



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

**INFLUÊNCIA *IN VITRO* DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO
SEMELHANTE A INSULINA SOBRE AS MOLÉCULAS
ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T**

Larissa Fernanda de Araújo Vieira

Maceió – AL

2017



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

Larissa Fernanda de Araújo Vieira

**INFLUÊNCIA *IN VITRO* DO FATOR-1 DE CRESCIMENTO
SEMELHANTE A INSULINA SOBRE AS MOLÉCULAS
ENVOLVIDAS NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Salete Smaniotto

Maceió – AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

V665i Vieira, Larissa Fernanda de Araújo.
Influência *in vitro* do fator-1 de crescimento semelhante a insulina sobre as moléculas envolvidas na diferenciação de Linfócitos T / Larissa Fernanda de Araújo. – 2017.
86 f.: il.grafs.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Tese (Doutorado 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. 73-84.
Anexos: 85-86.

1. Linfócitos TCD4 – Diferenciação *in vitro*. 2. IGF-1. 3.ThPOK .
I. Título.

CDU: 612.438



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

Larissa Fernanda de Araújo Vieira

Influência in vitro do fator-1 de crescimento semelhante a insulina sobre moléculas envolvidas na diferenciação de linfócitos t.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 06 de abril de 2017.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Dea Maria Serra Villa Verde – (Fiocruz)

Prof. Dr. Énio José Bassi - (UFAL)

Prof.^a Dr.^a Maria Danielma dos Santos Reis – (UFAL)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (LBC/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

Dedico esta tese aos meus avós, *María de Lourdes e José Rodrigues*, maiores entusiastas e incentivadores dos meus sonhos acadêmicos, desde o princípio e até o último suspiro.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, O Maior entre todos os meus amigos, Aquele que sempre amparou a minha vida com uma imensa misericórdia. Obrigada Senhor, por tantas vezes me conduzir em Teus braços e me fazer enxergar que as pegadas que eu via na areia eram Suas!

A minha mãe *Tereza Araújo*, por sempre sonhar os meus sonhos, por me amar e apoiar sem limites.

Ao meu filho *Nickolas Sales*, por me apresentar a mais pura e gratuita forma de amar e por esperar pacientemente o término do doutorado para realizar o sonho de obter o título de irmão mais velho.

Ao meu grande amor, *Écio Matias*, por toda ajuda, críticas e sugestões ao longo dessa jornada. Por inúmeras vezes ter assumido o meu papel no nosso lar e ter compreendido as minhas ausências em momentos de experimentos, disciplinas e escrita da tese.

A minha orientadora, Prof^a *Salete Smaniotto*, iniciei no laboratório admirando-te como profissional, com o tempo passei a admirar-te ainda mais como ser humano, mulher e uma verdadeira líder. Seus ensinamentos vão muito além da pesquisa, perpassam os limites do LBC e acompanham-me nos diferentes momentos do meu dia. Obrigada por toda disponibilidade, paciência, respeito e carinho com que sempre me tratastes.

Ao meu grande amigo *Marvín Lins*, por toda disponibilidade e valiosa colaboração para execução desse trabalho. Ser humano maravilhoso, exemplo de amigo, homem e cristão.

As amigas *Návylla Candêia*, *Jeniffer Estevão* e *Clarice Agudo*, por serem minhas companheiras de pesquisa e de vida, por fazer meus dias mais felizes dentro e fora do LBC, pela amizade pura, sincera e para toda vida. Com certeza essa batalha foi mais suave por vocês estarem ao meu lado.

A toda *família* que compõe o *Laboratório de Biologia Celular*, por fazer do nosso local de trabalho um ambiente competente e produtivo, mas acima de tudo, harmonioso e fraterno.

Aos órgãos de fomento *CNPq*, *CAPES* e *FAPESP* pelo apoio financeiro.

RESUMO

O fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), além dos seus efeitos clássicos sobre a proliferação celular e o crescimento do organismo, possui ações pleiotrópicas sobre o sistema imune, particularmente, sobre o timo. No intuito de contribuir para este conhecimento, objetivou-se avaliar *in vitro* a influência do IGF-1 sobre moléculas envolvidas na diferenciação dos linfócitos T. Para o estudo foi utilizada a co-cultura entre células estromais tímicas (CETc) e timócitos, oriundos do timo de camundongos C57BL/6, com idade entre 4 a 6 semanas de ambos os sexos. Inicialmente, demonstrou-se os tipos celulares obtidos do estroma tímico, dos quais foram identificados majoritariamente as células epiteliais corticais e medulares, além de macrófagos, células dendríticas e fibroblastos. Na superfície destas células foi observada a expressão do MHC-I e MHC-II, assim como a expressão das integrinas VLA-4, VLA-5 e VLA-6. No modelo de co-cultura foi avaliada a viabilidade dos timócitos e verificou-se que 71% dos timócitos apresentavam-se viáveis. O tratamento com IGF-1 diminuiu a expressão de MHC-I e VLA-6 na superfície das CETc após co-cultura com os timócitos. Entretanto, o IGF-1 aumentou a expressão de MHC-II e VLA-5 na superfície dessas células quando comparada ao controle. Ainda, observou-se que o IGF-1 foi capaz de aumentar a deposição de fibronectina pelas CETc quando co-cultivadas com timócitos. No entanto, a deposição de laminina foi diminuída em CETc na presença de IGF-1. Em relação a expressão do receptor de IL-7 (IL-7R) em timócitos, o tratamento com IGF-1 aumentou a expressão deste receptor na população total e na subpopulação CD4⁺CD8⁻ simples-positiva. Contudo, esse mesmo tratamento diminuiu a expressão de IL-7R nas subpopulações CD4⁺CD8⁺ e CD4⁻CD8⁺. Quando avaliado o número percentual das subpopulações de timócitos após a co-cultura com as CETc, constatou-se que o IGF-1 foi capaz de aumentar o percentual de timócitos da subpopulação CD4⁺CD8⁻ simples-positiva. Por fim, foi verificado um aumento de 57,3% na expressão do gene *Zbtb7b*, envolvido na diferenciação dos timócitos CD4⁺CD8⁻, após tratamento com IGF-1 e uma diminuição de 23,5% na expressão do gene *Runx1*, envolvido na diferenciação dos timócitos CD4⁻CD8⁺. Em conjunto, os dados obtidos no estudo demonstram a participação do IGF-1 nas interações timócitos/estroma tímico, em especial na diferenciação *in vitro* de timócitos em linfócitos T CD4⁺CD8⁻, via fator de transcrição ThPOK.

Palavras-chaves: IGF-1. Diferenciação. Linfócitos T CD4. ThPOK.

ABSTRACT

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), in addition to its classic effects on cell proliferation and organism growth, has pleiotropic actions on the immune system, particularly on the thymus. In order to contribute to this knowledge, the objective was to evaluate the influence of IGF-1 on molecules involved in the differentiation of T lymphocytes in vitro. For the study, a co-culture with thymic stromal cells (CETc) and thymocytes, from the time of C57BL/6 mice, aged 4 to 6 weeks of both sexes. Initially, the cell types obtained from thymic stroma were demonstrated, which were identified mainly as cortical and medullary epithelial cells, as well as macrophages, dendritic cells and fibroblasts. The expression of MHC-I and MHC-II was observed on the surface of the cells, as well as the expression of the integrins VLA-4, VLA-5 and VLA-6. In the co-culture model, the viability of the thymocytes was evaluated and 71% of the thymocytes were found to be viable. Treatment with IGF-1 decreased MHC-I and VLA-6 expression on the CETc surface after co-culture with the thymocytes. However, MHC-II and VLA-5 expression increased on the cell surface as compared to the control. In addition, IGF-1 has been shown to be capable of enhancing a fibronectin deposition by CETc when co-cultured with thymocytes. However, a laminin deposition was decreased in CETc in the presence of IGF-1. Concerning IL-7 (IL-7R) receptor expression in thymocytes, treatment with IGF-1 increased expression of this receptor in the total population and in the CD4⁺CD8⁻ single-positive subpopulation. However, this treatment reduced IL-7R expression in the CD4⁺CD8⁺ and CD4⁻CD8⁺ subpopulations. We evaluated the percent number of thymocyte subpopulations after co-cultivation with CETc, it was found that IGF-1 was able to increase the percentage of thymocytes from CD4⁺ CD8⁻ single-positive subpopulation. Finally, IGF-1 treatment increased a 57.3% *Zbtb7b* gene expression, involved in the differentiation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes and decreased 23.5% *Runx1* gene expression, involved in differentiation of CD4⁻CD8⁺ thymocytes. Together, the data obtained in this study demonstrate the participation of IGF-1 in the thymocyte / thymic stroma interactions, especially in the in vitro differentiation of thymocytes in CD4SP T lymphocytes, via ThPOK transcription factor.

Keywords: IGF-1. Differentiation. CD4 T lymphocytes. ThPOK.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microambiente tímico	23
Figura 2 - Seleção positiva e negativa dos timócitos.....	28
Figura 3 - Diferenciação intratímica de linfócitos T e microambiente tímico	29
Figura 4 - Organização da matriz extracelular (MEC).....	34
Figura 5 - Eixo GH/IGF-1	36
Figura 6 - Células estromais tímicas.....	47
Figura 7 - Caracterização das células estromais tímicas.....	48
Figura 8 - Caracterização das células epiteliais tímicas	49
Figura 9 - Expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II na superfície das CETc	50
Figura 10 - Expressão dos receptores da matriz extracelular na superfície das CETc	Erro! Indicador não definido. 51
Figura 11 - Timócitos co-cultivados com células estromais tímicas	52
Figura 12 - Perfis citofluorimétricos representativos da viabilidade e apoptose dos timócitos em co-cultura com as CETc	52
Figura 13 - Efeito do IGF-1 sobre a expressão de MHC-I e MHC-II nas CETc.....	54
Figura 14 - Efeito do IGF-1 sobre a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 nas CETc	55
Figura 15 - Efeito do IGF-1 sobre a deposição das moléculas da matriz extracelular nas CETc após co-cultivo com linfócitos T	56
Figura 16 - Esquema representativo das subpopulações de timócitos para avaliar a expressão da integrinas nas análises de citometria de fluxo.....	57
Figura 17 - Efeito do IGF-1 na expressão da integrina VLA-5 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8	58
Figura 18 - Efeito do IGF-1 na expressão da integrina VLA-6 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8.....	59
Figura 19 - IGF-1 promove o aumento no número percentual de linfócitos CD4SP.....	62
Figura 20 - IGF-1 promove a diferenciação dos linfócitos CD4SP.....	63
Figura 21 - IGF-1 modula genes envolvidos na diferenciação dos linfócitos T.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para detecção de genes envolvidos na diferenciação dos linfócitos T no sistema de PCR.....	455
Tabela 2 - IGF-1 não altera a viabilidade e apoptose dos linfócitos T.....	53
Tabela 3 - Média de intensidade de fluorescência das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície de timócitos totais e nas subpopulações CD4/CD8 em co-cultura com CETc e tratamento com IGF-1.....	60
Tabela 4 - Expressão do receptor de IL-7 na superfície de linfócitos totais e nas subpopulações CD4/CD8 em co-cultura com CETc e tratamento com IGF-1.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: alofococianina (*allophycocyanin*)

BSA: albumina sérica bovina (*bovine serum albumine*)

BCL-2: Proteína -2 de linfoma de células B (*B-cell lymphoma protein 2*)

CD: marcadores de superfície celular (*clusters of differentiation*)

DN (CD4⁻CD8⁻): timócito duplo-negativo para as moléculas CD4 e CD8

DP (CD4⁺CD8⁺): timócito duplo-positivo para as moléculas CD4 e CD8

CD4SP (CD4⁺CD8⁻): timócito simples-positivo para a molécula CD4

CD8SP (CD4⁻CD8⁺): timócito simples-positivo para a molécula CD8

CEUA: comissão de ética no uso de animais

CET: célula estromal tímica

cTEC: célula epitelial tímica cortical (*cortical thymic epithelial cells*)

CTR: grupo controle

DC: células dendríticas (*dendritic cells*)

DLL1: Ligante Delta - like 1 (Delta-like protein 1)

DLL4: Ligante Delta - like 4 (Delta-like protein 4)

DN: duplo negativo

DP: duplo positivo

EpCAM: molécula de adesão de célula epiteliais (*epithelial cell adhesion molecule*)

FGF: fator de crescimentos de fibroblasto (*fibroblast growth factors*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

FN: fibronectina

FoxN1: *forkhead Box N1*

GAR: anticorpos de cabra contra coelho (*goat anti rabbit*)

GATA3: proteína 3 de ligação ao *Gata* (*gata-binding protein 3*)

GH: hormônio do crescimento (*growth hormone*)

HD: deficientes auxiliares (*helper-deficient*)

HE: hematoxilina e eosina

ICAM-1: molécula 1 de adesão (*intercellular Adhesion Molecule 1*)

IGF-1: fator-1 de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor 1*)

IGF-2: fator-2 de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor 2*)

IGF-1R: Receptor do fator-1 de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor 1 receptor*)

IGFBPs: proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor-binding protein*)

IR: receptor de insulina (*insulin receptor*)

IL: interleucina (*interleukin*)

LFA-1: antígeno 1 associado a função do linfócito (*lymphocyte function-associated antigen 1*)

LN: laminina

MAZR: *Myc-associated zinc finger-related factor*

MEC: matriz extracelular

MHC: complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*)

MHC-I: complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*) de classe I

MHC-II: complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*) de classe II

mTEC: célula epitelial tímica medular (*medullary thymic epithelial cells*)

NK: células natural *killer*

NOD: diabético não obeso (*non-obese diabetic*)

PBS: solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR: reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

PE: ficoeritrina (*phycoerythrin*)

PercP: proteína peridina de clorofila (*peridinin-chlorophyll-a-protein*)

PI: iodeto de propídeo (*propidium iodide*)

RAG: gene de ativação da recombinase (*recombination-activating genes*)

RGD: sequência arginina-glicina-ácido aspártico (*arginyl-glycyl-aspartic acid*)

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro (messenger *ribonucleic acid*)

RPMI: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento celular desenvolvida pelo Roswell Park Memorial Institute.

RUNX1: fator 1 de transcrição relacionado ao RUNT (*runt-related transcription factor 1*).

RUNX3: fator 3 de transcrição relacionado ao RUNT (*runt-related transcription factor 3*).

SBF: soro bovino fetal

TCR: receptor de células T (*T cell receptor*)

TECs: células epiteliais tímicas (*thymic epithelial cells*)

ThPOK: Fator de transcrição ThPOK (*T-helper inducing POZ-Kruppel fator*)

TNC: célula *nurse* tímica (*thymic nurse cell*)

VLA: antígeno de aparecimento tardio (*very late antigen*)

VLA-4: $\alpha 4\beta 1$ ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina

VLA-5: $\alpha 5\beta 1$ ou CD49e/CD29, receptor de fibronectina

VLA-6: $\alpha 6\beta 1$ ou CD49f/CD29, receptor de laminina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 Timo	21
3.1.1 Aspectos Gerais	21
3.1.2 Microambiente tímico.....	22
3.1.3 Diferenciação intratímica de linfócitos T $\alpha\beta$	26
3.1.4 Matriz extracelular tímica e integrinas.....	32
3.2 Fator -1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1)	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Animais	39
4.2 Cultura primária das Células Estromais Tímicas (CETc).....	39
4.3 Obtenção dos timócitos.....	40
4.4 Co-cultura das CETc e timócitos.....	40
4.5 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo.....	40
4.6 Imunomarcação.....	42
4.6.1 Imunofluorescência para citoqueratina 5 e 8	42
4.6.2 Imunofluorescência para fibronectina e laminina	42
4.7 Análise da viabilidade e apoptose celular	43
4.8 RT-PCR.....	44
4.9 Análise Estatística.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Caracterização do estroma tímico	47

5.2 Efeito do IGF-1 sobre viabilidade dos timócitos co-cultivados com CETc	51
5.3 Efeito do IGF-1 sobre a expressão de MHC em CETc co-cultivadas com timócitos	53
5.4 IGF-1 modula a expressão de receptores e a deposição de moléculas da matriz extracelular nas CETc co-cultivadas com timócitos	54
5.5 IGF-1 não modula a expressão das integrinas na superfície de timócitos	56
5.6 IGF-1 modula a expressão do receptor de IL-7 em linfócitos	60
5.7 Efeitos do IGF-1 nas subpopulações dos timócitos co-cultivados com CETc	61
5.8 IGF-1 promove a expressão de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dos linfócitos T	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	85
Anexo A: Comitê de Ética em pesquisa- processo nº 028370/2010-07.....	85
Anexo B: Comissão de Ética no Uso de Animais -projeto nº 14/2015.....	86

1. INTRODUÇÃO

O timo é um órgão linfóide primário onde os precursores de linfócitos T, derivados da medula óssea, sofrem um complexo processo de diferenciação e migração. Este processo é controlado pelo microambiente tímico, constituído por matriz extracelular (MEC) que atua em conjunto com uma rede tridimensional composta por tipos celulares distintos, definindo nichos intratímicos e proporcionando os sinais necessários para a migração direcionada e consequente maturação dos timócitos (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007). A diferenciação intratímica de linfócitos T parece resultar de várias interações moleculares envolvendo ligantes, receptores e fatores de transcrição sob um sistema multivetorial. Dentre os fatores de transcrição o ThPOK, GATA3 e RUNX estão envolvidos na diferenciação intratímica dos timócitos. Os linfócitos T CD4SP ($CD4^+CD8^-$) são restritos ao MHC II e exercem funções auxiliares, enquanto que os linfócitos T CD8SP ($CD4^-CD8^+$) são restritos ao MHC I e exercem funções citotóxicas. O fator de transcrição ThPOK tem sua regulação aumentada em timócitos restritos ao MHCII à medida que sofrem diferenciação para a linhagem CD4SP. Em contraste, os timócitos restritos ao MHCI apresentam uma regulação aumentada para o gene *Runx3*, durante a diferenciação para linhagem CD8SP (BELIZÁRIO et al, 2016). Ao terminarem seu processo de diferenciação, tais células migram para áreas de células-T dependentes dos órgãos linfóides periféricos (AHAMED; MADHIVADHANI, 2010; KURD, ROBEY, 2016).

Acredita-se que falhas no processo de migração e maturação dos timócitos possam levar ao aparecimento de deficiências na atividade imunológica e um desequilíbrio da homeostasia, favorecendo, portanto, o desenvolvimento e/ou a amplificação de diversas doenças, incluindo as infecciosas, autoimunes e câncer (SAVINO et al, 2004; HIROKAWA, UTSUYAMA, KIKUCHI, 2016).

Embora os mecanismos que direcionam essa migração ainda não estejam bem compreendidos, muitas evidências têm mostrado que o microambiente tímico, de maneira coletiva, influencia no processo de desenvolvimento de linfócitos T através de moléculas de adesão e elementos da matriz extracelular, como também através da secreção de polipeptídeos solúveis como citocinas e quimiocinas. Ao lado deste controle intrínseco, já está bem fundamentada a influência hormonal sobre as

funções do timo. Mais particularmente, evidências indicam que o hormônio do crescimento (GH) age sobre o microambiente e sobre o compartimento linfóide do órgão (SAVINO; DARDENNE, 2010). O GH é capaz de aumentar a produção de citocinas pelo timo, bem como a migração intratímica de timócitos e o exporte de linfócitos T maduros. Muitos dos efeitos do GH são mediados pelo fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (HIROKAWA, UTSUYAMA, KIKUCHI, 2016). Sabe-se que o IGF-1 promove a hematopoiese (ZUMKELLER; BURDACH, 1999), prolonga a sobrevivência dos linfócitos (WALSH; SMITH; O'CONNOR, 2002) e modula a sinalização dos linfócitos T (BERNABEI et al, 2003). Além disso, a administração de IGF-1 *in vivo* pode restaurar parcialmente a involução tímica associada a idade em camundongos e restabelecer a timopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ et al, 1998). Ainda, Chu e colaboradores (2008), demonstraram que o tratamento com IGF-1 aumenta o número de emigrante tímico recente e também aumenta a timopoiese predominantemente através da expansão das células epiteliais tímicas.

Tendo em vista a importante função do timo em produzir continuamente novos linfócitos T para manter a homeostasia do organismo, é razoável apontar que a involução tímica observada em patologias ou pelo envelhecimento deva prejudicar a resposta imune dos indivíduos (GAMEIRO et al, 2010). Neste sentido, é possível que o IGF-1 module moléculas que desempenham papel relevante na geração do repertório de linfócitos T. Estudos relacionados a fisiologia do timo são necessários para entender melhor o seu funcionamento, especialmente o processo de maturação de timócitos. Desta forma, estaremos contribuindo para o conhecimento dos efeitos do IGF-1 na resposta biológica das células, fornecendo subsídios para a possível aplicação desse fator de crescimento no tratamento de imunodeficiências relacionadas a linfócitos T, incluindo infecção pelo HIV e imunossenescência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a influência do fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) sobre moléculas envolvidas na diferenciação de linfócitos T em modelo de explante tímico murino.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar as células estromais tímicas obtidas no modelo de explante tímico;
2. Estabelecer a co-cultura de timócitos e células estromais tímicas obtidas de timo de camundongos;
3. Analisar a expressão de moléculas envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz extracelular na superfície das células estromais tímicas e dos timócitos após a co-cultura na presença ou ausência do IGF-1;
4. Verificar a geração e o fenótipo CD4/CD8 dos linfócitos T após a interação com células estromais tímicas na presença ou ausência do IGF-1;
5. Determinar se o IGF-1 modula fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de timócitos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Timo

3.1.1 Aspectos Gerais

O timo é o primeiro órgão linfóide a aparecer durante a ontogênese e, no ser humano, os dois primórdios laterais de tecido tímico surgem no final da quarta semana de vida embrionária (KUPER et al, 2016).

