

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

**EFEITO PLEIOTRÓPICO DA SEMAFORINA-3A SOBRE TIMÓCITOS E
CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS**

MARVIN PAULO LINS

Maceió – AL
2018

MARVIN PAULO LINS

**EFEITO PLEIOTRÓPICO DA SEMAFORINA-3A SOBRE TIMÓCITOS E
CÉLULAS ESTROMAIS TÍMICAS**

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

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

Maceió – AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

L759e Lins, Marvin Paulo.
Efeito pleiotrópico da semaforina-3A sobre timócitos e células estromais tímicas / Marvin Paulo Lins. – 2018.
77 f. : il.

Orientadora: Saete 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, 2018.

Bibliografia: f. 86-96.
Anexos: f. 97-[108]

1. Timo. 2. Timócitos. 3. Células estromais tímicas. 4. Semaforina-3A. 5. Migração celular. I. Título.

CDU: 577.175.76



Folha de Aprovação

Marvin Paulo Lins

Efeito pleiotrópico da semaforina-3A sobre timócitos e células estromais tímicas

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 6 de Dezembro de 2018.

Banca Examinadora

PROF. DR. ENIO JOSÉ BASSI - (UFAL)

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

Prof. Dr. Wilson Savino - (Fiocruz-RJ)

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: INCT, CNPq e FAPEAL.

*Quero dedicar cada página desta tese, cada palavra escrita,
cada noite e finais de semana no laboratório,
cada congresso, banners e prêmios conquistados,
cada dificuldade enfrentada neste caminho,
bem como cada conquista alcançada,
Dedico àquela que sempre esteve ao meu lado,
Que me deu o presente da vida,
E até ao final dela, torcerá por mim,
Minha mãe: Lúcia de Fátima de Albuquerque Lins.*

AGRADECIMENTOS

Nada mais justo e sincero, do que iniciar meus agradecimentos à minha orientadora. Como não agradecer o acolhimento, desde a primeira vez que falei com ela, em 2010, os ensinamentos práticos (da minha primeira citometria às 22h), os incentivos para que eu crescesse (cursos na USP, Fiocruz, as disciplinas extras na pós), e os conselhos para a vida (nas conversas mais sérias que tivemos). Eu sinto muito orgulho em ser seu aluno! Se eu pudesse voltar no tempo, e recomeçar tudo, eu escolheria ser seu aluno de novo!

Agradeço muuuuito ao LBC! Aos professores que sempre foram espelho para mim (Emiliano, Alexandre e Elma), aos colegas que tornaram-se amigos (Jamylle, Clarice, Nalvinha, Sam, Keyla, Julianderson, Nanda), aos membros que não fazem mais parte do laboratório, mas fazem parte da minha vida (Lari, Iana, Laís, Kevin). E em cada comemoração de aniversário, e as confraternizações ao longo desses anos, que deixaram de lado a bancada e nos aproximou como família! Sentirei muitas saudades!

Aos meus colegas de doutorado, que compartilham comigo os “causos” engraçados e tensos dessa vida de pós-graduando (tô rindo, mas é de nervoso), e que independente das diferenças, estivemos juntos e é isso que teremos quando as teses acabarem: a cumplicidade e a admiração pelo outro. Posso citar aqui, Mika, Jean, Igor, Max, Nanda, Mille, Tay, Diego. Nos encontraremos nos caminhos dessa nossa escolha profissional!

Além dos professores de “casa”, não posso esquecer dos professores dos corredores do ICBS, que me conhecem há tanto tempo e sempre foram meus incentivadores. Agradeço pela torcida que nunca mudou. Profa. Silvana Ayres, profa. Alessandra Borges, profa. Ana Maria Lopez, prof. Renato Rodarte, profa. Leonora Bastos, profa. Klaysa Ramos. Não posso deixar de mencionar o prof. Ênio Bassi, que apesar do pouco tempo, já se tornou um referencial e amigo para mim.

Agradeço com a mesma intensidade, a toda equipe do Biotério Central, que pela convivência diária, tornou-se um pedaço da minha família também! Diversas vezes estive apenas de “corpo presente” com a mente focada no doutorado, e todo o apoio que me ofereceram foi fundamental para que eu conseguisse conciliar tudo! Elvan, Eli, dona Marta, Victor e Lenin, essa conquista também é de vocês!

