

VIELKIND et al.. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J Immunol.*, v. 175, p. 350-357, 2005.

VIOLA A., LUSTER A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, v. 48, p. 171–197, 2008.

WALSH P. T., SMITH L. M., O'CONNOR R. Insulin-like growth factor-1 activates Akt and Jun N-terminal kinases (JNKs) in promoting the survival of T lymphocytes. *Immunology*, v. 107, p. 461-471, 2002.

WILLARD-MACK C.L. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicologic Pathology*, v. 34, p.409–424, 2006.

XIA et al.. Fibronectin 1 promotes migration and invasion of papillary thyroid cancer and predicts papillary thyroid cancer lymph node metastasis. *OncoTargets and Therapy*, v. 10, p. 1743–1755, 2017.

ZANTE A., ROSEN S. Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, Volume 31, 2013.

ZUMKELLER W., BURDACH S. The Insulin-Like Growth Factor System in Normal and Malignant Hematopoietic cells. *Blood*, v. 94, p. 3653-3657, 1999.