Durante a embriogênese em camundongos, no 10º dia do desenvolvimento embrionário (E10), o primórdio tímico é formado do endoderma derivado da terceira bolsa faríngea, um processo que depende da interação com as células mesenquimais derivadas da crista neural (GORDON et al, 2004; ZHANG et al, 2007). Aproximadamente no dia E11.5, o rudimento tímico começa a brotar e crescer. No dia E12.5, surgem as primeiras células epiteliais tímicas (TECs), em um processo independente de timócitos (GRAY et al, 2005). A colonização do rudimento tímico pelos precursores hematopoiéticos acontece antes da vascularização, por volta do dia E13.5, pois o primórdio tímico produz fatores quimioatraentes capazes de atrair essas células, que penetram no rudimento tímico via transmigração através das camadas mesenquimais adjacentes. Apenas no 14º dia de gestação, os vasos sanguíneos são formados, o que permite que as células progenitoras hematopoiéticas entrem no primórdio tímico via corrente sanguínea (BARTHLOTT et al, 2006). Posteriormente, os tecidos tímicos perdem sua conexão com a faringe e migram para sua localização definitiva, onde se fundem para formar um único órgão bilobado (MANLEY; BLACKBURN, 2003).

O timo está situado no mediastino ântero-superior na altura dos grandes vasos do coração (SONE et al, 1980), é constituído de dois lobos encapsulados que são parcialmente subdivididos em múltiplos lóbulos, por septos fibrosos. Morfologicamente, cada lóbulo é dividido em região cortical e medular, separadas pela junção córtico-medular (OHL et al, 2003). A região cortical abriga as células pré-T nos estágios mais precoces de maturação, sendo intensamente corada por possuir uma grande densidade linfocitária. A região medular, localizada na porção mais interna no lóbulo, é o local onde os linfócitos T encontram-se em menor número, porém nos estágios finais de maturação, capazes de sair desse órgão como

linfócitos T imunocompetentes e povoar regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos (PEARSE, 2006; PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; SAVINO; DARDENE, 2010). A junção córtico-medular, rica em vasos sanguíneos, é o local de entrada dos precursores de linfócitos T e de saída das células maduras (PEARSE, 2006).

Ainda que o timo seja um órgão linfóide primário, capaz de gerar linfócito T maduro, funcional e autotolerante durante toda a vida adulta, esse órgão não possui células autorrenováveis, o que torna a produção de linfócitos T imunocompetentes, um processo dependente do recrutamento contínuo de precursores linfóides derivados da medula óssea (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

A arquitetura tímica, com diferentes microambientes, é essencial para a maturação e diferenciação de timócitos, uma vez que as subpopulações se localizam em nichos distintos no órgão, recebendo sinais diferenciados em cada região (PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

3.1.2 Microambiente tímico

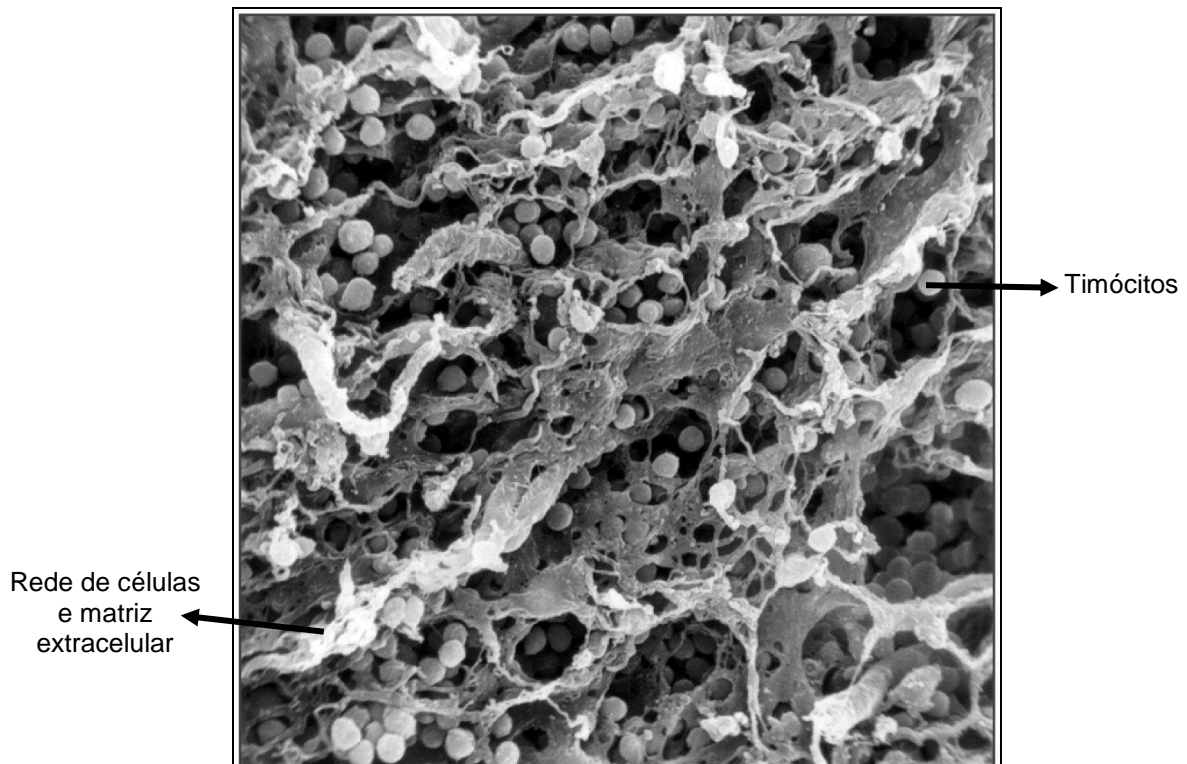
No timo ocorrem os eventos celulares responsáveis pela diferenciação dos linfócitos T. Este processo é dinâmico, ordenado e compartimentalizado em diferentes regiões do microambiente que, devido a sua composição específica, fornece sinais essenciais para o direcionamento das células em desenvolvimento (PETRIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

O microambiente tímico é formado por uma rede tridimensional composta por tipos celulares distintos, por timócitos em diferentes estágios de desenvolvimento e por componentes moleculares. Os constituintes não linfóides, como as células epiteliais tímicas (TEC), células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e também os componentes moleculares, como quimiocinas, citocinas, hormônios e moléculas da MEC constituem o estroma tímico. Essa microarquitetura especializada abriga, estimula e direciona os timócitos, distribuindo-os diferencialmente pelos compartimentos tímicos (Figura 1) (ANDERSON, JENKINSON, 2001; OHIGASHI, KOZAI, TAKAHAMA, 2016).

Os principais componentes não linfóides do timo são as TEC, que se organizam numa rede interconectada de modo a percorrer todo o órgão. No entanto,

este epitélio é heterogêneo, pois, as TEC das regiões cortical e medular apresentam características morfológicas e fenotípicas distintas (DE SOUZA et al, 1993; NITTA; SUZUKI, 2016).

Figura 1 - Microambiente tímico



Micrografia eletrônica de varredura do timo, onde se pode observar timócitos em desenvolvimento (células esféricas) ocupando os interstícios de uma extensa rede de células e matriz extracelular do microambiente tímico. Fonte: JANEWAY et al, 2007.

As TECs são derivadas de células não hematopoiéticas sendo negativas para a expressão de CD45 e positiva para o marcador epitelial EpCAM (ALEXANDROPOULOS; DANZL, 2012). Com base na localização, são divididas em TEC cortical (cTEC) localizada na região externa do córtex e TEC medular (mTEC) localizada na área interna da medula. Essas células são fenotipicamente e funcionalmente distintas e desempenham diferentes papéis na seleção positiva e negativa dos timócitos (ANDERSON; TAKAHAMA, 2012; GUERDER et al, 2012). As cTECs e mTECs expressam distintas citoqueratinas, na sua maioria as mTECs expressam citoqueratina 5 e 14, enquanto que as cTECs expressam a citoqueratina 8 e 18. TECs que expressam as citoqueratinas 5 e 8 estão principalmente localizadas na junção corticomedular (ALEXANDROPOULOS; DANZL, 2012).

É aceito que o desenvolvimento e maturação das TECs é dependente da sua interação com outras células no timo, como os timócitos, fibroblastos e células mesenquimais (AKIYAMA; SHINZAWA; AKIYAMA, 2012). Dos vários tipos de células estromais dentro do timo as células epiteliais tímicas, de maneira particular fornecem uma gama de sinais para o desenvolvimento dos timócitos que inclui a apresentação de peptídeo/MHC importantes para a seleção positiva e negativa (COSGROVE et al, 1992), fatores solúveis como IL-7 para a sobrevivência e expansão (RODEWALD et al, 1997; NITTA; SUZUKI, 2016) e os ligantes Notch para o comprometimento com a linhagem T e a diferenciação (FELLI et al, 1999; ANDERSON et al, 2001).

As interações entre o epitélio tímico e os timócitos são fundamentais para a diferenciação dos linfócitos T. As TEC influenciam esse processo de modo pleiotrópico através da interação direta com os timócitos mediada por moléculas de adesão célula-célula e moléculas de MHC classe I e II. E ainda, através da secreção de citocinas que, dentre outros efeitos, podem aumentar a sobrevivência e estimular a proliferação, assim como quimiocinas, moléculas de MEC e metaloproteinases de matriz, que direcionam os timócitos para as diferentes regiões do microambiente de acordo com o estágio de maturação em que se encontram ao longo das diferentes etapas do processo de diferenciação (SAVINO et al, 2004; JENKINSON et al, 2008). A importância das TECs no processo de desenvolvimento dos timócitos pode ser evidenciada em estudos envolvendo camundongos *nude*, nos quais ocorre mutação no gene que codifica o fator de transcrição FoxN1, o que prejudica a diferenciação das TECs, levando ao completo bloqueio da timopoiese, causando imunodeficiência severa (SU et al, 2003; BLEUL et al, 2006).

Na região cortical tímica, encontram-se complexos linfoepiteliais multicelulares denominados TNC (thymic nurse cell), formados por TEC envolvendo de 2 a 200 timócitos em diferentes estágios de diferenciação (PEZZANO et al, 2001). As TNCs fornecem um ambiente propício para sobrevivência, proliferação e diferenciação intratímica dos timócitos, pois são capazes de secretar hormônios tímicos, como a timulina, e moléculas da MEC, além de expressarem na superfície celular, moléculas que participam da maturação dos timócitos, como o MHC de classe I e classe II (VILLA-VERDE et al, 1995; GARCÍA; TAMAYO, 2013).

Distribuindo-se pelas regiões do microambiente tímico também são encontradas células não epiteliais, como células fagocíticas e as apresentadoras de antígenos. Os macrófagos residentes no córtex tímico realizam a fagocitose dos linfócitos T apoptóticos (PAESSENS et al, 2008), caracterizam-se por conter inúmeros lisossomas com restos celulares produto da reabsorção de timócitos em apoptose, provavelmente decorrentes dos processos de seleção intratímica, explicando a não detecção da morte maciça em cortes de timo normal (OLIVEIRA-DOS-SANTOS et al,1997). Macrófagos localizados na região córtico-medular estão relacionados ao processo de seleção negativa, visto que expressam moléculas de MHC de classe I e II. Foi ainda verificado que macrófagos localizados na região medular produzem citocinas que ativam a proliferação de timócitos maduros, indicando que de fato essas células desempenham funções distintas no processo de seleção intratímica dos timócitos (MILICEVIC; MILICEVIC, 2004).

As células dendríticas (DC) do microambiente tímico são conhecidas por sua morfologia com finos prolongamentos citoplasmáticos. Do ponto de vista funcional, assim como as mTEC as DC participam dos eventos que culminam com a tolerância central de células tímicas, sendo requeridas no processo de seleção negativa dos timócitos com potencial autorreativo (KRUEGER et al, 2011; NITTA, SUZUKI, 2016). O evento de tolerância central dos linfócitos T no timo depende de mecanismos distintos, tais como, deleção clonal dos timócitos autorreativos e formação das células T regulatórias. As células dendríticas medulares possuem a capacidade de apresentar uma gama de peptídeos tecido-específicos aos linfócitos T em desenvolvimento, através das moléculas do MHC de classe I e II, sendo responsáveis pelo fenômeno da seleção negativa (PROIETTO et al, 2009). Fenotipicamente, as DC tímicas expressam CD11c, altos níveis de MHC de classe I e classe II do MHC, ICAM-1, LFA-1 e ainda Sca-1, Sca-2, CD117, CD90 e CD45 (BODEY et al 2004).

Outro componente tímico, os fibroblastos, estão localizados principalmente em regiões ricas em tecido conjuntivo e participam da formação dos septos e cápsula tímica (LINA et al, 2015). São células consideradas agente regulador essencial na promoção do desenvolvimento inicial dos timócitos, pois no início da diferenciação das células precursoras duplo negativas (DN) em células CD4 ou CD8 necessitam da interação com fibroblastos, além da interação com as TECs (ANDERSON et al, 1997). Provavelmente, os fibroblastos influenciam na maturação dos timócitos por

mecanismos de contato célula-célula e/ou pela produção de MEC. Outros achados apontam que os fibroblastos, também secretam quimiocinas no timo, como CCL19 e CCL21, as quais são fundamentais nos processos de migração (GRAY, 2007). Adicionalmente, foi verificado que fibroblastos tímicos são importantes na proliferação e regeneração das TECs devido à produção dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) (KENINS et al, 2010; JENKINSON et al, 2008).

As células do microambiente tímico também modulam a diferenciação dos timócitos através de polipeptídeos solúveis, pois essas células secretam citocinas, quimiocinas e hormônios tímicos. Os timócitos, ainda podem ser influenciados pelo microambiente tímico via interação mediada pela MEC (SAVINO et al, 2016).

3.1.3 Diferenciação intratímica de linfócitos T $\alpha\beta$

Os precursores de linfócitos T, derivados da medula óssea, chegam ao timo através das vênulas pós-capilares localizadas próximas a junção cortico-medular, onde encontram-se a maioria dos vasos sanguíneos capazes de suportar o extravasamento das células precursoras (ANDERSON; JENKINSON, 2001; GILL et al, 2003). Este recrutamento envolve vários passos, incluindo a adesão inicial com baixa afinidade através das selectinas, a rolagem das células sobre o endotélio, a adesão de alta afinidade mediada por integrinas, e a transmigração através do endotélio (MADRI; GRAESSER, 2000). Acredita-se que a migração dos progenitores linfóides para o timo, aconteça em resposta a estímulos quimioatraentes liberados pelo estroma tímico (GILL et al, 2003; JENKINSON et al, 2008).

A diferenciação dos timócitos pode ser monitorada pela expressão de alguns marcadores de membrana, como o receptor de célula T (TCR) e as moléculas CD4 e CD8. Essa diferenciação é dependente dos sinais derivados do microambiente, tanto diretamente, na forma de contato célula-célula, como indiretamente, através de fatores solúveis (SAVINO; DARDENNE, 2010).

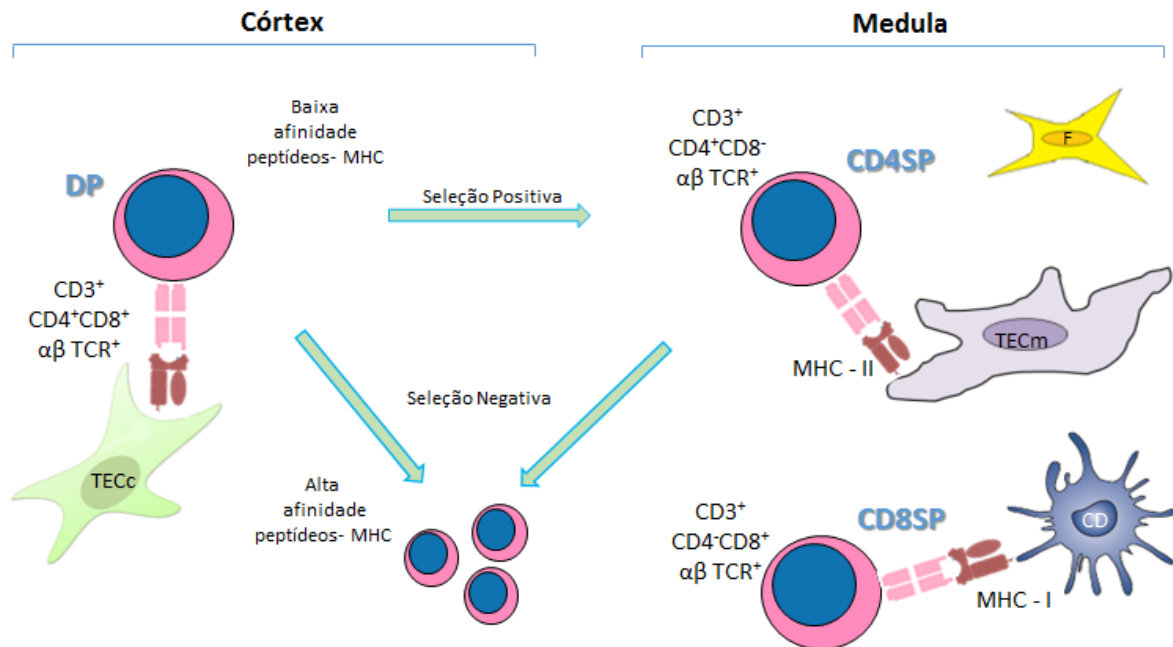
Os precursores de linfócitos T, quando entram no timo, não expressam o complexo TCR nem os correceptores CD4 ou CD8 (TCR⁻CD4⁻CD8⁻). Estas células são denominadas duplo-negativas (DN) e representam 3-5% do total de timócitos. Em camundongos, as células DN podem ainda ser subdivididas em quatro sub-etapas de desenvolvimento, DN1, DN2, DN3 e DN4, baseadas, principalmente, na expressão de duas moléculas de superfície celular: o CD25 (IL-2R α), cadeia α do

receptor para IL-2, e o CD44 (Pgp-1), receptor para ácido hialurônico e fibronectina. As células DN1 (CD25⁻CD44⁺) encontram-se na região cortical, onde estão expressos em níveis mais elevados os ligantes de Notch, DLL1 e DLL4 (SCHMITT et al, 2004; SEO; TANIUCHI, 2016). Acredita-se que a sinalização via Notch induz o comprometimento destas células com a linhagem linfóide (LAIOSA et al, 2006) enquanto que a interleucina-7 (IL-7) é necessária para a proliferação nesse estágio (WANG et al, 2006).

Conforme migram para zona subcapsular, células DN1 se diferenciam em DN2 (CD25⁺CD44⁺) (KOCH et al, 2008), quando a expressão dos genes de ativação de recombinase (RAG) aumenta; nesse estágio é detectado o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias TCR α , mas não para a cadeia TCR β , o que só ocorre no estágio DN3 (CD25⁺CD44^{lo}), marcando irreversivelmente o comprometimento com a linhagem T (BSSEYRIAS et a 2007, SEO, TANIUCHI, 2016).

Com o progresso da maturação, que envolve intensa proliferação, as células DN4 (CD25⁻CD44^{lo}) migram da região subcapsular para o córtex, onde ocorre regulação positiva da molécula CD3 e o rearranjo gênico das cadeias que formam o TCR, onde passam então a expressar o TCR e as moléculas CD4 e CD8 (TCR⁺CD4⁺CD8⁺) sendo denominadas células duplo positivas, as quais constituem cerca de 75-85% da população de timócitos. As células que não são capazes de expressar um TCR funcional morrem por apoptose, enquanto as que o expressam são expostas aos peptídeos endógenos apresentados pelo MHC presentes nas células do microambiente tímico. Essas interações determinam a seleção positiva e negativa (Figura 2), evento decisivo para a seleção do repertório de linfócito T maduro (GAMEIRO et al, 2010; SEO; TANIUCHI, 2016).

Figura 2 – Seleção positiva e negativa dos timócitos

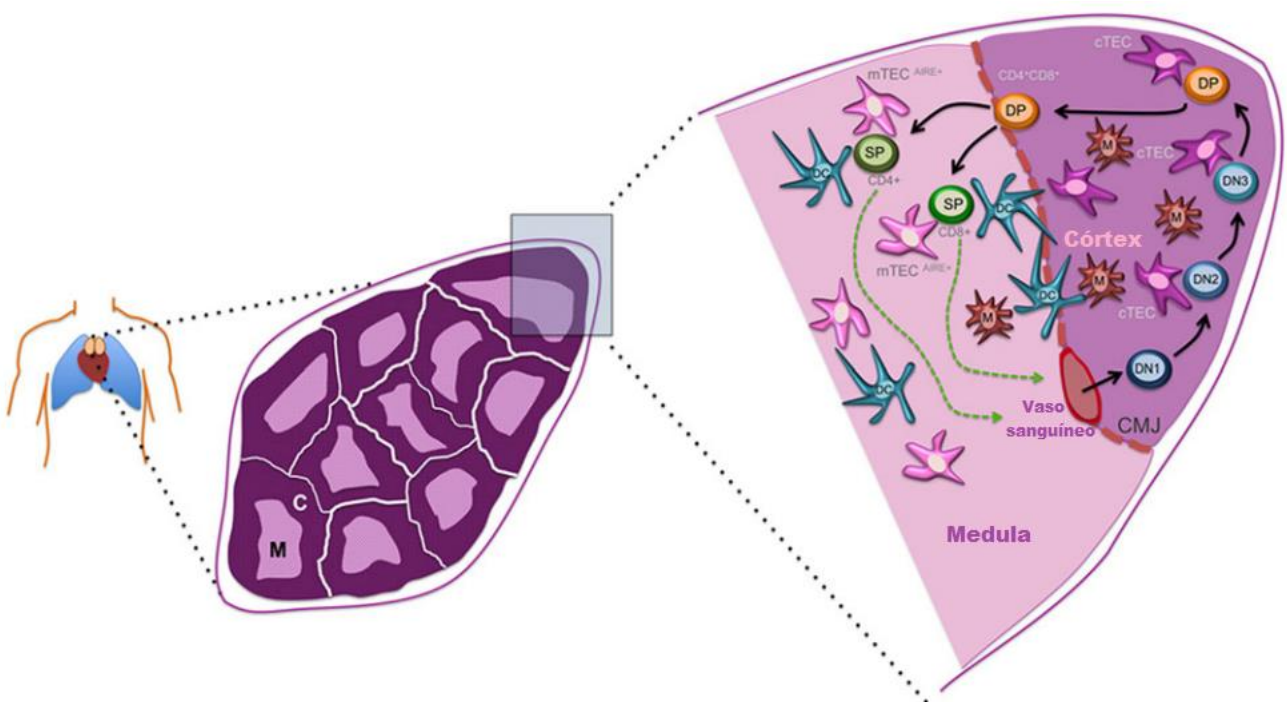


Representação esquemática da seleção positiva e negativa dos timócitos ao longo da diferenciação e maturação de progenitores de linfócitos T no timo. A expressão e rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR) e a regulação positiva de CD4 e CD8 dão origem a timócitos duplo positivos (DP) $CD4^+CD8^+$ cujo receptor se liga à autoantígenos apresentados por células epiteliais tímicas corticais (TECc). A afinidade insuficiente para peptídeos-MHC bloqueia os sinais intracelulares para a sobrevivência e leva à morte celular. As células selecionadas positivamente no córtex, migram para a medula, onde se ligam a antígenos restritos ao tecido (TRA) apresentados por TECs medulares (TECm) ou células dendríticas (CD). A afinidade excessiva para autopeptídeos no contexto de MHC determinará a morte celular dos linfócitos T autorreativos e seleção negativa. Apenas uma pequena fração de linfócitos T sobrevive e é exportado para a periferia. F: fibroblastos. Modificado de Belizário *et al*, 2016.