A gente não é ninguém sem a família... quem mais me conhece, sabe dos meus dias, enxerga as lágrimas e se alegra com os sorrisos. Não poderia ser outra. Meus pais, Vicente e Lúcia, a cada dia eu tento retribuir um pouco, mas nunca irei conseguir. A educação que vocês me proporcionaram, e eu seguir nos estudos é o mínimo de orgulho que posso dar a vocês. Minha irmã e meu sobrinho, Mylena e Gabriel, tão

amados e que eu prezo tanto... Vocês foram minha alegria e distração nos piores dias. Obrigado!

E quem chegou no momento certo, para me ajudar em tudo (tudo mesmo!), foi você, Priscylla! Que soube abrir mão de mim em tantos momentos, e me deu apoio e força. Foi meus ouvidos e me abraçou em cada passo dado. Todo meu amor em forma de gratidão e o sentimento recíproco de que valeu a pena! Te amo!

O meu melhor lado são os meus amigos! Minha espontaneidade, meus momentos pra relaxar, e toda confiança que temos uns nos outros. Quem me conheceu muito antes dos títulos e dos compromissos. Obrigado por estarmos juntos até hoje! E saberem que vocês são um presente para mim. Obrigado, Klewerton, Filipe, Eduardo e Flávia, Rafael e Renata, Isis, Thayane e Thiago, Tales, Mateus, Kelly e Raphael. Vamos sempre comemorar!

A UFAL também merece meus agradecimentos. Eu passo meu dia aqui, faço minhas refeições, tenho amigos e já dormi aqui! Você foi mudando com o passar dos anos, e eu também. Agradeço por ser esse ambiente que me permitiu alcançar meus objetivos e me apresentar tantas pessoas insubstituíveis. E extraí de você quase tudo o que eu poderia aproveitar. Obrigado de todo meu coração.

E para encerrar, como o mais importante: Deus! É redundante escrever aqui, se só escrevo por Sua causa. Mas Alguém que está presente na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na riqueza e na pobreza. Minha gratidão para sempre: “Contigo quero estar / Preciso Te abraçar / Anseio estar mais perto de Ti, meu Rei / Em meu dia-a-dia / Em toda a minha vida / És tudo para mim”.

*“As coisas mais belas do mundo
não podem ser vistas ou tocadas,
elas são sentidas com o coração”*

Antoine de Saint-Exupéry, **O Pequeno Príncipe**, 1943

RESUMO

O timo, como órgão linfoide primário, é responsável pela diferenciação dos timócitos em linfócitos T imunocompetentes. Para tal função, o microambiente tímico é crucial e diversos tipos celulares, como células epiteliais tímicas, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos, chamadas coletivamente de células estromais, cooperam ativamente para a diferenciação dos timócitos. Este microambiente pode ser influenciado por fatores extrínsecos ao órgão, como hormônios e neuropeptídeos. Dentre estas substâncias, cita-se a semaforina-3A (Sema3A) que é uma proteína multifuncional envolvida com a migração de neuritos, e são poucos os dados acerca dos seus efeitos sobre as células do microambiente tímico. No intuito de contribuir para este conhecimento, objetivou-se avaliar as ações da Sema3A sobre os timócitos e células estromais tímicas murinas. Para tal, as células estromais foram obtidas por digestão enzimática do timo. Inicialmente, foram caracterizados os tipos celulares obtidos do estroma tímico e foram identificadas majoritariamente células epiteliais (67% do total), mas também foram observadas células não-epiteliais que expressam na superfície marcadores para macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Ainda, foi observado a expressão de neuropilina-1, o receptor para Sema3A, na superfície das células estromais. O tratamento com Sema3A modulou a morfologia das células estromais e promoveu a emissão de filopódios nos timócitos. Ainda, a Sema3A foi capaz de alterar a polimerização de F-actina em ambos os tipos celulares. Por imunocitoquímica, foi constatado que as fibras de fibronectina produzidas pelas células estromais foram reorganizadas pela Sema3A e a produção de laminina foi aumentada por este tratamento. Utilizando citometria de fluxo, foi observado que após o tratamento com Sema3A a expressão de VLA-5 foi reduzida em timócitos totais e duplo-positivos, mantendo inalterada a expressão de VLA-6 em timócitos. Na adesão celular, foi realizado um co-cultivo (células estromais e timócitos) e quando as células estromais foram pré-tratadas com Sema3A, ocorreu um aumento no número de timócitos aderidos em sua superfície, ao passo que um efeito inverso foi observado quando os timócitos foram pré-tratados. Por fim, Sema3A reduziu a migração de timócitos, frente às células estromais, quando esta proteína foi aplicada durante o processo migratório. Esses dados, em conjunto, indicam a pleiotropia dos efeitos da Sema3A sobre as células do microambiente tímico, timócitos e células estromais, elencando esta proteína como uma importante molécula moduladora das funções tímicas.

Palavras-chave: Timócito, célula estromal tímica, semaforina-3A, migração celular.

Pleiotropic effect of semaphorin-3A on thymocytes and thymic stromal cells

Thymus, a primary lymphoid organ, is responsible for the differentiation of thymocytes into immunocompetent T lymphocytes. For this purpose, their microenvironment and the several types of cell, collectively referred as thymic stromal cells (such as thymic epithelial cells, macrophages, dendritic cells, and fibroblasts), actively cooperate for thymocyte differentiation. This microenvironment can be influenced by extrinsic factors such as hormones and neuropeptides. Among these molecules, semaphorin-3A (Sema3A) is described as a multifunctional protein involved in neurite migration, however, there are few data about its effects on thymic microenvironment cells. In order to contribute to this knowledge, we aimed to evaluate the effects of Sema3A on thymocytes and thymic stromal cells. Therefore, stromal cells were obtained by enzymatic digestion of murine thymus. Firstly, cell types obtained from the thymic stroma were characterized mainly as thymic epithelial cells (67%), but others cell types were also present, as indicate the expression of cell markers to macrophages, fibroblasts, and dendritic cells. In addition, the expression of the receptor for Sema3A, neuropilin-1, was observed on the surface of these cells. Besides that, the treatment with Sema3A modulated the morphology of thymic cells. Also, Sema3A promoted the projection of filopodia by thymocytes and altered F-actin polymerization in stroma cells. Secondly, through the analysis of immunocytochemistry images, it was verified that the fibronectin fibers produced by the stromal cells were reorganized by Sema3A and the laminin production was increased by this treatment. Using flow cytometry, it was observed that the expression of VLA-5 was reduced in both total and double-positive thymocytes, however, there was no change in VLA-6 levels after the treatment with Sema3A. In the cell adhesion scenario, an inverse effect was observed on cells pretreated with Sema3A, whose thymocyte adhesion was increased when stroma was treated and decreased when only thymocytes were treated. Finally, when Sema3A was applied during the migratory process, the number of migrant thymocytes was reduced. Together these data indicate the pleiotropy of Sema3A effects on thymic microenvironment (thymocytes and stromal cells), classifying this protein as an important molecule to modulate thymic functions.

Keywords: Thymocyte. Thymic stromal cell. Semaphorin-3A. Cell migration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Órgãos linfoides primários e secundários na espécie humana	22
Figura 2. Esquema do microambiente tímico	27
Figura 3. Esquema da diferenciação de timócitos.....	35
Figura 4. Representação esquemática de Sema3 e seus receptores	40
Figura 5. Estratégias de gate para timócitos e células estromais tímicas	47
Figura 6. Caracterização das células estromais tímicas obtidas por meio de digestão enzimática.....	51
Figura 7. Caracterização das células epiteliais tímicas por imunocitoquímica	53
Figura 8. Expressão de neuropilina-1 por células estromais tímicas murinas	54
Figura 9. Aspectos morfológicos dos timócitos após tratamento com Sema3A.....	55
Figura 10. Efeitos da Sema3A na formação de filopódios em timócitos.....	56
Figura 11. Morfologia das células estromais tímicas tratadas ou não com Sema3A	57
Figura 12. Citoesqueleto de F-actina em timócitos após tratamento com Sema3A	59
Figura 13. Citoesqueleto de F-actina em células estromais sofre influência da Sema3A.....	60
Figura 14 Expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 em timócitos murinos	62
Figura 15. Heterogeneidade na produção de fibronectina pelas células estromais tímicas	64
Figura 16. Sema3A modifica a orientação das fibras de FN sem alterar a quantidade produzida pelas células estromais.....	65
Figura 17. Sema3A aumenta a produção de laminina pelas células estromais tímicas	66
Figura 18. Sema3A reduz adesão de timócitos pré-tratados às células estromais.....	67
Figura 19. Sema3A estimula adesão de timócitos às células estromais pré-tratadas.....	68