Na seleção positiva, os timócitos DP ($CD4^+CD8^+$) interagem fracamente com as moléculas do MHC presentes no epitélio cortical e este evento direciona as células a perder um dos correceptores CD4 ou CD8 e a migrarem para região medular, dando origem aos timócitos simples positivo ($TCR^+CD4^+CD8^-$ ou $TCR^+CD4^-CD8^+$), compreendendo cerca de 10 % e 5 % dos timócitos, respectivamente. Em seguida, os timócitos simples positivos sofrem seleção negativa, e aqueles que possuem TCR que se liga fortemente aos peptídeos próprios, presentes no

microambiente tímico, são eliminados. As células que não sofrem rearranjo produtivo do TCR, assim como aquelas que foram selecionadas negativamente após interação TCR-MHC, morrem por apoptose. De fato, apenas 3-5% dos timócitos gerados serão exportados para a periferia do sistema imune, onde irão formar a grande maioria do repertório de linfócitos T (Figura 3) (GRAHAM et al, 2000; ANDERSON; JENKINSON, 2001; CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

Figura 3 - Diferenciação intratímica de linfócitos T e microambiente tímico



Representação esquemática da diferenciação dos timócitos, mostrando a entrada de precursores de linfócitos T através de vasos sanguíneos localizados na junção córtico-medular (CMJ). Após entrarem no timo, durante o processo de diferenciação, os timócitos migram para o córtex e, posteriormente, para a medula. O painel mostra um lóbulo tímico onde estão ilustrados os vários componentes celulares do microambiente tímico que interagem com os timócitos. DC: célula dendrítica; M: macrófagos; cTEC: célula epitelial tímica cortical; mTEC: célula epitelial tímica medular; DN: timócito duplo negativo; DP: timócito duplo positivo; SP: timócito simples positivo. Modificado de Vaidya, Leon, Blackburn, 2016.

Os mecanismos moleculares envolvidos na estreita regulação da expressão do correceptor CD4 e CD8 agrega vários fatores de transcrição, particularmente ThPOK, C-MYB, TOX e GATA3, os quais participam diretamente do desenvolvimento da linhagem de linfócitos CD4SP (WANG et al, 2008; BENDER et

al, 2004; MAURICE et al, 2007), enquanto que os fatores RUNX1, RUNX3 E MAZR, estão relacionados com a diferenciação dos linfócitos CD8SP (SAKAGUCHI et al, 2010; COLLINS et al, 2009).

ThPOK regula negativamente a expressão de RUNX3 e genes da linhagem CD8, incluindo os genes efetores citotóxicos para perforina e granzima B e, portanto, direciona o comprometimento de timócitos reativos ao MHC de classe II a linhagem CD4SP (OVERGAARD et al, 2015). Esse fator de transcrição é considerado o principal regulador no comprometimento dos linfócitos T com a linhagem CD4SP (LEE et al, 2015), visto que por volta de 2001, foi identificada uma mutação espontânea numa linhagem de camundongos que exibia ausência seletiva de linfócitos CD4SP maduro e uma maior representatividade de linfócitos CD8SP, um fenótipo denominado de “deficientes auxiliares” (HD). A mutação foi mapeada para o gene que codifica o fator de transcrição ThPOK, conhecido como gene *Zbtb7b* (HE et al, 2005). Estudos iniciais revelaram duas características intrigantes do fenótipo mutante HD. Em primeiro lugar, os timócitos restritos ao MHC de classe II não tiveram seu desenvolvimento bloqueado, mas passaram por um redirecionamento altamente eficiente para a linhagem CD8SP, indicando que ThPOK é necessário para mediar o comprometimento para a linhagem CD4SP e prevenir o comprometimento para CD8SP. É importante destacar que em camundongos HD os timócitos redirecionados não adotam apenas o padrão de expressão do correceptor CD8, mas mostram a indução de outros marcadores CD8, como perforina e CD103, indicando que ThPOK regula o processo de comprometimento global, não apenas o padrão de expressão do correceptor. Em segundo lugar, nenhum outro aspecto do desenvolvimento dos linfócitos T foram afetados em camundongos HD. Em particular, o desenvolvimento de células restritas ao MHC de classe I para a linhagem CD8SP, bem como a seleção negativa, prosseguiram normalmente (KEEFE et al, 1999; HE et al, 2005) e seleção positiva de timócitos restritos ao MHC de classe II não foi afetada. Estas observações foram de interesse considerável, a medida que forneceram a primeira evidência de que o comprometimento da linhagem e seleção positiva de timócitos $\alpha\beta$ foram geneticamente separáveis e, portanto, mecanisticamente distintas (KEEFE et al, 1999). Foi ainda sugerido que a mutação em camundongos HD não causou defeito na sinalização TCR, já que os ensaios bioquímicos de sinalização de TCR em linfócitos T de camundongos HD mostraram-se normais (FISCHER et al, 2005).

Outro fator de transcrição que desempenha papel importante no comprometimento com a linhagem T CD4SP é o Gata3, um membro da família Gata de fatores de transcrição expressos por células do sistema imunológico, desde células germinativas hematopoiéticas até linfócitos T maduro (HENDRIKS et al, 1999). Gata3 é necessário em várias fases durante o desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, desde o comprometimento com a linhagem T (HOSOYA et al, 2009) até a diferenciação em linfócitos Th2 (HO; TAI; PAI, 2009).

Durante o processo de seleção positiva e comprometimento da linhagem CD4/CD8, o Gata é regulado positivamente pelos sinais mediados pelo TCR (HERNANDEZ-HOYOS et al, 2003) e é necessário para a geração de linfócitos CD4SP. O Gata3 é primeiro expresso em precursores precoces de timócitos e é necessário para a sua diferenciação para além da subpopulação DN. Mais tarde, Gata3 é preferencialmente hiper-regulado em timócitos CD4SP versus CD8SP. Significativamente, a deleção condicional de Gata3 no estágio DP causa um bloqueio específico no desenvolvimento de CD4SP (PAI et al, 2003; WANG et al, 2008), enquanto que sua expressão constitutiva inibe seletivamente o desenvolvimento dos linfócitos T CD8SP (HERNANDEZ-HOYOS et al, 2003). Embora camundongos Gata3^{-/-} exibam algum redirecionamento de timócitos restritos ao MHC de classe II para a linhagem CD8SP, a eficiência deste processo é muito baixa (PAI et al, 2003). Por outro lado, a expressão de Gata3 não causa redirecionamento de células restritas ao MHC de classe I para a linhagem CD4SP. O papel exato de Gata3 no desenvolvimento de linfócitos T CD4SP permanece obscuro, mas parece ocorrer em uma fase relativamente precoce do processo. (HERNANDEZ-HOYOS et al, 2003; WANG et al, 2008). Curiosamente, a deficiência de Gata3 também previne o surgimento de linfócitos T CD4SP em camundongos que expressam um TCR restrito ao MHC de classe I, embora o desenvolvimento dos linfócitos T CD8SP prossiga normalmente (PAI et al, 2003). Em geral, essas observações sugerem que Gata3 desempenha um papel crítico em apoiar a diferenciação para CD4SP, talvez antagonizando a diferenciação para CD8SP, mas não é o regulador principal da escolha dessa linhagem (KAPPES, 2010).

Conforme descrito acima, a regulação transcricional de CD4 e CD8 tem sido extensivamente estudada, levando à percepção importante de que os fatores de transcrição da família RUNX são indispensáveis para o silenciamento do gene *Cd4*. RUNX1 e RUNX3 são expressos durante a timopoiese. De maneira particular, a

proteína Runx3 é expressa seletivamente na linhagem CD8SP, ao passo que Runx1 não apresenta tal seletividade, sugerindo que Runx3 é o principal fator responsável pelo silenciamento específico de *Cd4* na linhagem CD8SP. De fato, o bloqueio da expressão de *Runx3* nos timócitos em desenvolvimento, provoca redução notável de timócitos CD8SP. Posteriormente, tornou-se claro que o papel dos fatores RUNX no desenvolvimento dos linfócitos T CD8SP estende-se para além do controle da transcrição do correceptor (VOON; HOR; ITO, 2015). Assim, em camundongos knockout para *Runx3* a eficiência da geração de linfócitos T CD8SP diminui acentuadamente e o restante dos linfócitos T CD8SP falham em regular o marcador CD103 (EGAWA et al, 2008).

Comparado com *Runx1*, *Runx3* ganha proeminência na diferenciação mais tardia dos linfócitos T. Desempenha um papel dominante na especificação dos linfócitos T citotóxicos CD8SP a partir de timócitos imaturos DP. Isto é conseguido através de vários mecanismos. Primeiro, *Runx3* e também *Runx1*, ligam-se ao elemento silenciador no locus *Cd4* para suprimir sua expressão. Em segundo lugar, ele se liga ao elemento silenciador de *Zbtb7b*, determinante chave da linhagem CD4SP (VOON; HOR; ITO, 2015). Em consonância com essas importantes funções, a ablação genética do complexo *Runx* resulta em bloqueio na diferenciação de linfócitos T citotóxicos CD8SP e redirecionamento no seu desenvolvimento para o fenótipo CD4SP (SETOGUCHI et al., 2008; VOON; HOR; ITO, 2015).

3.1.4 Matriz extracelular tímica e integrinas

A migração direcionada dos timócitos rumo a sua diferenciação necessita de eventos sequenciais de adesão e de-adesão da célula migrante sobre um substrato biológico, fornecido pelas moléculas de MEC, organizadas de formas distintas no córtex e na medula (SAVINO et al, 2004).

A MEC é uma rede acelular formada por proteínas e polissacarídeos, (Figura 4) que além de interagir entre si formando um arcabouço físico para a sustentação do tecido, ainda está em contínua interação com as células ao seu redor, modulando eventos de proliferação, adesão, migração e sobrevivência dessas células (VAKONAKIS; CAMPBELL, 2007). No timo, os principais componentes da MEC são

as glicoproteínas, fibronectina e laminina, e colágenos tipo I, III e IV (MEIRELES DE SOUZA et al, 1993; SAVINO et al, 2004).

A fibronectina é uma glicoproteína de adesão celular, que pode ser sintetizada por fibroblastos e células epiteliais, apresenta-se como uma estrutura heterodimérica e está envolvida em vários processos biológicos como embriogênese, crescimento, proliferação, migração, além da adesão celular (INGHAM, 2004).

Duas isoformas de fibronectina são encontradas no timo, sendo reconhecidas por receptores diferentes. A isoforma que está distribuída por todo o microambiente tímico se liga ao VLA-5 ($\alpha 5\beta 1/CD49e$ - receptor clássico da fibronectina) através da sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), e a isoforma com distribuição aparentemente restrita à medula, é reconhecida pelo receptor VLA-4 ($\alpha 4\beta 1/CD49d$), formada através de um *splicing* alternativo do mRNA de fibronectina através da sequência de ácido aspártico-arginina-glutamina-valina (SAVINO et al, 2004).

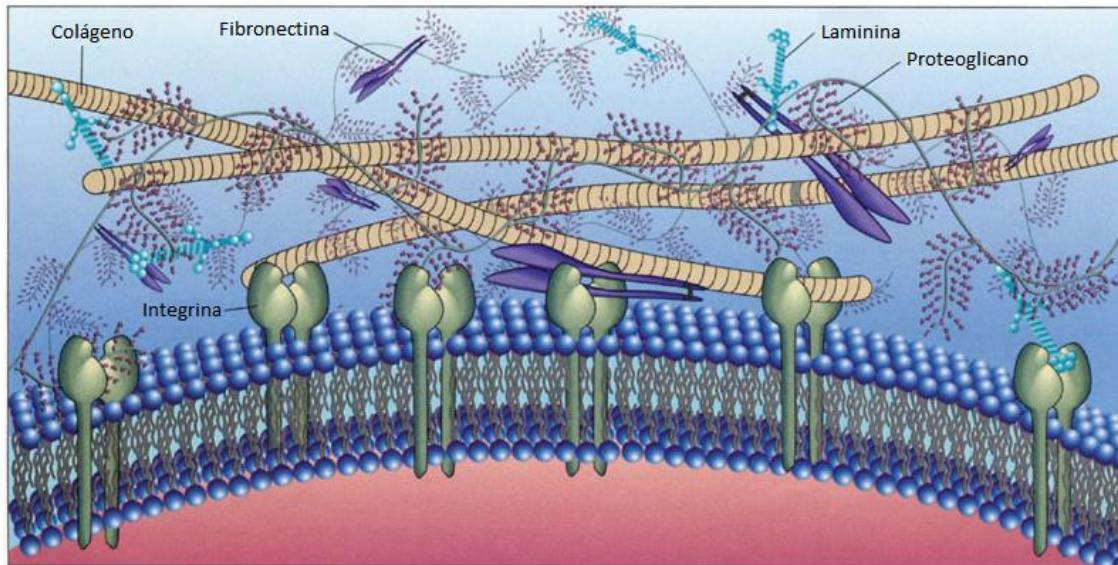
Outro importante componente da matriz extracelular é a laminina, uma glicoproteína de adesão celular que, estruturalmente se apresenta como um heterotrímero de conformação cruciforme, formada por três cadeias peptídicas α , β e γ . Atualmente, existem pelo menos 18 isoformas de laminina que exibem expressão diferencial nos tecidos (SAVINO et al, 2015).

No timo, a laminina é secretada pelas células epiteliais e encontra-se distribuída heterogeneamente dentro dos lóbulos tímicos. Em 2008 Ocampo e colaboradores, demonstraram que a laminina-211 controla a entrada e a saída dos timócitos no interior do complexo linfoepitelial TNC e que a presença de laminina fornece um microambiente propício para a proliferação e diferenciação dos timócitos.

As interações mediadas por laminina são desencadeadas por duas classes de receptores, receptores do tipo integrina e não-integrina. Pelo menos 11 integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$ e $\alpha M\beta 2$) podem se ligar a laminina. Entre os vários receptores de laminina descritos no timo, o VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$ ou CD49f) é o mais estudado, sendo expressos pelo timócitos e pelas células do microambiente tímico (SAVINO et al, 2015).

A interação de diferentes isoformas de laminina com seus receptores correspondentes, presentes na superfície dos timócitos é relevante para os eventos de adesão, migração e sobrevivência dessas células (KIM et al, 2000).

Figura 4 - Organização da matriz extracelular (MEC)



A MEC é formada por várias proteínas e polissacarídeos, organizados de maneira a formar uma rede complexa, fundamental para a manutenção tecidual e a interação célula-célula e célula-MEC. Extraído e modificado de [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail4.htm).

Um evento essencial para vários processos biológicos é a interação célula-MEC, viabilizada por receptores específicos de superfície celular denominado integrinas (VACCA et al, 2001; TIMOTHY et al, 2004). Estas moléculas foram assim chamadas por integrarem os compartimentos intra e extracelular, possuem um domínio citoplasmático capaz de se ligar a elementos do citoesqueleto e um domínio extracelular de interação com as moléculas presentes no microambiente, como as proteínas da MEC ou outras células. Assim, são consideradas receptores de sinalização bidirecional visto que, transmitem informação tanto dentro como fora da célula (HYNES, 2006; IMAI et al, 2010).

As integrinas pertencem a uma família de glicoproteínas que formam receptores heterodiméricos constituídos de uma subunidade α e outra β . Até o momento, foram descritas dezoito subunidades α e oito β , formando pelo menos vinte e quatro integrinas diferentes, constituindo a família mais diversa de moléculas de adesão celular (TIMOTHY et al, 2004).

Os tímocitos expressam, principalmente, as integrinas denominadas VLAs (*very late antigens*) da família $\beta 1$, como por exemplo, os receptores VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$) e VLA4 ($\alpha 4\beta 1$) para fibronectina, e o receptor VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$) para laminina. No entanto, a distribuição destas moléculas é modificada segundo o estágio de maturação,

refletindo uma influência diferencial dos ligantes e receptores em cada etapa do desenvolvimento (SAVINO et al, 2000, 2004, 2015). Conforme citado acima, dentre os vários receptores tipo integrina descritos no timo, o VLA-6 é o mais estudado, sendo expresso nos timócitos em desenvolvimento, nos vários subgrupos CD4/CD8, bem como nas células do microambiente tímico, particularmente as TECs. No entanto, outros receptores, tais como $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$, também são expressos pelos timócitos e TEC (SAVINO et al, 2015).

A migração intratímica de timócitos, durante o processo de diferenciação, é um sistema complexo e de natureza multivetorial em que cada vetor representa uma dada interação ligante/receptor (SAVINO, 2007). O microambiente tímico é formado por uma rede tridimensional de glicoproteínas que compõem a MEC. Estas glicoproteínas formam um complexo macromolecular que contribui como pontos de ancoragem para as células estromais e timócitos, sendo importantes moléculas sinalizadoras intervenientes no desenvolvimento dos timócitos através de sua participação nos eventos de diferenciação, migração, proliferação e ativação celular (SAVINO et al, 2004). Além disso, diferentes fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios estão associados com a MEC, representando um importante fator na regulação da resposta imune celular (SAVINO et al, 2004; SMANIOTTO et al, 2005; MENDES-DA-CRUZ et al, 2008).

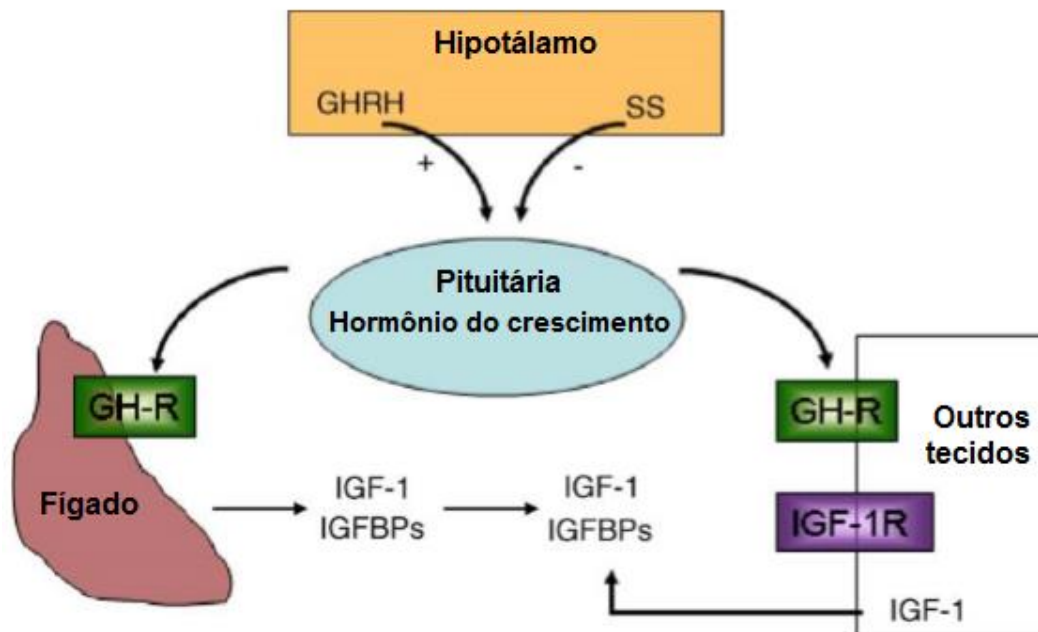
3.2 Fator -1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1)

O IGF-1 é um polipeptídeo simples com peso molecular de 7,5 kDa e apresenta sequência proteica com 68% de homologia com o IGF-2 e 50% de homologia com a sequência da pró-insulina (DAUGHAGAY et al, 1987; RAJARAM et al., 1997). O IGF-1 é o produto de um único gene (\pm 95 kb) que contém seis éxons. A transcrição deste gene leva à produção de RNA mensageiros com diferentes tamanhos que são expressos em uma variedade de tipos celulares (KLEFFENS et al, 1998).