Figura 20. Adesão de timócitos às células estromais após o tratamento com Sema3A.....	69
Figura 21. Adesão de timócitos às células estromais tímicas na presença de Sema3A.....	69
Figura 22. Efeito da Sema3A sobre a migração de timócitos frente às células estromais.....	71
Figura 23. Esquema das ações pleiotrópicas de Sema3A sobre timócitos e células estromais tímicas murinas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão de NP-1 nas subpopulações de timócitos humanos e murinos.....	41
Tabela 2. Expressão (%) das integrinas pelas subpopulações de timócitos murinos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
- APC – Aloficocianina (Allophycocyanin)
- APC – Célula apresentadora de antígeno (Antigen-presenting cell)
- AIRE – Regulador autoimune (Autoimmune regulator)
- BSA – Albumina do soro bovino (Bovine serum albumin)
- CCL – Ligante de quimiocina do tipo C-C (C-C chemokine ligand)
- CCR – Receptor de quimiocina do tipo C-C (C-C chemokine receptor)
- CD – Grupo de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin gene-related peptide)
- CLPs – Células progenitoras linfoides comuns (Common lymphoid progenitor cells)
- cTEC – Célula epitelial tímica cortical (Cortical thymic epithelial cell)
- CTR – Controle
- CXCL – Quimiocina do tipo C-X-C (C-X-C motif chemokine)
- CXCR – Receptor de quimiocina do tipo C-X-C (C-X-C chemokine receptor)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DC – Célula dendrítica (Dendritic cell)
- DN – Timócito duplo-negativo (Double-negative thymocyte – CD4⁻CD8⁻)
- DP – Timócito duplo-positivo (Double-positive thymocyte – CD4⁺CD8⁺)
- EC – Célula endotelial (Endothelial cell)
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
- EGF – Fator de crescimento epidérmico (Epidermal growth factor)
- FGF – Fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast growth factor)
- FN – Fibronectina
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein-5-isothiocyanate)
- FSH – Hormônio folículo-estimulante (Follicle stimulating hormone)
- GAR – Anti-imunoglobulina de coelho produzido em cabra (Goat anti-rabbit Immunoglobulin)
- GH – Hormônio do crescimento (Growth hormone)
- HGF – Fator de crescimento de hepatócitos (Hepatocyte growth factor)
- HSCs – Células-tronco hematopoiéticas (Hematopoietic stem cells)

ICAM-1 – Molécula-1 de adesão intercelular (Intercellular adhesion molecule-1)
Ig – Imunoglobulina
IGF-1 – Fator-1 de crescimento semelhante à insulina (Insulin-like growth factor-1)
IL – Interleucina
LH – Hormônio luteinizante (Luteinizing hormone)
LM – Laminina
MEC – Matriz extracelular
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal (Major histocompatibility complex)
mTEC – Célula epitelial tímica medular (Medular thymic epithelial cell)
NOD – Camundongo diabético não-obeso (Non-obese diabetic mice)
NP – Neupilina
NPY – Neuropeptídeo Y
PBS – Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor)
PDZ – Domínio estrutural de ligação em proteínas
PE – Ficoeritrina (Phycoerythrin)
PerCP – Proteína clorofila peridina (Peridinin chlorophyll)
PSI – Domínio plexina-semaforina-integrina
PRL – Prolactina
PVS – Espaço perivascular (Perivascular space)
RPMI – meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
RTE – Emigrantes tímicos recentes (Recent thymic emigrants)
S1P – Esfingosina-1 fosfato (Sphingosine-1-phosphate)
S1PR1 – Receptor-1 da esfingosina-1 fosfato (Sphingosine-1-phosphate receptor-1)
SBF – Soro bovino fetal
SCF – Fator de célula-tronco (Stem cell factor)
SD – Desvio padrão (Standard deviation)
SEA – Sequência de aminoácidos da porção C terminal da neupilina-1
Sema – Semaforina
SP – Timócito simples-positivo (Simple-positive thymocyte)
TCR – Receptor de célula T (T cell receptor)
TEC – Célula epitelial tímica (Thymic epithelial cell)

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase (Tissue inhibitor of metalloproteinases)

TGF – Fator de crescimento transformante (Transforming growth factor)

TNC – Célula *nurse* tímica (Thymic nurse cell)

TSA – Antígeno tecido-específico (Tissue specific antigen)

VCAM – Proteína-1 de adesão celular vascular (Vascular cell adhesion protein 1)

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)

VIP – Polipeptídeo vasointestinal (Vasointestinal polypeptide)

VLA – Antígeno de aparecimento tardio (Very late antigen)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Sistema imunológico	21
3.2 O timo	23
3.2.1 Histórico	23
3.2.2 Embriologia, Anatomia e Histologia tímicas	24
3.2.3 O microambiente tímico	26
3.2.4 Diferenciação intratímica dos timócitos	31
3.2.5 Controle neuroendócrino do timo	35
3.3 Semaforinas e seus receptores	38
3.3.1 Sema classe 3 e timo	40
4 METODOLOGIA	44
4.1 Animais	44
4.2 Obtenção dos timócitos e células estromais tímicas	44
4.3 Tratamento com semaforina-3A	45
4.4 Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura	45
4.5 Ensaio de citometria de fluxo	46
4.6 Ensaio de imunofluorescência	47
4.7 Marcação direta para citoesqueleto de F-actina	48
4.8 Ensaio de adesão celular	48
4.9 Ensaio de migração celular	49
4.10 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Caracterização das células estromais tímicas	51
5.2 Sema3A altera morfologia de timócitos e das células estromais tímicas	54
5.3 Efeito da Sema3A sobre o citoesqueleto de F-actina em timócitos e células estromais tímicas	58

5.4 Sema3A modula os ligantes e receptores da matriz extracelular	61
5.5 Ação antagônica da Sema3A sobre adesão de timócitos às células estromais tímicas	67
5.6 Influência da Sema3A sobre a migração de timócitos frente as células estromais tímicas	70
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

O timo é um dos sítios para a linfopoiese de células T. Sua função inclui a maturação e seleção de células T antígeno-específicas e a liberação seletiva dessas células para a periferia do sistema imune. Esses processos altamente complexos exigem organização e compartimentação parenquimatosas precisas, onde ocorrem uma infinidade de vias de sinalização, relacionadas ao controle rigoroso dos processos de maturação e seleção dos linfócitos T (KRUEGER, 2018).

O microambiente tímico é composto por uma variedade de células estromais, incluindo células epiteliais tímicas (TECs), células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e células dendríticas (DCs). Essas células estromais organizam-se como uma rede tridimensional, que hospeda as células T precursoras, chamadas timócitos, e interagem com elas. Além disso, o estroma tímico fornece múltiplos sinais que direcionam a migração, proliferação, sobrevivência e apoptose de timócitos em desenvolvimento, desempenhando assim papéis fundamentais na formação do sistema imune adaptativo (NITTA & SUZUKI, 2016).

Nas últimas décadas, fortes evidências foram reunidas para demonstrar a existência de um elo funcional entre o sistema nervoso e o sistema imunológico, abrindo uma nova área de investigação: a modulação neuroimune. As células imunes sintetizam, armazenam e liberam neurotransmissores e neuropeptídeos, realizando uma via parácrina/autócrina que contribui para regular a sua própria maturação e função. A fisiologia tímica é pleiotropicamente influenciada por diversos hormônios e neuropeptídios, ademais as células estromais tímicas secretam esses fatores e expressam os seus receptores, como prolactina, hormônio do crescimento ou triiodotironina (MIGNINI, et al., 2014).

Dentre as moléculas relacionadas ao sistema nervoso, mas que influenciam o sistema imune, citam-se as semaforinas (Semas). Elas pertencem a uma família de proteínas que atuam na quimioatração ou quimiorepulsão de neuritos. Entretanto, diversas células migrantes não-neuronais são responsivas a Semas, durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos, inclusive em situações patológicas, como câncer. Os principais receptores a essas

proteínas são as neuropilinas (NPs), expressas em várias células imunes, principalmente em subpopulações de linfócitos T (ROY, et al., 2017).

A semaforina-3A (Sema3A) é um membro da classe 3 das Semas, e embora inicialmente identificada na orientação neuronal, é uma moduladora ativa da biologia óssea, do desenvolvimento cardiovascular e do sistema imune. No contexto intratímico, Sema3A reduz a adesão de timócitos a TEC, e também inibe a migração de timócitos frente a moléculas de matriz extracelular (MEC) (SAVINO, 2010). Por outro lado, o contato célula-célula entre timócitos e TECs, o engajamento do TCR e o tratamento com IL-7 aumentam a expressão de NP-1 pelas células tímicas (LEPELLETIER, et al., 2007).