O IGF-1 é um fator neuroendócrino com múltiplas funções anabólicas, incluindo aumento da proliferação celular, inibição da apoptose e diferenciação celular que conferem efeitos positivos no crescimento dos órgãos e na recuperação da lesão (LEROITH; YAKAR, 2007). Os efeitos proliferativos e de desenvolvimento do hormônio do crescimento (GH) em vários órgãos, incluindo o timo e o sistema

imunológico periférico, são mediados principalmente por IGF-1 (LIU; LEROITH, 1999). No entanto, o IGF-1 é produzido por uma grande variedade de células de maneira parácrina / autócrina e independente da regulação de GH (BROCARDI et al, 2001; BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015), figura 5.

Figura 5 - Eixo GH/IGF-1



Hormônio do crescimento, produzido na pituitária anterior, é modulado por dois hormônios hipotalâmicos, hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), o qual estimula a síntese e a secreção GH e somatostatina a qual inibe a liberação do GH em resposta ao GHRH. O GH por meio de *feed back* também inibe a secreção de GHRH e provavelmente tem efeito inibitório direto sobre a secreção das células produtoras de GH (somatotróficas). Embora 90% do IGF-1 seja sintetizado e secretado pelo fígado, muitos tipos de células são capazes de produzir o IGF-1. Modificado de Sonntag e colaboradores (2005).

A maioria das ações do IGF são mediadas pelo receptor do fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R) e reguladas por proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBPs), as quais representam uma família de 6 proteínas (IGFBP1-6). Apesar da similaridade estrutural, cada IGFBP tem propriedade única e exibe funções específicas. IGFBPs inibem e/ou potencializam as ações do IGF e algumas desempenham efeitos independentes da ligação ao IGF (FIRTH; BAXTER, 2002; MOHAN; BAYLINK, 2002). Essas proteínas

possuem alta afinidade aos IGFs, assim competem com o IGF-1R para se ligar aos IGFs e diminuem a biodisponibilidade destes (FÜRSTENBERGER; SENN, 2002). Dessa forma, a meia vida do IGF-1 pode ser estendida de minutos para 15 h quando complexada com as IGFBPs (FOWLKES, 1997). A afinidade do IGF-1 e IGF-2 a IGFBPs é maior ou pelo menos igual a afinidade desse fator de crescimento ao IGF-1R e é regulada pelas proteinases que degradam as IGFBPs. Essas enzimas clivam as IGFBPs e conseqüentemente liberam IGF para interagir com seu receptor (JONES; CLEMMONS, 1995). Cerca de 95% do IGF-1 está ligado a IGFBP, sendo que 80% a 90% do IGF-1 se liga a IGFBP-3. A IGFBP-3 determina a quantidade de IGF-1 disponível para entrar no tecido alvo e alcançar o IGF-1R (GIANUZZI; PALMA-ARDILES; HERNANDEZ-FERNANDEZ, 2016).

O IGF-1R e IGF-2R (receptor do fator-2 de crescimento semelhante a insulina), são glicoproteínas transmembrana e os dois principais receptores no sistema IGF. A estrutura e função desses receptores são completamente diferentes. IGF-1R é um receptor tetramérico composto de duas subunidades β transmembrana e duas subunidades α , nas quais as subunidades α atuam como domínio de ligação e as duas subunidades β tem atividade tirosina quinase ligadas por uma ponte de dissulfeto (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015). Este receptor estruturalmente é semelhante ao receptor da insulina (IR) com 70% de homologia (MAURO et al, 2015). O IGF-1 e a insulina são capazes de se ligar, com baixa afinidade, e ativar mutuamente ambos os receptores (DANIELSEN; LARSEN; GAMMELTOFT, 1990).

Imunologicamente, demonstrou-se 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). No timo, o IGF-1 tem sido implicado como um regulador positivo, baseado nas observações de declínio da função tímica relacionado ao avanço da idade, em paralelo, ao declínio da concentração plasmática do IGF-1 (KELLEY et al, 1998). O IGF-1R é expresso em timócitos, linfócitos T periféricos (GAGNERAULT et al., 1996), linfócitos B (STUART et al, 1991), células mononucleares (KOOIJMAN et al, 1992) e células dendríticas (BADOLATO et al, 1994), com isso essas células se mostraram susceptíveis a ação do IGF. Em culturas de timo fetal murino, a inibição de IGF-1 por bloqueio de anticorpos resultou em alterações significativas no número total de timócitos e na composição das subpopulações de linfócitos T (KECHA et al,

2000). As TEC também expressam IGF-1R e a adição de IGF-1 a linhagens de TEC humana induziu a proliferação dessas células (TIMSIT et al, 1992) e facilitou a adesão entre timócitos e TECs através da modulação da expressão da molécula de adesão celular (VLA-5 e VLA-6) e da produção de proteínas da matriz extracelular (fibronectina e laminina) pelas TECs (MELLO-COELHO et al, 1997). Anguela e colaboradores (2013) relataram que o IGF-1 exibiu efeito protetor no diabetes autoimune devido ao aumento no percentual de células Treg no fígado e posteriormente foi demonstrado que a terapia sistêmica com IGF-1 estimula a proliferação de células Treg em múltiplas desordens autoimunes. 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). Essas observações sugerem um importante papel do sistema IGF/IGF-R no desenvolvimento e maturação do timo. Estes estudos *in vitro* que ilustram os efeitos positivos do IGF-1 no desenvolvimento dos timócitos são ainda suportados por estudos *in vivo* onde o IGF-1 mostrou melhorar a reconstituição tímica após transplante de medula óssea em murinos (ALPDOGAN et al, 2003). No entanto, pouco se sabe sobre a ação do IGF-1 na diferenciação dos linfócitos T, conhecimento de evidente relevância principalmente no que se refere ao possível potencial terapêutico desse fator de crescimento em algumas situações clínicas como a infecção pelo vírus da imunodeficiência (HIV), doenças autoimunes e envelhecimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da linhagem C57BL/6, adultos jovens, com idade entre 4 a 5 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do Laboratório de Biologia Celular (LBC) em condições livres de patógenos por pelo menos 48 horas antes da realização dos experimentos. A eutanásia foi realizada através de aprofundamento anestésico com dose letal de tiopental sódico, 120 mg/kg por via intraperitoneal. Todos os procedimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas de biossegurança estabelecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL - Protocolo n°: 028370/2010-07 (anexo 1) e Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL - n° 14/2015 (anexo 2).

4.2 Cultura primária das Células Estromais Tímicas (CETc)

As culturas primárias das células estromais tímicas de camundongos (CETc) foram obtidas utilizando-se a técnica do explante a partir de fragmentos do timo de camundongos. Na câmara de fluxo laminar, os timos foram extraídos assepticamente e lavados em solução tampão fosfato salina (PBS), em seguida foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 e transferidos para frascos de cultura de 25 cm^2 contendo RPMI 1640 acrescidos de 40 mg/ml de gentamicina, 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 10 mM/ml de L-glutamina. As culturas foram incubadas a temperatura de 37°C , em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e observadas regularmente por microscópio de luz invertido com contraste de fase (Nikon, Tokyo, Japan). O meio foi trocado no 4º dia de cultivo.

No 7º dia após o explante, as CETc foram lavadas com PBS, tratadas com solução de tripsina a 0,1 %, neutralizadas com meio de cultura, centrifugadas e cultivadas em placas de seis poços (Costar, EUA) ou em lâminas Lab-Tek chamber

(Nunc, Dinamarca). Posteriormente, essas células estromais foram utilizadas para a realização dos experimentos.

4.3 Obtenção dos timócitos

Os animais foram eutanasiados, o timo foi removido cirurgicamente, lavado em PBS e macerado em 1 mL de RPMI-SBF 4 % com o auxílio de peneira e êmbolo estéril. O sobrenadante foi recolhido, as células foram contadas em câmara de Neubauer sob o método de exclusão por azul de trypan 0,02% e posterior utilização nos ensaios.

4.4 Co-cultura das CETc e timócitos

Para realização dos ensaios de co-cultura, as CETc foram semeadas em placas de 6 poços (Costar, EUA) numa densidade de $1,5 \times 10^5$ CETc em cada poço, usando 3 mL de RPMI 1640 suplementado com 10 % de SBF, 40 mg/ml de gentamicina, e 10 mM/ml de L-glutamina. Passadas 36 h do plaqueamento inicial das CETc, foram adicionados $1,5 \times 10^7$ timócitos em cada poço, na proporção de 1:100. As co-culturas foram mantidas a temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por um período de 72 horas e foi adicionado diariamente IL-7 na concentração de 1 ng/mL (todos os grupos), IGF-1 na concentração de 100 ng/mL (grupo tratado) ou PBS (grupo controle).

4.5 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

A fenotipagem das CETc e das subpopulações linfocitárias foi realizada por citofluorimetria. Para determinar o fenótipo dos timócitos quanto à expressão das moléculas de superfície celular foram utilizados os seguintes anticorpos: CD4, CD8, CD44, CD25, CD127, CD49d, CD49e, CD49f. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com APC (*Allophycocyanin*) e anti-CD8 acoplado a PerCP (*Peridin Chlorophylli Protein*) para identificar o fenótipo CD4/CD8 dos timócitos, anticorpos anti-CD44 marcados com PE (*Phycoerythrin*) e anti-CD25 acoplado a FITC (*fluorescein isothiocyanate*) para identificar o fenótipo DN1, DN2,

DN3 e DN4 dos timócitos, anticorpos monoclonais anti-CD127 marcados com FITC para identificar a expressão do receptor da IL-7 (IL-7R) e anticorpos anti-CD49d (VLA-4/cadeia α 4), anti-CD49e (VLA-5/cadeia α 5) e anti-CD49f (VLA-6/ cadeia α 6) marcados com PE para avaliar a expressão de receptores integrinas para moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, respectivamente.

Para caracterizar os tipos celulares existentes no estroma tímico estudado, as células estromais foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD326/EpCAM marcados com APC para identificar as células epiteliais; anticorpos anti-MHC I acoplado a FITC e MHC II marcado com PE para identificar o fenótipo MHC I/MHC II; anticorpos anti-CD11c (cadeia α X) marcado com FITC para caracterizar as células dendríticas; anticorpos anti-CD11b (cadeia α M) acoplado a APC para identificar os macrófagos; anti-CD49b (VLA2; cadeia α 2) marcado com APC para caracterizar os fibroblastos; anticorpos anti-CD49d (VLA-4; cadeia α 4), anti-CD49e (VLA-5; cadeia α 5) e anti-CD49f (VLA-6; cadeia α 6) marcados com PE para avaliar a expressão de receptores para moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, respectivamente. O controle negativo para análise foi feito com anticorpos primários de imunoglobulinas não relacionadas, que não geram marcação significativa.

Para a análise por citometria de fluxo, os timócitos ou CETc foram colocados em placas de 96 poços de fundo "U", em uma densidade de 2×10^6 células/poço. Após serem lavados com PBS e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, as células foram incubadas com anticorpo específico, por 20 minutos, a 4°C, no escuro. Após a devida incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e posteriormente fixadas com formaldeído 2%. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.8.

4.6 Imunomarcação

4.6.1 Imunofluorescência para citoqueratina 5 e 8

Após o cultivo de 1×10^4 CETc na lâmina Lab-Tek (Nunc, Dinamarca) por 36 horas, as células estromais foram lavadas em PBS, fixadas com metanol por 10 minutos e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta, onde, as CETc foram pré-incubadas por 30 minutos com PBS – BSA 1%. Em etapa conseguinte, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-citoqueratina 5 e anti-citoqueratina 8 durante 60 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente. Em seguida, as CETc foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas durante 45 minutos com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao FITC. Posteriormente, as células foram novamente lavadas em PBS, incubadas com DAPI e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:3). Depois de cobertas com lamínula de vidro, as lâminas foram avaliadas através de microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i).

4.6.2 Imunofluorescência para fibronectina e laminina

Após 72 horas de co-cultivo das CETc e timócitos, na proporção de 1:100, na lâmina Lab-Tek (Nunc, Dinamarca) e tratamento diário com IGF-1 ou PBS (grupo controle), as CETs foram submetidas à técnica de imunofluorescência indireta, onde, foram pré-incubadas por 30 minutos com PBS – BSA 1%. Em etapa conseguinte, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-fibronectina e anti-laminina durante 60 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente. Em seguida, as CETc foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas durante 45 minutos com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao FITC. Posteriormente, as células foram novamente lavadas em PBS e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:3). As lâminas foram avaliadas através de microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p.

4.7 Análise da viabilidade e apoptose celular

Para determinação de viabilidade e apoptose dos timócitos após co-cultura com as CETc foi utilizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC *Apoptosis Detection Kit*[®], composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC), e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI: *Propidium Iodide*), seguida da análise por citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, com o início do processo de morte celular programada (apoptose) estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não viáveis, visto que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio recente e tardio de apoptose. Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V⁻/PI⁻); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequentemente marcação com a anexina V (anexina V⁺/PI⁻); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a células possua dupla marcação (anexina V⁺/PI⁺).

Inicialmente, os timócitos foram ressuspensos em 400 µL de tampão de ligação 1x (*Binding Buffer*[®] 1X: 10 mmol HEPES, NaOH, pH 7,4, 140 mmol NaCl, 2,5 mmol CaCl₂) na concentração de 1x10⁶ células/mL. Em seguida, 100 µL desta solução foi transferido para os tubos de citometria, onde foram acrescentados 5 µL de anexinaV, 5 µL de PI ou ambos os marcadores. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25° C), protegidas da luz. Por fim, 400 µL de *Binding Buffer 1 X* foi adicionado a cada tubo e as amostras analisadas por citômetro de fluxo no período máximo de 1 hora. As amostras foram analisadas em triplicata, as leituras foram feitas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.8.

4.8 RT-PCR

Após a co-cultura, os timócitos foram recolhidos e submetidos às etapas de extração do RNA total, síntese e amplificação do cDNA utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação dos genes-alvos: *Gata3*, *Runx1*, *Runx3* e *Zbtb7b*, em um protocolo de 30 ciclos (temperatura de desnaturação 94 °C por 30 s, anelamento 60 °C por 1 min e extensão 72 °C por 1 min), observadas as etapas a seguir descritas:

- 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 oligonucleotídeos usados para cada um dos genes-alvo e o controle endógeno *Gapdh*.

- b) Extração do RNA total: Amostras de RNA total dos timócitos foram extraídas pelo método fenol-clorofórmio. Brevemente, as células dos grupos CTR e IGF-1 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 ligeira homogeneização através da 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 ressuscitado 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 a -80°C até posterior utilização.

- 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; MgCl_2) e 500 nM dos oligonucleotídeos específicos para os genes-alvo e constitutivo *Gapdh* (Tabela 1), acrescido de água livre de RNases e DNases, em um volume total de 25 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 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para detecção de genes envolvidos na diferenciação dos linfócitos T no sistema de PCR

Gene	Sequência F	Sequência R
<i>Gata3</i>	CAAGCGAAGGCTGTCCG	ATTAGCGTTCCTCCTCCAGA
<i>Zbtb7b</i>	AAGATAATCCACGGGGCAGG	GCTTGTCATTCTGGTGAAGC
<i>Runx-1</i>	ATGAAGAACCAGGTAGCGAG	AGAGTGAAGCTCTTGCCTCTAC
<i>Runx-3</i>	CAACCTTCATACGAGACCCG	CACCATCGAGCGCACTTC
<i>Gapdh</i>	TGTTCTACCCCAATGTGT	CCTGCTTCACCACCTTCTTG

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9 Análise Estatística

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os valores obtidos foram submetidos ao teste T de *Student* e considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os valores foram representados pela média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do estroma tímico

As células estromais tímicas de camundongos (CETc) foram obtidas diretamente do tecido tímico de acordo com a metodologia descrita no item materiais e métodos. Após 7 dias de cultivo a 37°C em estufa com 5% de CO₂, observou-se a presença de células com diferentes morfologias: células de formatos ovoides, arredondadas, fusiformes e estreladas (Figura 6). Estas células foram submetidas à técnica de citometria de fluxo para caracterização (Figura 7 A).

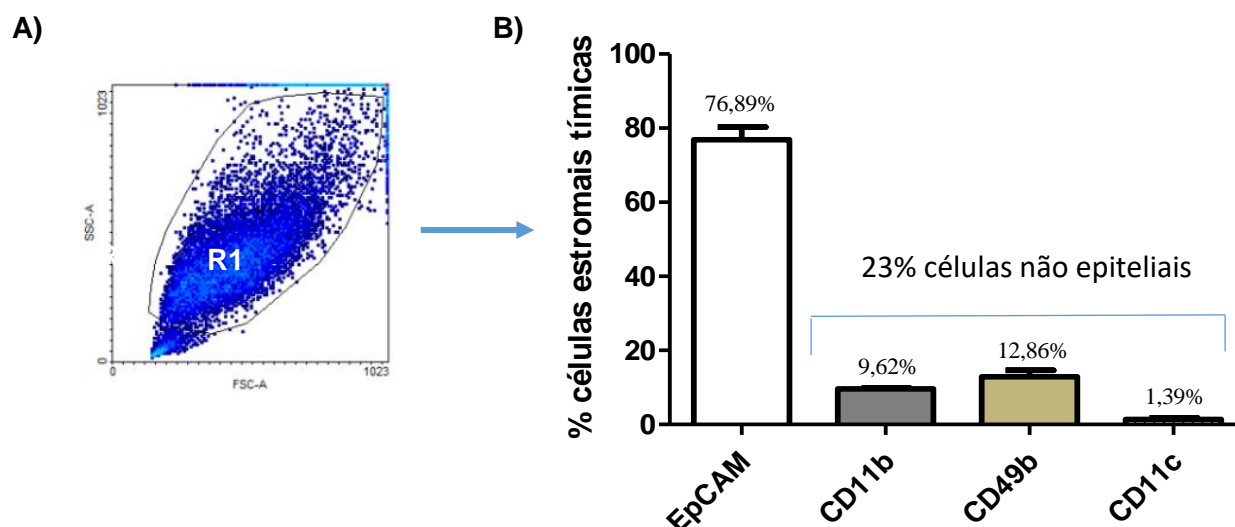
Figura 6 - Células estromais tímicas



Fonte: Elaborada pela autora. Fotomicrografia obtida após o 7º dia de cultivo das CETc a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Magnitude 400x.

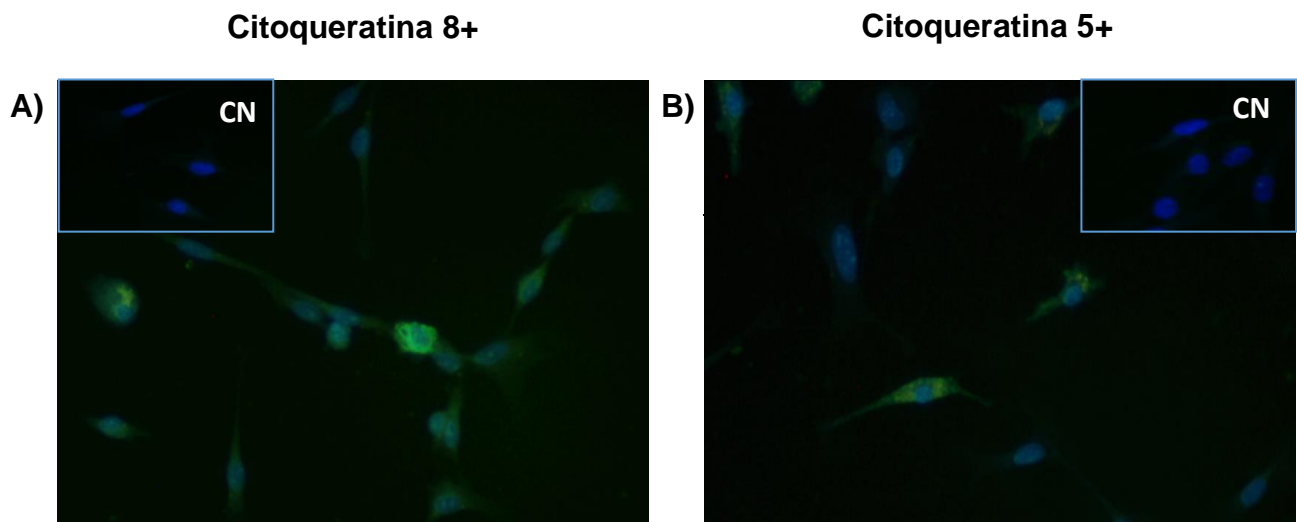
Avaliados os marcadores expressos na superfície dessas células estromais, verificou-se que cerca de 76% são células epiteliais tímicas, isto é, expressam em sua superfície a molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM) e cerca de 23% são células não epiteliais, entre essas, sugere-se que aproximadamente 9% são macrófagos, pois expressam a molécula CD11b ($\alpha_M\beta_2$), 12% são fibroblastos por expressar a molécula CD49b (VLA2), 1% são células dendríticas, já que expressam em sua superfície a molécula CD11c ($\alpha_X\beta_2$) (Figura 7B).

Figura 7 - Caracterização das células estromais tímicas



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Delimitação da população de células estromais tímicas no *dot plot* tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). (B) Porcentagem de células estromais tímicas que expressam EpCAM (células epiteliais tímicas), CD11b (macrófagos), CD49b (fibroblastos) e CD11c (células dendríticas). As barras representam média \pm erro padrão da média, n=16.

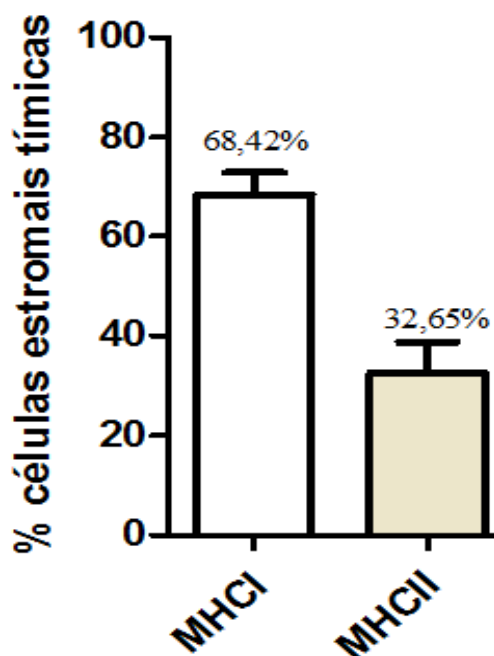
As células epiteliais tímicas corticais são positivas para citoqueratina 8 e as células epiteliais tímicas medulares são positivas para citoqueratina 5. Ao realizar imunomarcção com as CETc e utilizando anticorpos específicos, observou-se que no modelo experimental desenvolvido esses dois tipos de células epiteliais estão presentes (Figura 8).

Figura 8 - Caracterização das células epiteliais tímicas

Fonte: Elaborada pela autora. Fotomicrografias mostram a presença de citoqueratina por imunofluorescência. (A) Citoqueratina específicas para o epitélio tímico cortical (citoqueratina 8+) e (B) Citoqueratina específica para o epitélio tímico medular (citoqueratina 5+). Os núcleos marcados em azul (DAPI). As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes. Magnitude de 400X. O Inserto no painel representa o controle negativo.

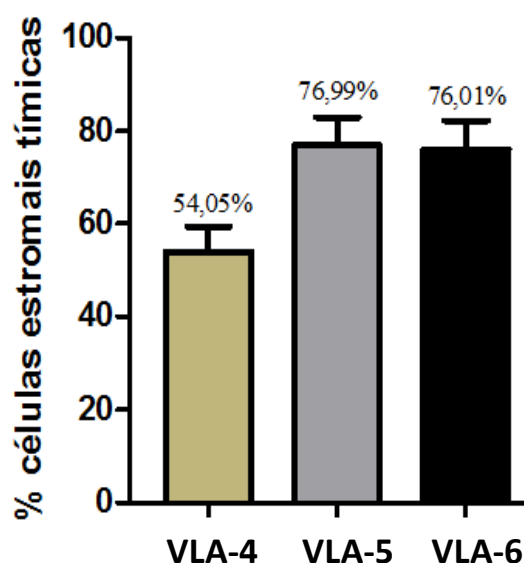
Observou-se ainda, que 68% dessas CETc expressam o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e 32% expressam o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (Figura 9).

Figura 9 - Expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II na superfície das CETc



Fonte: Elaborada pela autora. Porcentagem de células estromais tímicas que expressam MHC-I e MHCII. As barras representam média \pm erro padrão da média, n=16.

Posteriormente, verificou-se que as CETc expressam na sua superfície os receptores do tipo integrinas para moléculas da matriz extracelular, o VLA-4/ α 4 β 1 (54%) e VLA-5/ α 5 β 1 (77%) receptores para a fibronectina e o VLA-6/ α 6 β 1 (76%) receptor para a laminina (Figura 10).

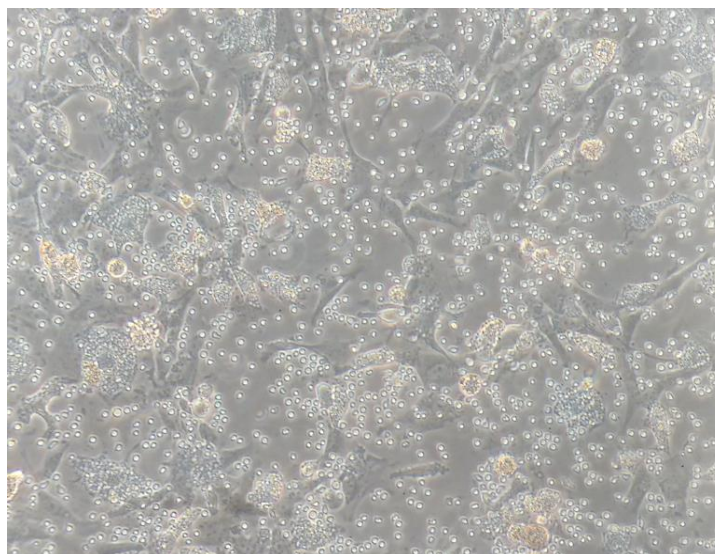
Figura 10 - Expressão dos receptores da matriz extracelular na superfície das CETc

Fonte: Elaborada pela autora. Porcentagem de células estromais tímicas que expressam as integrinas VLA-4, VLA-5 (receptor para fibronectina) e VLA-6 (receptor para laminina). As barras representam média \pm erro padrão da média, n=18.

5.2 Efeito do IGF-1 sobre viabilidade dos timócitos co-cultivados com CETc

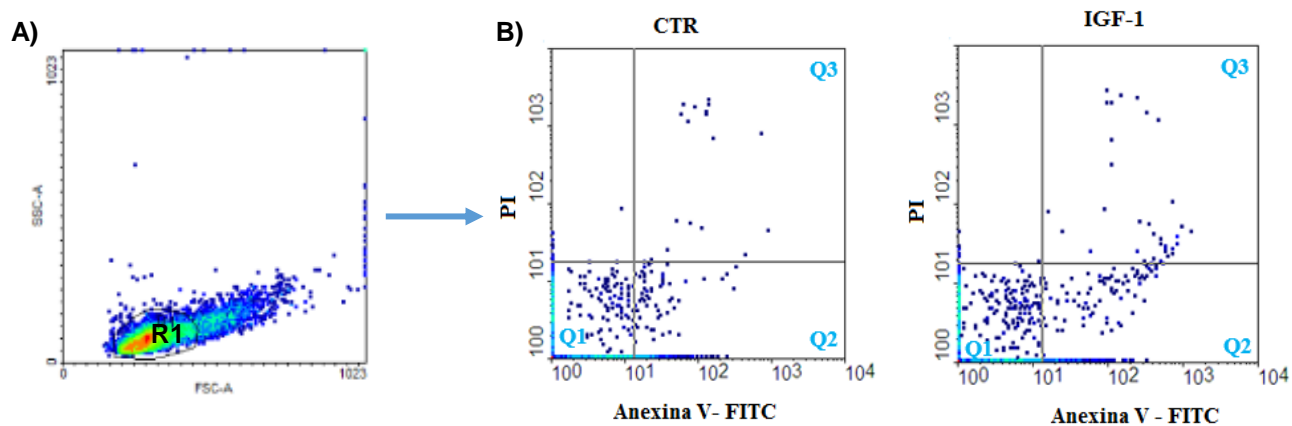
Após a co-cultura das CETc com timócitos e tratamento com IGF-1 por 72 horas (Figura 11), buscou-se verificar se esse modelo experimental estabelecido seria capaz de interferir na viabilidade ou apoptose dos timócitos. Para isso foi realizada a detecção da externalização da fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática por citometria de fluxo, utilizando a proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e o marcador de viabilidade iodeto de propídeo (PI). Como pode ser observado na figura 12 e tabela 2, utilizando o modelo experimental proposto, foi observada uma taxa de 71% de timócitos viáveis e o tratamento com IGF-1 não alterou a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle.

Figura 11 - Timócitos co-cultivados com células estromais tímicas



Fonte: Elaborada pela autora. Fotomicrografia obtida após 72 horas de co-cultivo das CETc e timócitos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Magnitude 400x.

Figura 12 - Perfis citofluorimétricos representativos da viabilidade e apoptose dos timócitos em co-cultura com as CETc



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Delimitação da população de timócitos no *dot plot* tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). (B) Q1: células viáveis (Anexina V⁻/PI⁻), Q2: células em apoptose (Anexina V⁺/PI⁻), Q3: células mortas (Anexina V⁺/PI⁺). Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Tabela 2 - IGF-1 não altera a viabilidade e apoptose dos linfócitos T

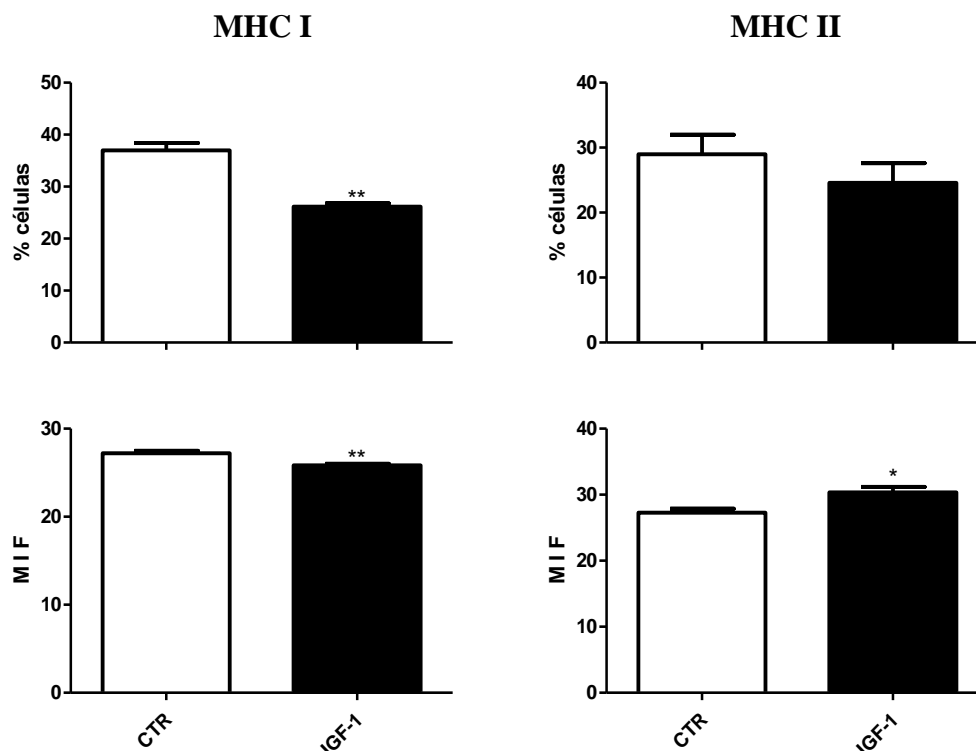
Tratamento	% células viáveis Q1	% células em apoptose recente Q2	% células em apoptose tardia Q3
CTR	71,74 ± 5,72	10,71 h± 4,85	5,09 ± 0,69
IGF-1	72,20 ± 3,50	12,55 ± 6,30	5,08 ± 1,39

Fonte: Elaborada pela autora. Nota: Valores expressos como média ± EPM. n=12.

5.3 Efeito do IGF-1 sobre a expressão de MHC em CETc co-cultivadas com timócitos

Após a co-cultura das CETc com timócitos e tratamento com IGF-1 por 72 horas, foi analisada a expressão de MHC-I e MHC-II na superfície das CETc. Verificou-se que após o tratamento houve uma redução significativa no percentual de células que expressam o MHC-I e também uma redução na média de intensidade de fluorescência (MIF) emitida pelas referidas células. Entretanto, foi observado um aumento significativo na MIF emitida pelas células que expressam MHC-II quando tratadas com IGF-1 e comparadas ao grupo controle (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do IGF-1 sobre a expressão de MHC-I e MHC-II nas CETc

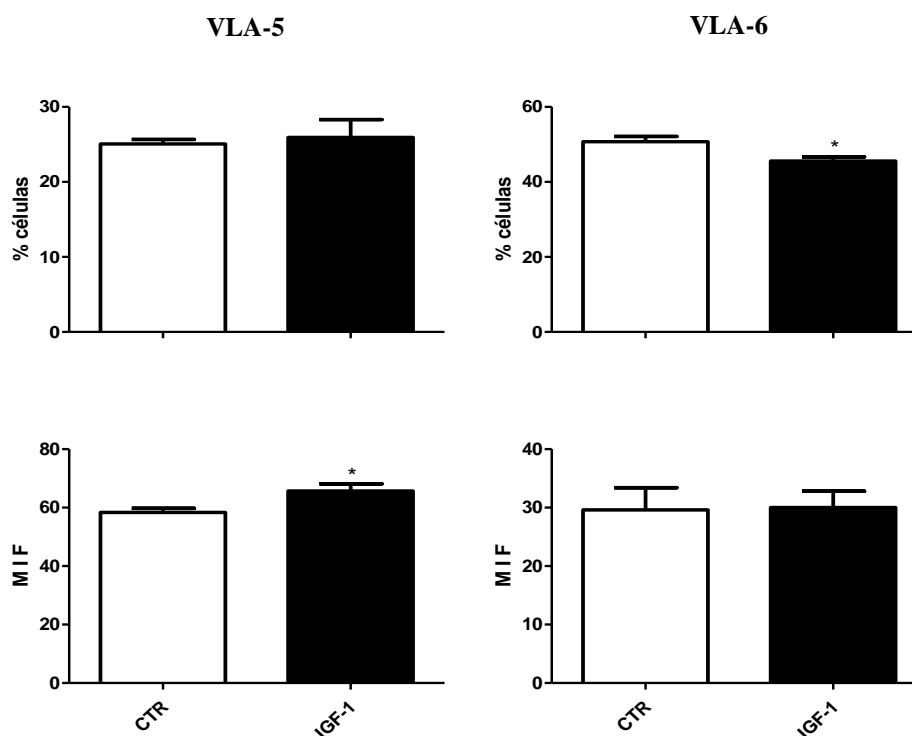


Fonte: Elaborada pela autora. Painel superior representa o percentual de CETc que expressa as moléculas MHC-I e MHC-II. Painel inferior representa a expressão de MHC-I e II indicados pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Os dados estão representados pela média \pm EPM ($n=10$). A análise estatística foi feita com o teste T. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

5.4 IGF-1 modula a expressão de receptores e a deposição de moléculas da matriz extracelular nas CETc co-cultivadas com timócitos

Foi avaliado se o IGF-1 é capaz de alterar a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície das CETc após a co-cultura. O tratamento com IGF-1 aumentou significativamente a MIF emitida pelas células que expressam VLA-5 e reduziu de maneira significativa o percentual de células que expressam a integrina VLA-6 em sua superfície (Figura 14).

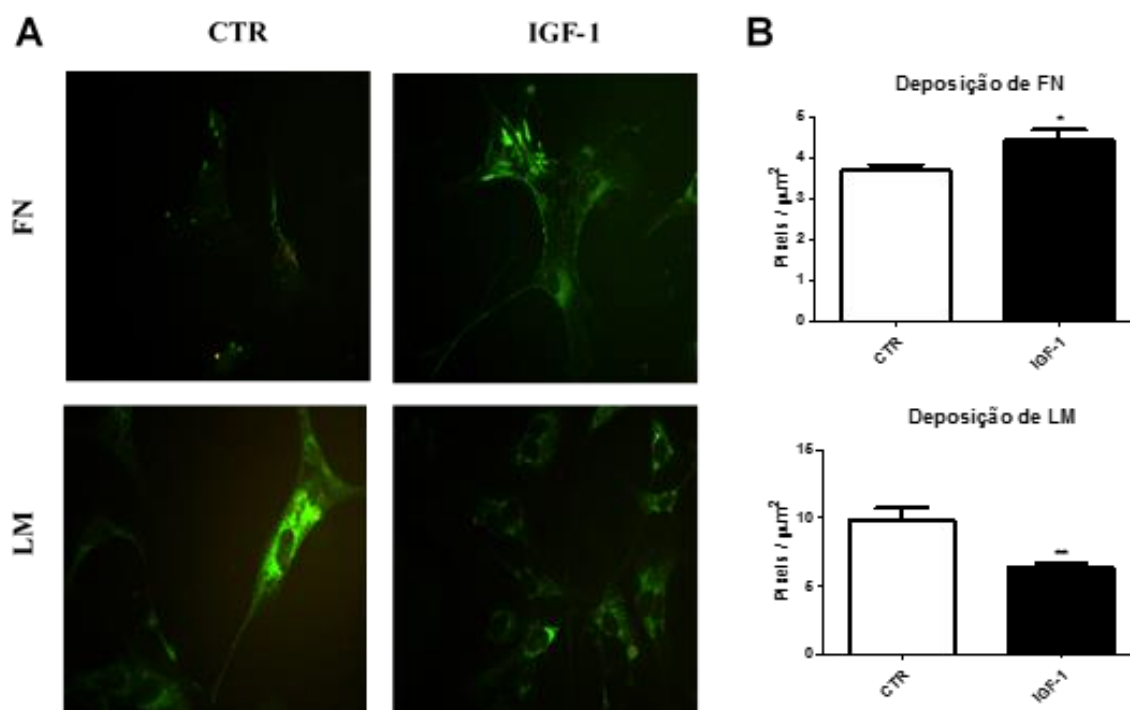
Figura 14 - Efeito do IGF-1 sobre a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 nas CETc



Fonte: Elaborada pela autora. Painel superior representa o percentual de CETc que expressa as integrinas VLA-5 e VLA-6. Painel inferior representa a expressão de VLA-5 e VLA-6 indicados pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Os dados estão representados pela média \pm EPM (n=6). A análise estatística foi feita com o teste T. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. *p \leq 0,05.

Com o propósito de avaliar a influência do IGF-1 na deposição de moléculas da matriz extracelular nas CETc após co-cultura com os linfócitos T, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência com marcadores específicos para fibronectina (FN) e laminina (LM). Constatou-se pela análise qualitativa que o tratamento com o IGF-1 foi capaz de aumentar a deposição de fibronectina e reduzir a deposição de lamina (Figura 15A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou de maneira significativa os resultados obtidos por imunofluorescência (Figura 15B).

Figura 15 - Efeito do IGF-1 sobre a deposição das moléculas da matriz extracelular nas CETc após co-cultivo com linfócitos T



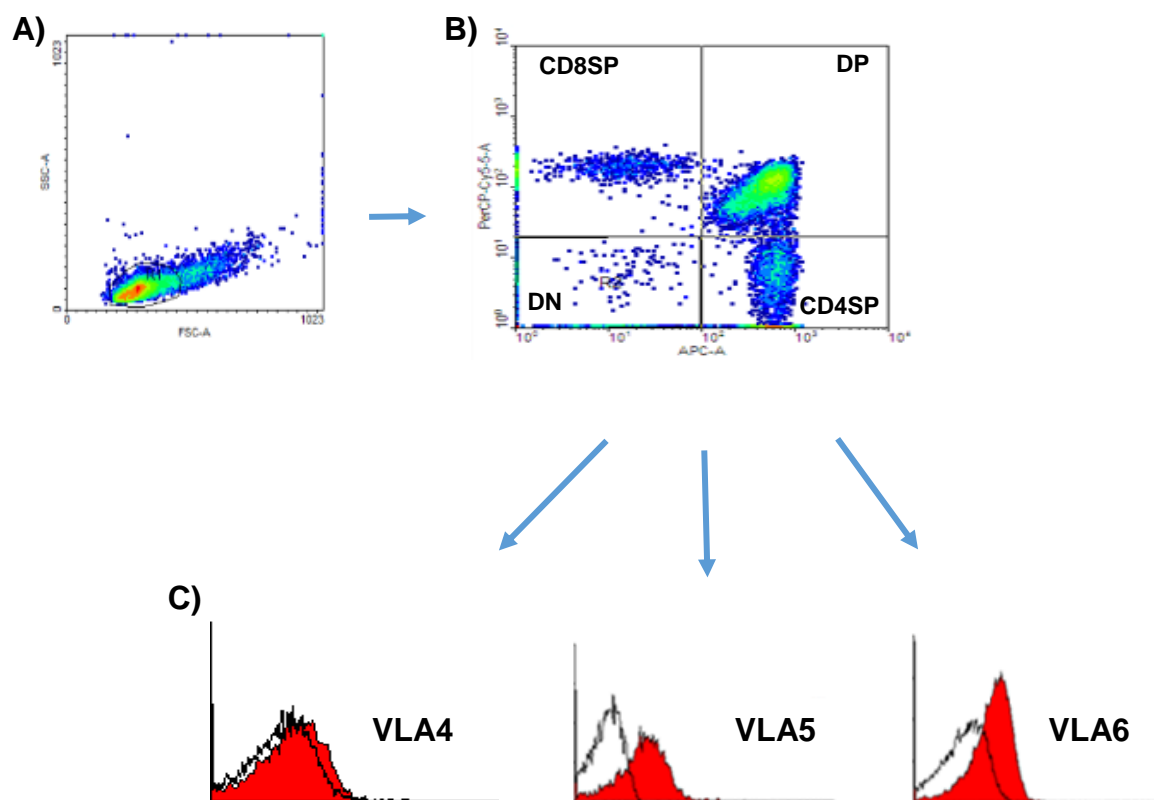
Fonte: Elaborada pela autora. (A) Painel superior: marcação para fibronectina. Painel inferior: marcação para laminina. Magnitude 400x. (B) Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência da fibronectina (superior) e da laminina (inferior). Barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência (n=10). Os dados estão representados pela média \pm EPM. A análise estatística foi feita com o teste T. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01.

5.5 IGF-1 não modula a expressão das integrinas na superfície de timócitos

Tendo em vista a interferência do IGF-1 na deposição das moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, nas células do microambiente tímico, foi avaliado se esse hormônio poderia interferir na expressão das integrinas VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$), ambas, receptores para fibronectina e VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$), receptor para laminina, na superfície dos timócitos. Para isso, foi utilizada a análise por citofluorimetria e avaliada a expressão das moléculas na superfície das diferentes subpopulações (Figura 16). Foi constatado um baixo percentual de timócitos que

expressam a integrina VLA-4 e o tratamento com IGF-1 não foi capaz de alterar esta expressão quando comparado ao grupo controle ($6,44 \pm 0,28$ vs $7,84 \pm 0,57$). Em relação a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6, foi notado que um alto percentual de timócitos expressam estes receptores. Entretanto, o IGF-1 não foi capaz de alterar a expressão dessas integrinas na superfície dos timócitos (Figuras 17 e 18). O tratamento com IGF-1 também não foi capaz de alterar a média de intensidade de fluorescência dessas integrinas nas diferentes subpopulações de timócitos (Tabela 3).