O conhecimento dos efeitos da Sema3A sobre os timócitos e principalmente sobre as células estromais tímicas ainda é limitado. Diante do exposto, buscamos desenvolver estudos visando demonstrar a participação da Sema3A sobre a liberação de sinais das células estromais tímicas aos timócitos, durante os eventos de adesão e migração celular, e também verificar a ação da Sema3A *per si*, em parâmetros celulares como morfologia, citoesqueleto e sua interação com a matriz extracelular. Nossa hipótese foi: “A Sema3A atua sobre parâmetros celulares do estroma tímico e timócitos que são fundamentais para o estabelecimento das interações entre estas células no microambiente tímico”.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar, *in vitro*, o efeito da Semaforina-3A sobre timócitos e células estromais tímicas.

2.2 Específicos:

2.2.1 Caracterizar as células estromais tímicas obtidas pelo modelo de digestão enzimática;

2.2.2 Avaliar o efeito da Sema3A na morfologia de timócitos e de células estromais tímicas;

2.2.3 Analisar a organização do citoesqueleto nos timócitos e nas células estromais tímicas após o tratamento com Sema3A;

2.2.4 Avaliar a expressão de integrinas em timócitos e a produção de moléculas de matriz extracelular pelas células estromais tímicas após exposição à Sema3A;

2.2.5 Verificar o efeito da Sema3A na adesão dos timócitos às células estromais tímicas;

2.2.6 Analisar a migração de timócitos frente às células estromais tímicas após tratamento com Sema3A.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistema imunológico

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas distribuídas por todo o organismo e se caracteriza biologicamente pela capacidade de reconhecer especificamente determinadas estruturas moleculares (antígenos) e desenvolver uma resposta efetora diante destes estímulos, provocando a sua destruição ou inativação. Portanto, representa um sistema eficaz de defesa contra microrganismos que penetram no organismo ou contra a transformação maligna de células. No entanto, sua função não se restringe à defesa contra infecções, mas também à manutenção da homeostase geral do corpo (CRUVINEL, et al., 2010; HOFFMANN & AKIRA, 2013).

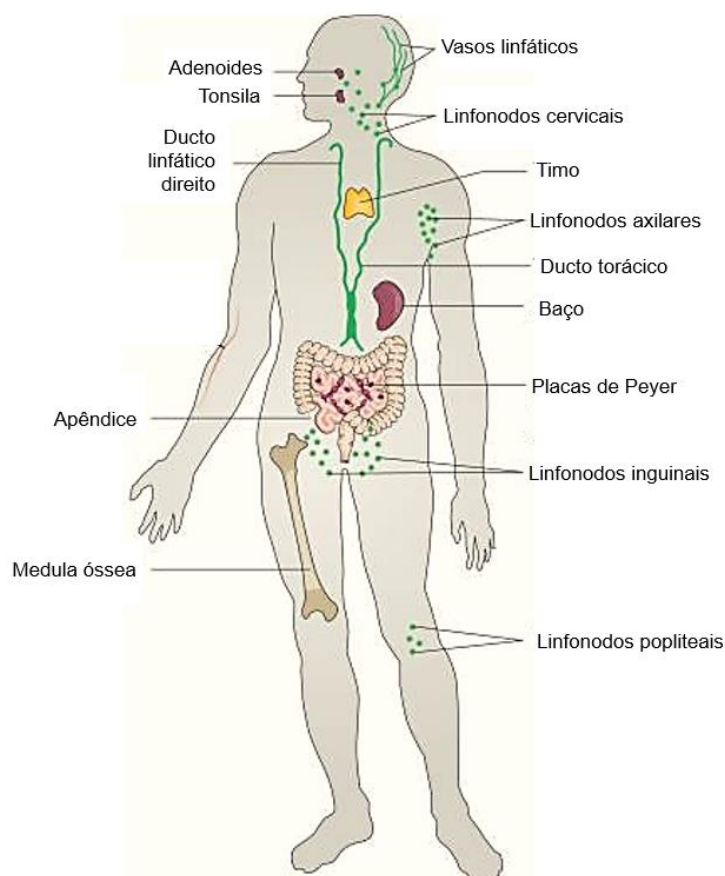
O sistema imunológico pode ser visto de forma simplista como possuindo duas “linhas de defesa”: imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra um patógeno intruso. É um mecanismo de defesa antígeno-independente (não-específico) que é usado pelo hospedeiro imediatamente ou poucas horas depois do encontro com o antígeno. A resposta imune inata não tem memória imunológica e, portanto, é incapaz de reconhecer ou “memorizar” o mesmo patógeno, caso o corpo seja exposto a ele no futuro (TURVEY & BROIDE, 2010).