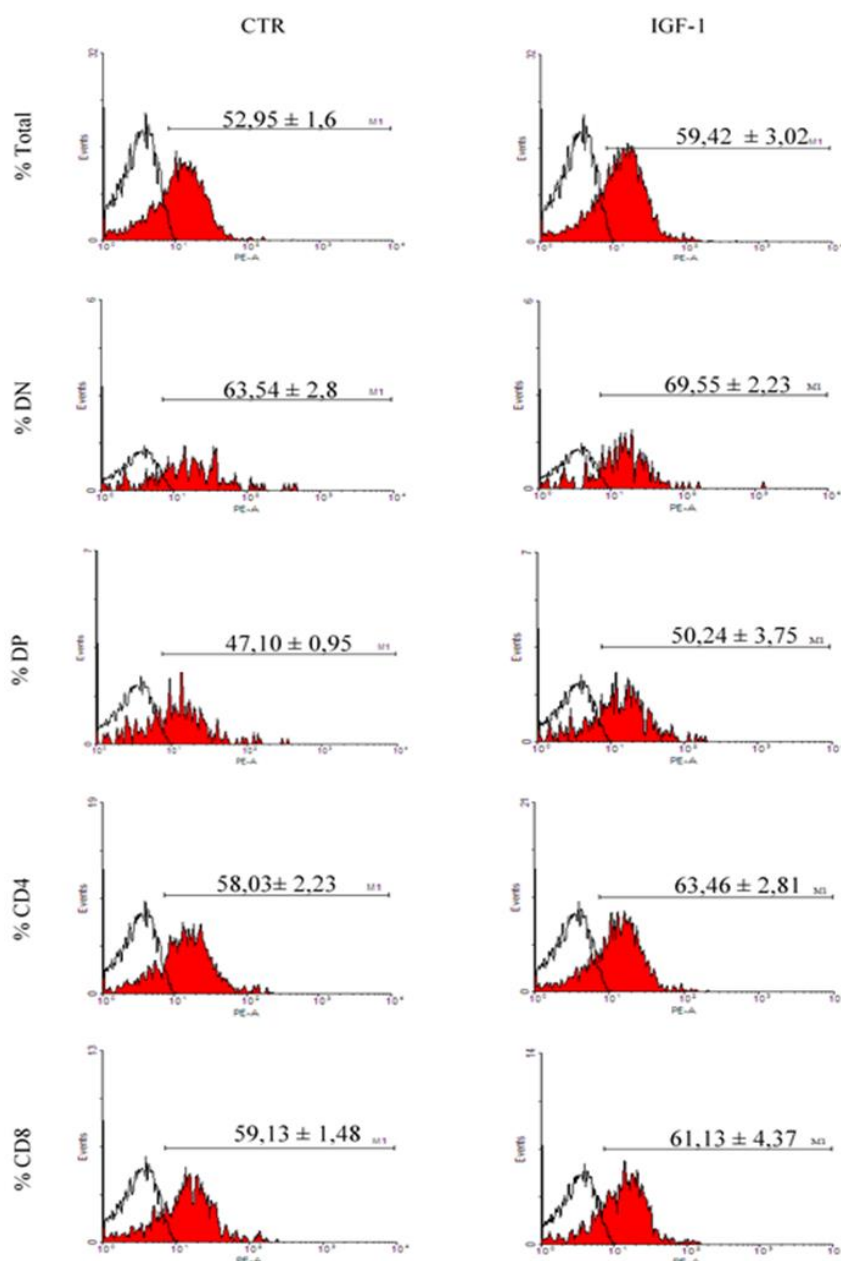
Figura 16 - Esquema representativo das subpopulações de timócitos para avaliar a expressão da integrinas nas análises de citometria de fluxo.



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Delimitação da população de timócitos no *dot plot* tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). (B) *dot plot* CD4 APC x CD8 PerCP feito a partir da população de timócitos definida em A, mostrando as diferentes subpopulações de timócitos, em que DN= duplo-negativo (CD4⁻CD8⁻); DP = duplo-positivo CD4⁺CD8⁺; CD4SP= CD4 simples-positivo (CD4⁺CD8⁻); CD8SP= CD8 simples-positivo (CD4⁻CD8⁺). (C) Histogramas da expressão de VLA4, VLA5 e VLA6 em

timócitos totais, e em cada subpopulação. Cada marcador foi determinado pelo seu respectivo controle negativo.

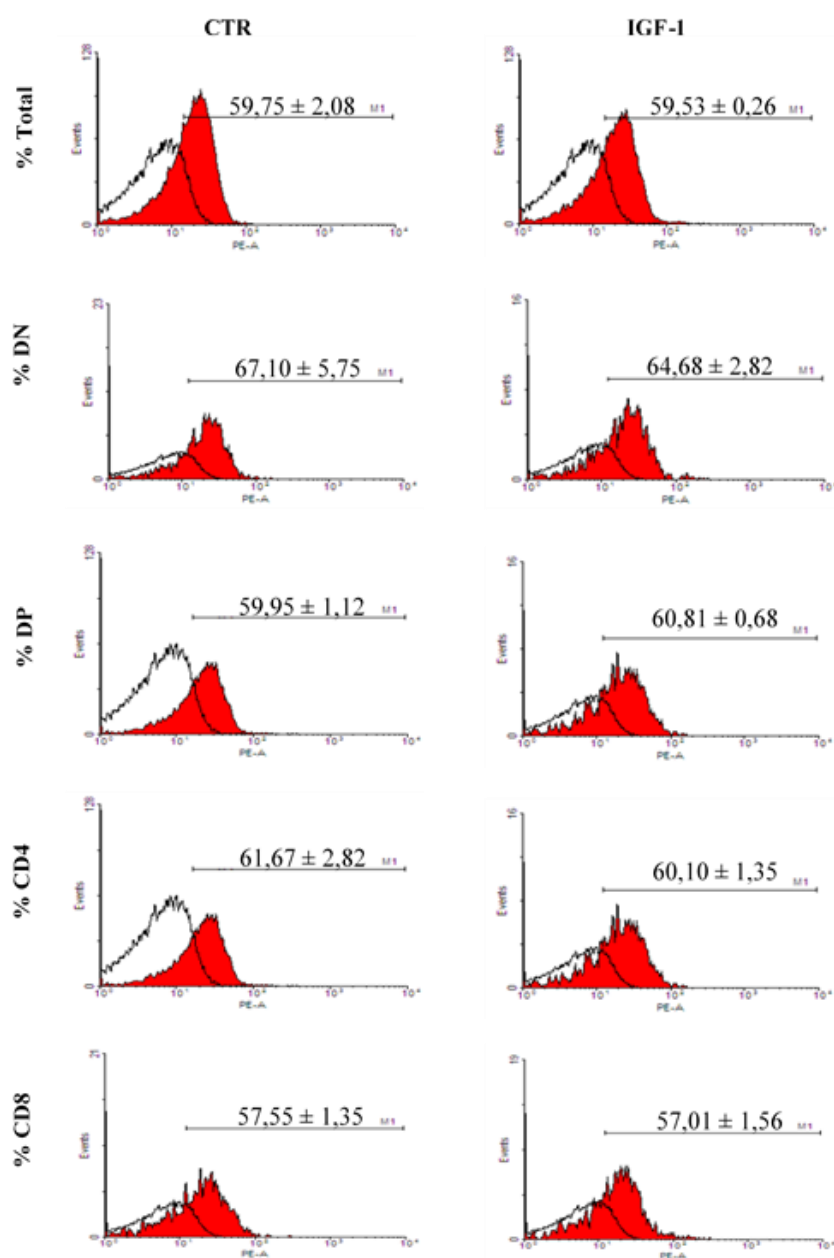
Figura 17 - Efeito do IGF-1 na expressão da integrina VLA-5 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8



Fonte: Elaborada pela autora. Histogramas de citometria de fluxo representando a expressão membranar da integrina VLA-5 (vermelho cheio) nos timócitos. O controle de marcação foi realizado com imunoglobulina não relacionada (preto vazado). Os timócitos foram submetidos

a co-cultura com as CETc durante 7 dias, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os dados estão representados pela média ± EPM (n= 7).

Figura 18 - Efeito do IGF-1 na expressão da integrina VLA-6 no total de timócitos e nas subpopulações definidas por CD4 e CD8



Fonte: Elaborada pela autora. Histogramas de citometria de fluxo representando a expressão membranar da integrina VLA-6 (vermelho cheio) nos timócitos. O controle de marcação foi realizado com imunoglobulina não relacionada (preto vazado). Os timócitos foram submetidos a co-cultura com as CETc durante 7 dias, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os dados estão representados pela média ± EPM (n= 7).

Tabela 3 – Média de intensidade de fluorescência das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície de timócitos totais e nas subpopulações CD4/CD8 em co-cultura com CETc e tratamento com IGF-1

VLA-5	Células	MIF CTR	MIF IGF-1
	Total		18.97 ± 0.67
DN		19.72 ± 1.39	19.60 ± 0.62
DP		17.71 ± 0.35	16.98 ± 0.83
CD4SP		17.91 ± 0.65	17.70 ± 0.54
CD8SP		18.32 ± 0.61	17.96 ± 0.53

VLA-6	Células	MIF CTR	MFI IGF-1
	Total		31.33 ± 2.05
DN		30.53 ± 2.03	28.17 ± 0.64
DP		32.88 ± 2.09	31.65 ± 0.49
CD4SP		30.07 ± 1.88	27.56 ± 0.28
CD8SP		28.34 ± 2.70	26.27 ± 0.71

Fonte: Elaborada pela autora. Valores expressos como média ± EPM. n=7.

5.6 IGF-1 modula a expressão do receptor de IL-7 em linfócitos

Sabe-se que a interleucina-7 (IL-7) é essencial para o desenvolvimento e proliferação dos linfócitos T no timo e para a manutenção e restauração da homeostase das células T maduras. Diante disso objetivou-se avaliar a ação do IGF-1 sobre a expressão do receptor de IL-7 (IL-7R) na superfície dos timócitos totais e suas diferentes subpopulações. Ao utilizar a técnica de citometria de fluxo foi

possível observar que o tratamento com IGF-1 reduziu significativamente o percentual de timócitos CD8SP (CD4⁻CD8⁺) que expressam em sua superfície o IL-7R e também reduziu a MIF emitida pelos timócitos DN (CD4⁻CD8⁻). No entanto, o IGF-1 aumentou de maneira significativa a MIF para a molécula IL-7R na população total de timócitos e na subpopulação CD4SP (CD4⁺CD8⁻) (Tabela 4).

Tabela 4 - Expressão do receptor de IL-7 na superfície de timócitos totais e nas subpopulações CD4/CD8 em co-cultura com CETc e tratamento com IGF-1

A)	Células	% CTR	% IGF-1
	Total	79,33 ± 3,00	78,03 ± 2,02
	DN	89,47 ± 2,20	85,83 ± 1,87
	DP	61,40 ± 2,75	58,24 ± 3,64
	CD4SP	84,73 ± 0,94	81,90 ± 1,82
	CD8SP	29,86 ± 3,42	19,93 ± 1,03 *

B)	Células	MIF CTR	MFI IGF-1
	Total	220,44 ± 22,90	284,44 ± 18,85 *
	DN	86,85 ± 2,45	72,70 ± 0,76 **
	DP	116,24 ± 3,50	127,8 ± 4,60
	CD4SP	45,27 ± 0,36	51,18 ± 1,73 *
	CD8SP	62,21 ± 0,92	60,71 ± 0,73

Fonte: Elaborada pela autora. (A) Porcentagem de timócitos que expressam IL-7R. (B) Média de intensidade de fluorescência (MIF) emitida pelos timócitos que expressam IL-7R.

Nota: A análise estatística foi feita com o teste T. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. *p≤0,05; **p≤0,01.

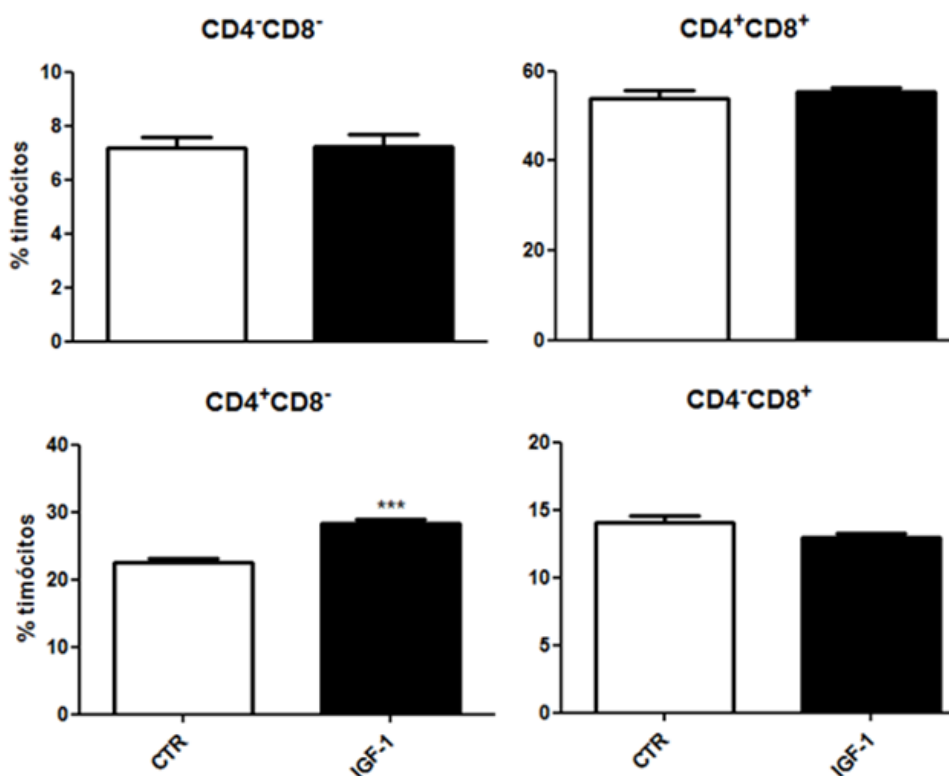
5.7 Efeitos do IGF-1 nas subpopulações dos timócitos co-cultivados com CETc

As células duplo negativas (DN) podem ser subdivididas de acordo com quatro sub-etapas de desenvolvimento, DN1, DN2, DN3 e DN4, baseadas principalmente, na expressão de duas moléculas de superfície celular: o CD25 (IL-2R α), cadeia α do receptor de IL-2, e o CD44 (Pgp-1), receptor para ácido hialurônico e fibronectina.

Investigou-se por citometria de fluxo o desenvolvimento dos timócitos quanto ao fenótipo DN e nenhuma interferência do tratamento com IGF-1 foi observada nessa população estudada (dados não mostrados).

Sabendo-se que as interações entre as células do microambiente tímico e timócitos são mediadas pela IL-7, que tem um papel crucial na diferenciação dos linfócitos T, promovendo o rearranjo dos genes da cadeia de TCR, foi observado que o IGF-1 modulou a expressão do IL-7R, buscou-se investigar se o tratamento com IGF-1 seria capaz de interferir no fenótipo CD4/CD8 dos timócitos. Como pode ser observado na figura 19, o IGF-1 foi capaz de aumentar de maneira significativa o número percentual de timócitos CD4SP em co-cultura com as CETc quando comparado ao grupo controle ($22,58 \pm 0,62$ vs $28,34 \pm 0,57$). Entretanto não interfere no número percentual nas demais subpopulações.

Figura 19 - IGF-1 promove o aumento no número percentual de linfócitos CD4SP

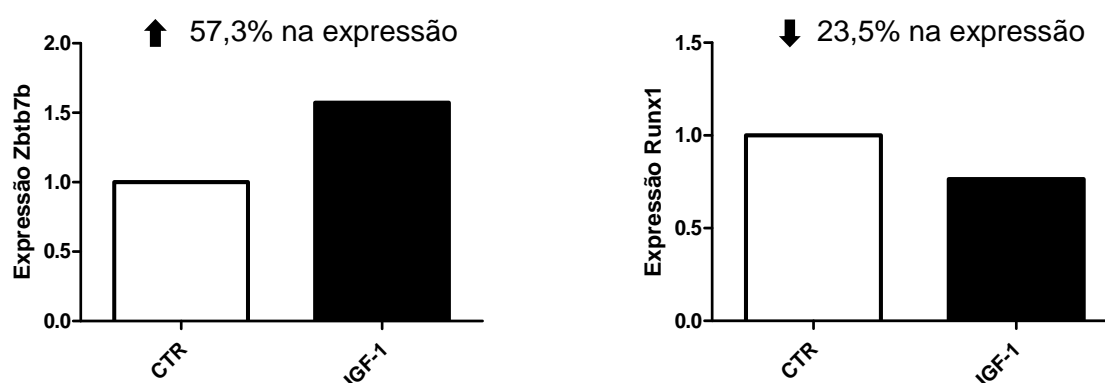


Fonte: Elaborada pela autora. Os timócitos foram submetidos a co-cultura com as CETc durante 3 dias, a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os dados estão representados pela média \pm EPM (n= 18). (***) denota nível de significância comparado ao grupo controle. *p<0,0001.

5.8 IGF-1 promove a expressão de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dos linfócitos T

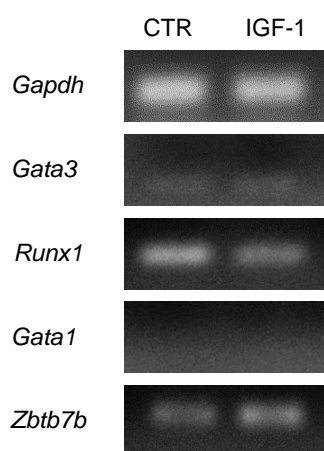
Tendo em vista os achados do efeito do IGF-1 sobre a expressão do linfócito T CD4SP e sabendo que alguns fatores de transcrição estão envolvidos no comprometimento dos linfócitos T com a linhagem CD4SP ou CD8SP, procurou-se determinar se o tratamento com IGF-1 seria capaz de modular a expressão dos fatores de transcrição GATA3 e ThPOK (codificado pelo gene *Zbtb7b*), envolvidos na diferenciação dos linfócitos CD4SP e os fatores de transcrição RUNX1 e RUNX3, envolvidos no comprometimento dos linfócitos T com linhagem CD8SP. Foi realizada a análise por PCR e constatou-se que o tratamento com IGF-1 aumentou em 57,3% a expressão do gene *Zbtb7b* quando comparado ao controle. No entanto, o IGF-1 reduziu em 23,5% a expressão do gene *Runx1* quando comparado ao grupo controle (Figura 20). O tratamento com IGF-1 não foi capaz de interferir sobre a expressão do gene *Gata3* e não houve expressão de *Runx3* entre os grupos testados (Figura 21).

Figura 20 - IGF-1 promove a diferenciação dos linfócitos CD4SP



Fonte: Elaborada pela autora. Expressão do gene *Zbtb7b* e *Runx1* em timócitos co-cultivados com CETc e tratados ou não com IGF-1 durante 3 dias, a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

Figura 21 – IGF-1 modula genes envolvidos na diferenciação dos linfócitos T



Fonte: Elaborada pela autora. Fotomicrografia representativa da amplificação dos produtos dos genes *Gata 3*, *Runx1*, *Gata1* e *Zbtb7b* em timócitos co-cultivados com CETc e tratados ou não com IGF-1 durante 3 dias, a 37°C em estufa com 5% de CO₂, foi analisada por PCR. A expressão contra a proteína constitutiva *Gapdh* foi utilizada como controle para a quantidade de proteína nas amostras.

6. DISCUSSÃO

O timo fornece um microambiente especializado que participa de eventos essenciais na diferenciação intratímica, capaz de gerar um repertório de linfócitos T, restrito ao MHC e tolerante às proteínas próprias do organismo (ANDERSON; JENKINSON, 2001; FAN et al, 2015). O estroma tímico possui fenótipos heterogêneos o que reflete sua especialização funcional, sendo que as células do microambiente tímico, sob controle de diferentes interações moleculares, direcionam o desenvolvimento e maturação dos timócitos (STARR et al, 2003; OHIGASHI; KOZAI; TAKAHAMA, 2016). A função tímica é essencial para a manutenção de um vasto repertório de linfócitos T imunocompetentes, principalmente após a linfodepleção observada nos casos de transplante de células tronco hematopoiéticas, infecção por HIV e o avanço da idade. Além disso, o timo tem um papel crucial na seleção negativa e geração de células T reguladoras. A função tímica quando prejudicada resulta não apenas no aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas, mas também ao aumento do risco de recidiva de tumor (WILLIAMS et al, 2007) e ainda pode ser um fator significativo no desenvolvimento da doença do enxerto contra hospedeiro e autoimunidade. Estratégias para preservar ou aumentar a função tímica pode superar essas importantes barreiras clínicas (CHU et al, 2008). Neste sentido, é possível que o IGF-1 module moléculas que atuam na resposta biológica das células e desempenhe papel relevante na fisiologia do timo e na geração do repertório de linfócitos T.

Em nosso estudo, foi utilizado um sistema de co-cultura *in vitro* para avaliar a influência do IGF-1 sobre a diferenciação de timócitos e suas interações com as células estromais tímicas de camundongos. Inicialmente, foi utilizada a técnica do explante de fragmentos do timo de camundongos para obtenção das células estromais tímicas. Trabalhos demonstraram que a técnica do explante tímico permitiu o estabelecimento de culturas celulares, compostas de uma mistura de fibroblastos e, majoritariamente, células epiteliais (CHAUDHARY et al, 2013). Adicionando a digestão enzimática à técnica do explante tímico, Skogberg e colaboradores (2015) isolaram células epiteliais tímicas corticais e medulares. Mais recentemente, Saldaña e colaboradores (2016), conseguiram isolar células epiteliais tímicas utilizando inicialmente as técnicas de explante tímico e cultura de timo fetal (FTOC).

Os dados aqui apresentados demonstram que o modelo experimental desenvolvido, cultura primária de CETc oriundas do explante tímico, foi capaz de preservar os componentes epiteliais do timo, tanto as cTECs quanto as mTECs, fato de evidente relevância, uma vez que as TECs são componentes essenciais do microambiente tímico, suportando o desenvolvimento dos timócitos e estabelecendo a tolerância aos peptídeos próprios. Neste estudo foi demonstrado que as células estromais expressam em sua superfície MHC-I e II. As CETc ainda expressam as integrinas VLA-4, VLA-5 e VLA-6, importantes para a migração, adesão e diferenciação dos timócitos sobre o substrato de matriz extracelular. Além disso, houve a manutenção dos componentes não epiteliais, como: macrófagos, células dendríticas e fibroblastos, conseguindo mimetizar *in vitro* os componentes celulares do timo essenciais para os processos de migração e diferenciação de timócitos. Todas as células que compõem o estroma tímico, constituído por células epiteliais, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos, são as mantenedoras do órgão, estando presentes desde a organogênese tímica (BLACKBURN; MANLEY, 2004).

Os eventos de proliferação, diferenciação e morte de timócitos ocorrem através da interação com os componentes estromais do timo e sob a influência de vias de sinalização bidirecionais entre timócitos e o microambiente tímico (TAKAHAMA, 2006). Acredita-se que um dos fatores que contribuíram para a viabilidade dos timócitos observados nesse estudo, seja o fato do nosso modelo experimental possibilitar o contato direto dos timócitos em desenvolvimento com as células estromais tímicas. Nossa hipótese corrobora com o estudo de Azghadi e colaboradores (2016) que mostrou um menor percentual de apoptose em timócitos co-cultivados com células estromais mesenquimais quando comparado aos timócitos cultivados isoladamente.

Levando-se em conta as inúmeras interações que ocorrem durante o processo de maturação intratímica dos timócitos, a modulação observada no fenótipo CD4/CD8 dos linfócitos T, pode ser também resultado da alteração na deposição de componentes da matriz extracelular no microambiente tímico. A matriz extracelular é constituída por um complexo de moléculas que está presente em todos os tecidos e órgãos, sendo essenciais nos processos de migração, diferenciação e maturação celular (BERRIER; YAMADA, 2007). No timo, a matriz extracelular forma uma rede estrutural constituída por moléculas que apresentam grande atividade de ligação entre si e com receptores expressos na superfície celular. Tais moléculas

correspondem a proteínas fibrosas como os colágenos e a elastina, as glicoproteínas, os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos. As glicoproteínas da MEC, tais como laminina e fibronectina, estão distribuídas de forma heterogênea no parênquima tímico, sendo produzidas por distintas células do microambiente (SAVINO et al, 2004). Diante disso, foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta nas CETc, utilizando anticorpos específicos para fibronectina e laminina, o que permitiu observar uma maior deposição de fibronectina nas CETc tratadas com IGF-1. Esses achados estão de acordo com estudo de Viana e colaboradores (2015), no qual células endoteliais tímicas apresentaram uma maior deposição de fibronectina após tratamento com IGF-1. Em concordância com esses resultados, outras substâncias também são capazes de modular a deposição de glicoproteínas. Como por exemplo, glicocorticóides e hormônios tireoidianos, os quais estimulam a deposição de moléculas de MEC, como fibronectina, laminina e colágeno IV, por células epiteliais tímicas (LANNES-VIEIRA et al, 1991; RIBEIRO-CARVALHO et al, 2007).

A diferenciação intratímica dos linfócitos T é um processo dependente da migração celular, envolvendo os eventos de adesão e de-adesão com a participação de ligantes e receptores de MEC (SAVINO et al, 2004). As integrinas são heterodímeros $\alpha\beta$ presentes na superfície celular que medeiam as interações entre o ambiente extracelular e o citoesqueleto de actina, sendo importante na regulação da migração celular e nas adesões celulares à MEC. A cadeia $\alpha 4$ liga-se à sub-unidade $\beta 1$ formando o receptor de fibronectina (VLA-4; $\alpha 4\beta 1$) e a cadeia $\alpha 5$ liga-se à sub-unidade $\beta 1$ formando outro receptor de fibronectina (VLA-5; $\alpha 5\beta 1$). Já a cadeia $\alpha 6$ liga-se à sub-unidade $\beta 1$ formando o receptor de laminina (VLA-6; $\alpha 6\beta 1$) (HUMPHRIES et al, 2006). Estudos realizados por Dalmau; Freitas; Savino (1999) utilizando timócitos humanos demonstraram uma alta expressão das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ distribuídas preferencialmente em timócitos DN, DP e CD4SP, o que sugere que no timo humano o aumento na expressão dessas cadeias está primordialmente ligada a transição da subpopulação DN para DP. Com relação a expressão do receptor de laminina na superfície dos timócitos, houve alta expressão da cadeia $\alpha 6$ nos estágios mais precoces da diferenciação dos timócitos para CD4SP ou mais tardio para CD8SP. A manutenção da alta expressão da cadeia $\alpha 6$ em timócitos CD8SP mais maduros pode estar envolvida com a sua localização preferencialmente medular, uma vez que na medula há uma maior densidade de

laminina e de peptídeos-MHC-I quando comparado ao córtex (DALMAU; FREITAS; SAVINO, 1999).

Com o propósito de avaliar o envolvimento do IGF-1 na expressão dessas integrinas, os timócitos provenientes das co-culturas com CETc foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o IGF-1 não foi capaz de modular a expressão das integrinas VLA-4, VLA-5 e VLA-6 na superfície dos timócitos quando comparados ao grupo controle. Segundo Vielkind e colaboradores (2005), as integrinas possuem baixa afinidade quando expressa em células no estado de repouso, mas podem ser estimuladas a mediar a adesão em resposta a quimiocinas e citocinas. Esses estímulos induzem um processo de sinalização “*inside-out*” que está intimamente associado a maior avidéz da integrina ao seu ligante, como resultado do agrupamento de receptores e sua maior mobilidade lateral, o que aumenta sua afinidade. Com isso, não é suficiente verificar o número de receptores na superfície celular, mas se faz necessário analisar o estado de ativação e avidéz dessas moléculas, pois células com elevado número de receptores podem tê-los em estado de repouso, ao passo que mesmo um pequeno número de receptores ativos na membrana celular pode gerar respostas celulares mais evidentes (LINS et al, 2016). Em nosso estudo observou-se que o IGF-1 foi capaz de aumentar a expressão de VLA-5 e diminuir a expressão de VLA-6 na superfície das CETc quando comparado ao grupo controle. De maneira semelhante, foi observado por Smaniotto e colaboradores (2005), que o GH não alterou a expressão membranar dos receptores VLA-4, VLA-5 e VLA-6 nos timócitos. Contudo, foi demonstrado aumento na expressão da integrina VLA-6 no microambiente tímico, sugerindo assim, que os mecanismos que controlam a expressão dessa molécula em tímocitos e em TECs são distintos. Corroborando esta hipótese, foi mostrado por Cotta-de-Almeida e colaboradores (2004), um defeito na expressão do receptor para fibronectina, VLA-5, em timócitos de camundongos diabéticos não obesos (NOD) e essa alteração não foi observada nas TECs dos mesmos animais.

De maneira semelhante aos nossos resultados, estudos envolvendo o silenciamento do gene ITGA6 (codifica a cadeia $\alpha 6$ da integrina CD49f/VLA-6) revelaram diminuição na expressão de MHC-I (GOLBERT, 2013), mostrando que pode haver uma modulação recíproca entre o heterodímero $\alpha 6$ e MHC-I (ZHANG et al 2010). Outra hipótese é que VLA-6 tenha função na sinapse imunológica, estrutura necessária para a apresentação de peptídeos entre as CETc e os timócitos

em diferenciação (HOGG et al 2011; SPRINGER; DUSTIN, 2010). Pois, além da diminuição de expressão de MHC-I, houve aumento de expressão de MHC-II nas CETc tratadas com IGF-1, sugerindo que a diminuição de receptores de laminina possa desviar o processo de seleção positiva, favorecendo a diferenciação de linfócitos CD4SP.

Sabendo que a IL-7 é essencial para o desenvolvimento e proliferação dos linfócitos T no timo e para a manutenção e restauração da homeostase dos linfócitos T maduros, procurou-se avaliar se o tratamento com IGF-1 seria capaz de interferir na expressão de IL-7R. O IL-7R (CD127) é expresso em timócitos, progenitores de células B e T e nos linfócitos T maduros (MAZZUCHELLI et al, 2012). Nossos resultados estão em consonância com a literatura, pois apontam que após a cocultura com as CETc, todas as subpopulações de timócitos expressam em sua superfície o CD127. O tratamento com IGF-1 reduziu significativamente a expressão de IL-7R na subpopulação DN e CD8SP e aumentou significativamente a expressão desse receptor na superfície de timócitos CD4SP. Esse achado pode sugerir que as células CD4SP apresentam uma maior taxa de sobrevivência. Para corroborar essa suposição, foi encontrado um maior percentual desses timócitos, provavelmente devido a maior proliferação e/ou diminuição da taxa de apoptose. Nesse sentido, nossos resultados são consistentes com os relatos em estudos prévios, os quais demonstram que a expressão de IL-7R está inversamente correlacionada com a apoptose e positivamente correlacionada ao aumento na contagem de linfócitos T CD4SP em paciente infectados pelo HIV (KOESTERS et al, 2006). A baixa expressão de IL-7R pode diminuir a produção de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, tornando as células mais susceptíveis à apoptose (COLE et al, 2007). Camundongos deficientes para IL-7 tem uma drástica redução no número de timócitos e uma falha na transição do desenvolvimento de células imaturas para células comprometidas com a linhagem T (ANDERSON et al, 1996). Sugere-se ainda, que esse aumento observado no percentual de linfócitos CD4SP tenha relação com a capacidade do IGF-1 em estimular de maneira direta e específica a proliferação de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), fortalecendo o mecanismo pelo qual esse fator de crescimento modula a qualidade da resposta imune contra insultos inflamatórios (BILBAO et al, 2014). Os linfócitos T reguladores são potentes supressores da resposta inflamatória e cruciais para a manutenção da autotolerância e homeostase imunológica (LEHTIMAKI; LAHESMAA, 2013), fato evidenciado quando o número

reduzido de linfócitos T reguladores têm sido implicado em uma variedade de condições hiperinflamatórias e doenças autoimunes (HUANG; SATTLER, 2011). Essas descobertas fomentaram a aprovação do rhIGF-1 (IGF-1 recombinante humano) pelo FDA (USA Food and Drug administration) como fármaco para o tratamento de doenças autoimunes (BILBAO et al, 2014). Estudos futuros serão realizados com objetivo de avaliar a ação do IGF-1 sobre a proliferação de linfócitos T reguladores.

A população de linfócitos T maduro é dividida em duas linhagens principais definidas pela expressão mutuamente exclusiva das moléculas de superfície CD4 e CD8 (correceptores) e diferem na sua função e restrição ao MHC. Os linfócitos CD4SP são auxiliares e tipicamente restritos ao MHC-II, enquanto os linfócitos CD8SP são citotóxicos e restritos ao MHC-I. Vários fatores de transcrição são conhecidos por controlar o comprometimento com as linhagens CD4 e CD8, incluindo as proteínas ThPOK e GATA3 as quais são necessárias para a diferenciação da linhagem CD4SP e os fatores RUNX1 e RUNX3 contribuem para a diferenciação de linfócitos CD8SP. De modo que os linfócitos CD4 expressam ThPOK, mas não expressam RUNX3, enquanto que o oposto é verdadeiro para os linfócitos CD8SP (WANG; BOSSELUT, 2009). Com isso, propõe-se que esses fatores participam de um ciclo regulador duplamente negativo, no qual ThPOK reprime os genes que codificam RUNX1, RUNX3 e a geração de linfócitos CD8SP, enquanto que a família Runx reprime aqueles que codificam ThPOK e consequentemente a diferenciação de linfócitos CD4SP (MUROI et al, 2008; SETOUGUCHI et al, 2008; EGAWA, LITTMAN, 2008). Dados da literatura demonstram que na ausência de ThPOK, timócitos restrito ao MHC-II em camundongos deficientes para ThPOK são redirecionados para a linhagem CD8 (EGAWA; LITTMAN, 2008), enquanto que a expressão constitutiva de ThPOK em timócitos restritos ao MHC-I redireciona para a linhagem CD4SP. Assim como, o fator RUNX3 é essencial para o comprometimento com a linhagem CD8SP, já que timócitos restrito ao MHC-I são redirecionados a linhagem CD4SP na ausência desse gene (SETOGUCHI et al, 2008). Relatos descritos por Sun; Vitolo; Passaniti (2001), afirmam que o tratamento com IGF-1 estimula a expressão de RUNX2 de maneira dose dependente em células endoteliais humanas.

Em nosso estudo o tratamento com IGF-1 foi capaz de aumentar de maneira significativa a expressão de MHC-II na superfície das CETc e o percentual dos linfócitos CD4SP, além de aumentar a expressão do gene *Zbtb7b*. Esses resultados

sugerem que IGF-1 estimulou a diferenciação dos linfócitos CD4SP via fator de transcrição ThPOK. O fator de transcrição ThPOK não é expresso em timócitos DN, DP e CD8SP, sendo apenas expresso em células CD4SP (LEE et al, 2015). Corroborando nossa hipótese está o fato do tratamento com IGF-1 reduzir a expressão de MHC-I nas CETc e a expressão do gene *Runx1* nos linfócitos T, o que ratifica a influência do IGF-1 no comprometimento com a escolha da linhagem de linfócitos CD4SP. A contribuição deste estudo é relevante para o entendimento da resposta biológica das células e fornece suporte para a aplicação do IGF-1 como alvo terapêutico em distúrbios relacionados a deficiência de linfócitos T CD4SP, como infecção pelo HIV, doenças inflamatórias e autoimunes. No entanto, mais estudos são necessários para assegurar sua eficácia terapêutica e uso seguro nas diferentes desordens imunológicas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o IGF-1 possui efeitos sobre as células estromais tímicas, no tocante à expressão de MHC-I e II, bem como a síntese de matriz extracelular e expressão de integrinas após o contato com timócitos. O tratamento com IGF-1 também é capaz de modular a expressão de IL-7R, aumentar o número percentual dos linfócitos T CD4SP e a expressão do gene *Zbtb7b* em timócitos após contato direto com as CETc.

Em conjunto, nossos dados demonstram a participação do IGF-1 nas interações timócitos/células estromais tímicas, em especial na diferenciação *in vitro* de timócitos em linfócitos CD4⁺, via fator de transcrição ThPOK.

REFERÊNCIAS

AHAMED, J. A; MADHIVADHANI, P. Costimulatory role of CXCR4 with pré-TCR and its crosstalk with PI3K in β -selection of thymocytes. **Sci Signal**. v. 3, p. 1-3, 2010.

AKIYAMA, T; SHINZAWA, M; AKIYAMA, N. TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 278, 2012.

ALEXANDROPOULOS, K; DANZL, N.M. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. **Immunologic Research**. v. 54, p. 177–190, 2012.

ALPDOGAN, O; MURIGLAN, S.J; KAPPEL, B.J, DOUBROVINA, E; SCHMALTZ, C; SCHIRO, R; ENG, J.M; GREENBERG, A.S; WILLIS, L.M; ROTOLO, J.A; O'REILLY, R.J, VAN DEN BRINK, M.R. Insulin-like growth factor-I enhances lymphoid and myeloid reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**. v. 75, p. 1977-1983, 2003.

ANDERSON, G; HARE, K.J; PLATT, N.E; JENKINSON, E.J. Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. **Eur J Immunol**. v. 27, p. 1838-42, 1997.

ANDERSON, G; JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Nat Rev Immunol**. v. 1, p. 31-40, 2001.

ANDERSON, G; MOORE, N.C; OWEN, J.J; JENKINSON, E.J. Cellular interactions in thymocyte development. **Annu Rev Immunol**. v. 14, p. 73-99, 1996.

ANDERSON, G; PONGRACZ, J; PARNELL, S; JENKINSON, E. J. Notch ligandbearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. **Eur. J. Immunol**. v. 31, p. 3349–3354, 2001.

ANDERSON, G; TAKAHAMA, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. **Trends in Immunology**. v. 33, p. 256–263, 2012.

ANGUELA, X.M; TAFURO, S; ROCA, C; CALLEJAS, D; AGUDO, J; OBACH, M; RIBERA, A; RUZO, A; MANN, C.J; CASELLAS, A. Nonviral-mediated hepatic expression of IGF-1 increases Treg levels and suppresses autoimmune diabetes in mice. **Diabetes**. v. 62, p. 551-560, 2013.

ARENAS, L. A. S; ZURBARÁN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de La célula. **Salud Uninorte**. v.16, p. 9-18, 2002.

AZGHADI, S.M.R; SUCIU, M; GRUIA, A.T; BARBU-TUDORAN, L; CRISTEA, M.I; MIC, A.A; MUNTEAN, D; NICA, D.V; MIC, F.A. Mesenchymal stromal cells support

the viability and differentiation of thymocytes through direct contact in autologous co-cultures Lipid Droplets. **Histochem Cell Biol.** v. 146, p. 153-165, 2016.

BADOLATO, R; BOND, H.M; VALERIO, G. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 79, p. 984-990, 1994.

BARTHLOTT, T; KELLER, M. P; KRENGER, W; HOLLANDER, G. A. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. **Swiss Med Wkly.** v. 136, p. 365-369, 2006.

BELIZÁRIO, J.E; BRANDÃO, W; ROSSATO, C; PERON, J.P. Thymic and Postthymic Regulation of Naive CD4+ T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models. *Mediators of Inflammation.* v. 2016, p. 1-16, 2016.

BENDER, T.P; KREMER, C.S; KRAUS, M; BUCH, T; RAJEWSKY, K. Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. **Nat. Immunol.** v. 5, p. 721–729, 2004.

BERNABEI, P; BOSTICARDO, M; LOSANA, G; REGIS, G; PAOLA, F; ANGELIS, S; GIOVARELLI, M; NOVELLIF. 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.

BERRIER, A. L; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. **J Cell Physiol.** v. 213, p. 565-573, 2007.

BESSEYRIAS, V; FIORINI, E; STROBL, L.J; ZIMBER-STROBL, U; DUMORTIER, A; KOCH, U; ARCANGELI, M.L; EZINE, S; MACDONALD, H.R; RADTKE, F. Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. **The Journal of experimental medicine.** v. 204, p. 331-43, 2007.

BLACKBURN, C.C; MANLEY, N.R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nat Rev Immunol.** v. 4, p. 278-89, 2004.

BLEUL, C. C; CORBEAUX, T; REUTER, A; FISCH, P; MÖNTING, J. S; BOEHM, T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. **Nature.** v. 441, p. 992-996, 2006.

BODEY, B; SIEGEL, S.E; KAISER, H.E. Antigen presentation by dendritic cells and their significance in antineoplastic immunotherapy. **In Vivo.** v. 18, p. 81-100, 2004.

BRAHMKHATRI, V,P; PRASANNA, C; ATREYA, H, S. Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. **BioMed Res Int.** v. 2015, p. 1-24, 2015.

BROCARD, M.G; SCHILLACI, R; GALEANO, A; RADRIZZANI, M; WHITE, V; GUERRICO, A.G; SANTA-COLOMA, T.A; ROLDÁN, A. Early effects of insulin-like growth factor-1 in activated human T lymphocytes. **J Leukoc Biol.** v. 70, p. 297–305, 2001.

CHAUDHARY, D.K; SOOD, N; SWAMINATHAN, T. R; RATHORE, G; PRADHAN, P. K; AGARWAL, N. K; JENA, J. K. Establishment and characterization of an epithelial cell line from thymus of *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Gene**. v. 2013, p. 546-553, 2013.

CHU, Y.W; SCHMITZ, S; CHOUDHURY, B; TELFORD, W; KAPOOR, V; GARFIELD, S; HOWE, D; GRESS, R.E. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. **Blood**. v. 112, p. 2836-2846, 2008.

CIOFANI, M; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoieses. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v. 23, p. 463-493, 2007.

COLLE, J.H; MOREAU, J.L; FONTANET, A; LAMBOTTE, O; DELFRAISSY, J.F; THÈZE, J. The correlation between levels of IL-7 α expression and responsiveness to IL-7 is lost in CD4 lymphocytes from HIV infected patients. **AIDS**. v. 21, p. 101-3, 2007.

COLLINS, A; LITTMAN, D.R; TANIUCHI, I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. **Nat. Rev. Immunol**. v. 9, p. 106–115, 2009.

COSGROVE, D; CHAN, S.H.; WALTZINGER, C; BENOIST, C; MATHIS, D. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4 T cells. **Int. Immunol**. v. 4, p. 707–710, 1992.

COTTA-DE-ALMEIDA, V; VILLA-VERDE, D. M. S; LEPAULT, F; PLÉAU, J; DARDENE, M; SAVINO, W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor defect. **Eur J Immunol**. v. 34, p. 1578-1587, 2004.

DALMAU, S.R; FREITAS, C.S; SAVINO, W. Upregulated Expression of Fibronectin Receptors Underlines the Adhesive Capability of Thymocytes to Thymic Epithelial Cells During the Early Stages of Differentiation: Lessons From Sublethally Irradiated Mice. **Blood**. v. 93, p. 974-990, 1999.

DANIELSEN, A; LARSEN, E; GAMMELTOFT, S. Chromaffin cells express two types of insulin-like growth factor receptors. **Brain Res**. v. 5, p. 95–100, 1990.

DAUGHADAY WH, HALL K, SALMON WD, JR VAN DEN BRANDE JL, VAN WYK FJJ. On the nomenclature of somatomedins and insulin-like growth factors. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 65, p. 1075-1076, 1987.

DE SOUZA, L. R; TRAJANO, V; SAVINO, W. Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? **Dev Immunol**. v. 3, p.123-135, 1993.

EGAWA, T; LITTMAN, D.R. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. **Nat Immunol**. v. 9, p. 1131–1139, 2008.

FAN, Y; TAJIMA, A; GOH, S.K; GENG, X; GUALTIEROTTI, G; GRUPILLO, M; COPPOLA, A; BERTERA, S; RUDERT, W.A; BANERJEE, I; BOTTINO, R; TRUCCO, M. Bioengineering Thymus Organoids to Restore Thymic Function and Induce Donor-Specific Immune Tolerance to Allografts. **Molecular Therapy**. v. 23, p. 1262-1277, 2015.

FELLI, M.P; MARODER, M; MITSIADIS, T.A; CAMPESE, A. F; BELLAVIA, A. VACCA, R. S. MANN, L. FRATI, U. LENDAHL, A. GULINO, AND I. SCREPANTI.. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int. Immunol.* v. 11, p. 1017–1025, 1999.

FIRTH, S.M; BAXTER, R.C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocr Rev**. v. 23, p. 824-854, 2002.

FISCHER, A.M; KATAYAMA, C.D; PAGES, G; POUYSSEGUR, J; HEDRICK, S.M. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. **Immunity**. v. 23, p. 431–443, 2005.

FOWLKES, J.L. Insulin-like growth factor-binding protein proteolysis: an emerging paradigm in insulin-like growth factor physiology. **Trends Endocrinol Metab**. v. 8, p. 299-306, 1997.

FÜRSTENBERGER, G; SENN, H.J. Insulin-like growth factors and cancer. **Lancet Oncol**. v. 3, p. 298–302, 2002.

GAGNERAULT, M. POSTEL-VINAY, M. DARDENNE, M. Expression of growth hormone receptors in murine lymphoid cells analyzed by flow cytometry. **Endocrinology**. v. 137, p. 1719-1726, 1996.

GAMEIRO, J; NAGIB, P. R. A; VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. **Cell Adh Migr**. v. 4, p. 382-390, 2010.

GARCÍA, M.G.R; TAMAYO, F.G. The Importance of the Nurse Cells and Regulatory Cells in the Control of T Lymphocyte Responses. **BioMed Research. Inter**. v. 2013, p. 1-15, 2013.

GIANUZZI, X; PALMA-ARDILES, G; HERNANDEZ-FERNANDEZ W. Insulin growth factor (IGF) 1, IGF-binding proteins and ovarian cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Maturitas**. p. 22-29, 2016.

GORDON, J; WILSON, A. A; BLAIR, N. F; SHERIDAN, J; FARLEY, A; WILSON, L; MANLEY, N. R. M; BLACKBURN, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. **Nature Immunol**. v. 5, p. 546- 553, 2004.

GRAHAM, A; HARMAN, B. C; HARE, K. J. JENKINSON, E. J. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. **Seminars in Immunology**. v. 12, p. 457-464, 2000.

GRAY, D. H. D; UENO, T; CHIDGEY, A. P; MALIN, M; GOLDBERG, G. L; TAKAHAMA, Y; BOYD, R. L. Controlling the thymic microenvironment. **Curr Opin Immunol**. v. 17, p. 137-143, 2005.

GRAY, D.H; TULL, D; UENO, T; SEACH, N; CLASSON, B.J; CHIDGEY, A; MCCONVILLE, M.J; BOYD, R.L. A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. **J Immunol**. v. 15, p. 4956-65, 2007.

GUERDER, S; VIRET, C; LUCHE, H; ARDOUIN, L; MALISSEN, B. Differential processing of self-antigens by subsets of thymic stromal cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 99–104, 2012.

HATTORI, N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immunesystem. **Growth Hormone IGF Res**. v. 19, p. 187–197, 2009.

HE, X; HE, X; DAVE, V.P; ZHANG, Y; HUA, X; NICOLAS, E; XU, W; ROE, B.A; KAPPES, D.J. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*. v. 433, p. 826–833, 2005.

HENDRIKS, R.W; NAWIJN, M.C; ENGEL, J.D; VAN, D.H; GROSVELD, F; KARIS, A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. **Eur J Immunol**. v. 29, p. 1912-1918, 1999.

HIROKAWA, K; UTSUYAMA, M; KIKUCHI, Y. Trade off situation between thymus and growth hormone: age-related decline of growth hormone is a cause of thymic involution but favorable for elongation of lifespan. **Biogerontology**. v. 17, p. 55-59, 2016.

HO, I.C; TAI, T.S; PAI, S.Y. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after Thelper-2-cell differentiation. **Nat Rev Immunol**. v. 9, p. 125–135, 2009.

HOGG, N; PATZAK, I; WILLENBROCK, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. **Nature Reviews Immunology**. v. 11, p. 416-426, 2011.

HOSOYA, T; KUROHA, T; MORIGUCHI, T; CUMMINGS, D; MAILLARD, I; LIM, K.C; ENGEL, J.D. GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. **J Exp Med**. v. 206, p. 2987–3000, 2009.

HUANG, F.P; SATTLER, S. Regulatory T Cell deficiency in systemic autoimmune disorders – causal relationship and underlying immunological mechanisms. **Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects**. p. 111-126, 2011.

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.

IMAI, Y; SHIMAOKA, M; KUROKAWA, M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. **Int J Hematol**. v. 91, p. 569-575, 2010.

INGHAM, K.C; BREW, S.A; ERICKSON, H.P. Localization of a Cryptic Binding Site for Tenascin on Fibronectin. **J Biol Chem.** v. 279, p. 132-135, 2004.

JANEWAY, C. A; TRAVERS, P; WALPORT, M. **Imunobiologia** – O sistema imunológico na saúde e na doença. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JENKINSON, W. E; BACON, A; WHITE, A. J; ANDERSON, G; JENKISON, E. J. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. **J Immunol.** v. 181, p. 6101-6108, 2008.

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

KAPPES, D.J. Expanding roles for ThPOK in thymic development. **Immunol Rev.** v. 238, p. 182-194, 2010.

KEEFE, R; DAVE, V; ALLMAN, D; WIEST, D; KAPPES, D.J. Regulation of lineage commitment distinct from positive selection. **Science.** v. 286, p. 1149–1153, 1999.

KELLEY, K.W; MEIER, W.A; MINSHALL, C. Insulin growth factor-1 inhibits apoptosis in hematopoietic progenitor cells. Implications in thymic aging. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 840, p. 518-524, 1998.

KENINS, L; GILL, J.W; HOLLANDER, G.A; WODNAR-FILIPOWICZ, A. Flt3 ligand-receptor interaction is important for maintenance of early thymic progenitor numbers in steady-state thymopoiesis. **Eur J Immunol.** v. 40, p. 81–90, 2010.

KIM, M. G; LEE, G; LEE, S; LOLKEMA, M; YIM, J; HONG, S. H; SCHWARTZ, R. H. Epithelial Cell-specific laminin 5 s required for survival of early thymocytes. **J of Immunol.** v. 165, p.192-201, 2000.

KLEFFENS, M.V; GROFFEN, C; LINDENBERGH-KORTLEVE, D.J; VAN, N.J.W; GONZÁLEZ-PARRA, S; DITS, N; ZWARTHOFF, E.C; DROP, S.L. The IGF system during fetal-placental development of the mouse. **Mol Cell Endocrinol.** v. 140, p. 129-35, 1998.

KOESTERS, S.A; ALIMONTI, J.B; WACHIHI, C; MATU, L; ANZALA, O; KIMANI, J; EMBREE, J.E; PLUMMER, F.A; FOWKE, K.R. IL-7Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. **Eur J Immunol.** v. 36, p. 336-44, 2006.

KOOIJMAN, R; WILLEMS, M; RIJKERS, G.T. Effects of insulin-like growth factors and growth hormone on the in vitro proliferation of T lymphocytes. **J. Neuroimmunol.** v. 38, p. 95-104, 1992.

KRUEGER, A. A missing link in thymic dendritic cell development. **Eur J Immunol.** v.41, p. 2145-7, 2011.

KUPER, C.F; VAN, B.J; CNOSSEN, H; HOUBEN, G, GARTHOFF, J; WOLTERBEEK, A. Development of immune organs and functioning in humans and

test animals: Implications for immune intervention studies. **Reprod Toxicol**. V. 64, p. 180-90, 2016.

KURD, N; ROBEY, E.A. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. **Immunol. Reviews**. v. 271, p. 114-126. 2016.

LAIOSA, C.V; STADTFELD, M; GRAF, T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. **Annual review of immunology**. v. 24, p. 705-38, 2006.

LANNES-VIEIRA, J; DARDENNE, M; SAVINO, W. Extracellular matrix componentes of the mouse thymus microenvironment Ontogenetic studies and modulation by glucocorticoids hormones. **J Histochem Cytochem**. v. 39, p. 1539-1546, 1991.

LEE, H; HE, X; MOOKERJEE-BASU, J; ZHONGPING, D; HUA, X; NICOLAS, E; SULIS, M.L; FERRANDO, A.A; TESTA, J.R; KAPPES, D.J. Disregulated expression of the transcription factor ThPOK during T-cell development leads to high incidence of T-cell lymphomas. **PNAS**. v. 112, p. 7773-7778, 2015.

LEHTIMÄKI, S; LAHESMAA, R. Regulatory T cells control immune responses through their non-redundant tissue specific features. **Front Immunol**. v. 4, p. 1-10, 2013.

LEROITH, D; YAKAR, S. Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**. v. 3, p. 302–310, 2007.

LINA, S; CHENMING, S; ZHANFENG, L; HONGRAN, L; LIN, C; HAIING, L; HONGMEI, Z; PENGBO, D; XIAONING, S; ZHIHAI, Q; YONG, Z. **Scientific Reports**. v. 5, p. 1-16, 2015.

LINS, M.P; VIEIRA, L.F; ROSSA, A.A; SMANIOTTO, S. Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes in vitro. **Biol Res**. v.40, p. 37, 2016.

LIU, J.L; LEROITH, D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. **Endocrinology**. v. 140, p. 5178–5184, 1999.

MADRI, J; GRAESSER, D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. **Developm Immunol**. v. 7, p. 103-116, 2000.

MANLEY, N.R; BLACKBURN C.C. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? **Curr Opin Immunol**. v. 15, p. 225-232, 2003.

MAURICE, D; HOOPER, J; LANG, G; WESTON, K. c-Myb regulates lineage choice in developing thymocytes via its target gene Gata3. **EMBO J**. v. 26, p. 3629–3640, 2007.

- MAURO, L; NAIMO, G.D; RICCHIO, E; PANNO, M.L; ANDÒ, S. Cross-talk between adiponectin and IGF-IR in breast cancer. **Front Oncol.** v. 5, p; 1-8, 2015.
- MAZZUCHELLI, R.I, RIVA, A; DURUM, S.K. The human IL-7 receptor gene: deletions, polymorphisms and mutations. **Semin Immunol.** v. 24, p. 225–30, 2012.
- MEIRELES DE SOUZA, L. R; TRAJANO, V; SAVINO, W. Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? **Dev Immuno.** v. 3, p. 123-135, 1993.
- MELLO-COELHO, V.D.M.S; VILLA-VERDE, D.A; DARDENNE, M; SAVINO, W. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. **J. Neuroimmunol.** v. 76, p. 39-49, 1997.
- MELLO-COELHO, V.D.M.S; VILLA-VERDE, D.A; FARIAS-DE-OLIVEIRA, DE BRITO J.M; DARDENNE, M; SAVINO, W. Functional IGF-1-IGF-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. **Neuroendocrinology.** v. 75: 139–150, 2002.
- MENDES-DA-CRUZ, D. A; SMANIOTTO, S; KELLER, A. C; DARDENE, M; SAVINO, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **J Immunol.** v. 180, 4639-4647, 2008.
- MILICEVIC, N.M; MILICEVIC, Z. Thymus cell-cell interactions. **Int Rev Cytol.** v. 235, p. 152, 2004.
- MOHAN, S; BAYLINK, D.J. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and independent mechanisms. **J Endocrinol.** V. 175, p. 19-31, 2002.
- MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; CLARK, R; DORSHKIND, K. Effects of insulin-like growth factor administration and bone marrow transplantation on thymopoiesis in aged mice. **Endocrinology.** v. 139, p. 4120–4126, 1998.
- MUROI, S; NAOE, Y; MIYAMOTO, C; AKIYAMA, K; IKAWA, T; MASUDA, K; KAWAMOTO, H; TANIUCHI I. Cascading suppression of transcriptional silencers by ThPOK seals helper T cell fate. **Nat Immunol.**; v. 9, p. 1113–1121, 2008.
- NITTA, T; SUZUKI, H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 73, p. 1021-1037, 2016.
- OCAMPO, J. S. P; BRITO, J. M; CORRÊA-DE-SANTANA, E; BOROJEVIC, R; VILLA-VERDE, D. M. S; SAVINO, W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. **Cellular Immunology.** v. 254, p. 1-9, 2008.
- OHIGASHI, I; KOZAI, M; TAKAHAMA, Y. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. **Immunol Reviews.** v. 271, p. 10-22, 2016.
- OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J; RIEKER-GELEY, T; RECHEIS, H.E; WICK, G. Murine thymic nurse cells and rosettes: analysis of adhesion molecule expression

using confocal microscopy and a simplified enrichment method. **J Histochem Cytochem.** v. 45, p. 1293-7, 1997.

PAESSENS, L. C; FLUITSMA, D. M; VAN KOOYK, Y. Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes. **J Pathol.** v. 214, p. 96-103, 2008.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicol Pathol.** v. 34, p. 504-14, 2006.

PETRIE, H. T; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. **Annu Rev Immunol.** v. 25, p. 649-679, 2007.

PEZZANO, M; SAMMS, M; MARTINEZ, M; GUYDEN, J. Questionable thymic nurse cell. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 65, p. 390-403, 2001.

PROIETTO, A; VAN DOOMELEN, S; WU, L. The impact of circulation dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. **Immunol Cel Biol.** v. 87, p. 39-45, 2009.

RAJARAM, S; BAYLINK, D.J; MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. **Endocr. Rev.** v. 18, p. 801-831, 1997.

RIBEIRO-CARVALHO, M. M; LIMA-QUARESMA, K. R. F; MOUÇO, T; VARVALHO, V. F., MELLO-COELHO, V; SAVINO, W. Triiodothyronine modulates thymocyte migration. **Scandinavian J Immunol.** v. 66, p. 17-25, 2007.

RODEWALD, H.R; OGAWA, M; HALLER, C; WASKOW, C; DISANTO, J.P. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor chain is essential for repertoire formation. **Immunity.** v. 6, p. 265–272, 1997

SAKAGUCHI, S; HOMBAUER, M; BILIC, I; NAOE, Y; SCHEBESTA, A; TANIUCHI, I; ELLMEIER, W. The zinc-finger protein MAZR is part of the transcription factor network that controls the CD4 versus CD8 lineage fate of double-positive thymocytes. **Nat. Immunol.** v. 11, p. 442–448, 2010.

SALDAÑA, JI; SOLANKI, A; LAU, C; SAHNI, H; SUSAN ROSS, S; FURMANSKI, A.L; ONO, M; HOLLÄNDER, G; CROMPTON, T. Sonic Hedgehog regulates thymic epithelial cell differentiation. **J. Autoimmun.** v. 68, p. 86-97, 2016.

SAVINO, W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. **Exp. Physiol.** v. 92, p. 813-817, 2007.

SAVINO, W; DALMAU, S. R; COTTA-DE-ALMEIDA, V. Role of extracellular matrix-mediated interactions in the thymocyte migration. **Develop Immunol.** v. 7, p. 279-291, 2000.

SAVINO, W; DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocr Rev.** v. 21, p. 412-443, 2000.

SAVINO, W; DARDENNE, M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. **Current opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-9, 2010.

SAVINO, W; MENDES-DA-CRUZ, D.A; GOLBERT, D.C; RIEDERER, I; COTTA-DE-ALMEIDA, V. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. **Front Immunol.** v. 17, p. 576-579, 2015.

SAVINO, W; MENDES-DA-CRUZ, D.A; LEPLETIER, A; DARDENNE, M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nat. Rev. Endoc.** v. 12, p. 77-89, 2016.

SAVINO, W; MENDES-DA-CRUZ, D.A; SMANIOTTO, S; SILVA-MONTEIRO, E; VILLA-VERDE, D. M. S. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **J Leuk Biol.** v. 75, p. 1-11, 2004.

SEO, W; TANIUCHI, I. Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. **Eur. J. Immunol.** v. 46, p. 531-538, 2016.

SETOGUCHI, R; TACHIBANA, M; NAOE, Y; MUROI, S; AKIYAMA, K; TEZUKA, C; OKUDA, T; TANIUCHI, I. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. **Science.** v. 31, p. 822–825, 2008;

SKOGBERG, G; LUNDBERG, V; BERGLUND, M; GUDMUNDSOTTIR, J; TELEMO, E; LINDGREN, S; EKWALL, O. Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. **Immunol Cell Biol.** v. 93, p. 727-734, 2015.

SMANIOTTO, S; MELLO-COELHO, V; VILLA-VERDE, D. M; PLÉAU, J. M; POSTELVINAY, M. C; DARDENNE, M; SAVINO, W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology.** v. 146, p. 3005-3017, 2005.

SONNTAG, W.E; RAMSEY, M; CARTER, C.S. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. **Ageing Research Reviews.** v. 4, p. 195-212, 2005.

SPRINGER, T. A; DUSTIN, M. L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 24, p.107-115, 2010.

STARR, T. K; JAMESON, S. C; HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of T cells. **Annu Rev Immunol.** v. 21, p. 139-176, 2003.

STUART, C.A; MEEHAN, R.T; NEALE, L.S; CINTRON, N.M; FURLANETTO, R.W. Insulin-like growth factor-1 binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 72, p. 1117-1122, 1991.

SU, D; NAVARRE, S; OH, W; CONDIE, B. G; MANLEY, N. R. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. **Nature Immunol.** v.4, p. 1128-1135, 2003.

SUN, L; VITOLO, M; PASSANITI, A. Runt-related Gene 2 in Endothelial cells: Inducible Expression and Specific Regulation of Cell Migration and Invasion. **Cancer Reserach.** v. 61, p. 4994-5001, 2001.

TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nat Rev Immunol.** v. 6, p. 127–135, 2006.

TIMOTHY, A. S; WANG, J. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. **Advances in protein chemistry.** v. 68, p. 29-63, 2004.

VACCA, A; RIA, R; PRESTA, M; RIBATTI, D; IURLARO, M; MERCHIONNE, F; TANGHETTI, L; DAMMACCO, F. $\alpha\beta 3$ Integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. **Exp Hematol.** v. 29, p. 993-1003, 2001.

VAIDYA, H.J; LEON, A.B; BLACKBURN. FOXN1 in thymus organogenesis and development. **Eur. J. Immunol.** v. 46, p. 1826-1837, 2016.

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

VIANA, I.M.M.N; ALMEIDA, M.E.S; LINS, M. P; REIS, M.D.S; VIEIRA, L.F.A; SMANIOTTO, S. Combined effect of Insulin-like growth factor-1 and CC chemokine ligand 2 on angiogenic events in endothelial cells. *Plos one.* v. 10, p. 1-14, 2015.

VIELKIND, S; GALLAGHER-GAMBARELLI, M; GOMEZ, M; HINTON, H.J; CANTRELL, D.A. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. **J Immunol.** v. 175, p. 350–7, 2005.

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

VOON, D.C; HOR, Y.T; ITO, Y. The RUNX complex: reaching beyond haematopoiesis into immunity. **Immunology.** v. 146, p. 523-536, 2015.

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.

WANG, D; CLAUS, C.L; VACCARELLI, G; BRAUNSTEIN, M; SCHMITT, T.M; ZUNIGA-PFLUCKER, J.C; ROTHENBERG, E.V; ANDERSON, M.K. The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAIt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. **Journal of immunology**. v. 177, p. 109-19, 2006.

WANG, L; BOSSELUT, R. CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus. **J Immunol**. v. 183, p. 2903-2910, 2009.

WANG, L; WILDT, K.F; ZHU, J; ZHANG, X; FEIGENBAUM, L; TESSAROLLO, L; PAUL, W.E; FOWLKES, B.J; BOSSELUT, R. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. **Nat. Immunol**. v. 9, p. 1122–1130, 2008.

WILLIAMS, K.M; HAKIM, F.T; GRESS, R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin Immunol**. v. 19, p. 318–330, 2007.

ZHANG, L; SUN, L; ZHAO, Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update. **Cell Research**. v. 17, p. 50-55, 2007.

ZHANG, X., ROZENGURT, E., REED, E. F. HLA class I molecules partner with integrin β 4 to stimulate endothelial cell proliferation and migration. **Science Signaling**. v. 3, p. 1-24, 2010.

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

ANEXOS

Anexo A: Comitê de Ética em pesquisa- processo nº 028370/2010-07




UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió - AL, 08/03/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Salete Smaniotto

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 08/03/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 028370/2010-07 sob o título, **Estudo dos efeitos do hormônio do crescimento sobre o sistema imune: uma abordagem neuroimunoendócrina** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

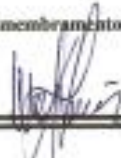
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido. (*) Áreas temáticas especiais

Projetos de PIBIC, com planos de trabalho e projetos de mestrado que sejam desmembramentos desse protocolo, deverão ser avaliados em novos Protocolos de Pesquisa.


 Prof. Dr. Nélio Estelios Lima
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisa

Anexo B: Comissão de Ética no Uso de Animais -projeto nº 14/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 14/2015

TÍTULO: Avaliação dos efeitos de hormônios hipofisários e semaforinas sobre órgãos linfoides e células do sistema imunológico.

RESPONSÁVEL: Saete Smanioto

OBJETIVO: Avaliar os efeitos de hormônios hipofisários e semaforina sobre órgãos linfoides e células do sistema imunológico.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 01.07.2015 a 30.06.2020

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo isogênico	C57BL/6	250

Maceió, 16 de junho de 2015.



Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profª. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
CEUAPE 1128858