A imunidade adaptativa é antígeno-dependente e antígeno-específico, e envolve um intervalo de tempo entre a exposição ao antígeno e a resposta máxima. A característica da imunidade adaptativa é a capacidade de memória que permite ao hospedeiro montar uma resposta imunológica mais rápida e eficiente após a exposição ao antígeno. Imunidade inata e adaptativa não são mecanismos mutuamente exclusivos de defesa do hospedeiro, mas são complementares, e caso apresentem falhas nos seus mecanismos, resultam em vulnerabilidade para o organismo (BONILLA & OETTGEN, 2010).

Na maioria dos mamíferos, os órgãos imunes são classificados didaticamente em dois grupos: os órgãos linfoides primários ou centrais, tais como o timo e a medula óssea, e os órgãos linfoides secundários ou periféricos, como baço, linfonodos regionais, placas de Peyer e outros, conforme figura 1. A medula óssea atua como um reservatório para as células-tronco

hematopoiéticas (do inglês, *hematopoietic stem cells* - HSCs), e é um local crítico para a produção das células progenitoras linfoides comuns (*common lymphoid progenitor cells* - CLPs). Por sua vez, o timo é o principal local para o desenvolvimento e a formação do repertório de linfócitos T, enquanto que a medula óssea é o local primário para o desenvolvimento de linfócitos B (DORSHKIND, 2012; CHINN, et al., 2012). Os órgãos linfoides secundários estão situados em locais estratégicos do organismo, onde o encontro com antígenos é mais provável de ocorrer. Todos esses órgãos possuem arquitetura e microambientes especializados, promovendo interações controladas das células imunes, a fim de induzir uma resposta imune rápida e apropriada a agentes infecciosos (RANDALL, et al., 2008).

Figura 1. Órgãos linfoides primários e secundários na espécie humana



Esquema representativo da localização anatômica dos órgãos linfoides no homem, no qual timo e medula óssea são didaticamente classificados como órgãos linfoides primários, pois são a fonte inicial da maioria das células imunológicas, enquanto que os demais órgãos descritos na figura, como linfonodos e baço, são classificados como secundários, em virtude de promoverem a resposta imune (adaptado de BRODIN & DAVIS, 2017).

Dentre as células imunológicas, um grande destaque vem sendo atribuído aos linfócitos T, cujas funções celulares variam a depender do subtipo celular, como linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ ou T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Estas células passam por um processo de diferenciação bastante complexo, que ocorre dentro do timo, que é um órgão essencialmente epitelial, contendo linfócitos em desenvolvimento, denominados de timócitos (GORDON & MANLEY, 2011). O timo será descrito em maiores detalhes nas seções a seguir.

3.2 O Timo

3.2.1 Histórico

Na Grécia Antiga já existiam relatos sobre o timo, entretanto apenas no ano 100 d.C., este órgão foi diretamente referido pelo médico Rufus de Éfeso, que descreveu que “o timo está situado sobre o ápice do coração, orientado pela sétima vértebra do pescoço, em frente à traqueia”. Sua estrutura morfológica foi descrita em mais detalhes por Galeno de Pérgamo (129-216 d.C.), verificando, inclusive, que o peso do órgão varia conforme a idade, diminuindo ao passar dos anos. No entanto, a função tímica permaneceu desconhecida por séculos (CSABA, 2016).

Em 1777, o cirurgião inglês William Hewson notou que o timo era composto pelas mesmas “partículas” encontradas na linfa e sangue, sendo então classificado como um órgão linfoide. Posteriormente foi citado como um órgão endócrino, apesar de seus hormônios e efeitos não serem conhecidos. Em 1846, o médico inglês Arthur Hassall distinguiu a aparência microscópica dos linfonodos e do timo, identificando neste último os aglomerados de células epiteliais na medula tímica, até hoje referenciados como corpúsculos de Hassall, responsáveis por etapas na diferenciação dos timócitos (ELLIS, 2018).

Na metade dos anos 1950, já estava bem estabelecido que o timo era um órgão produtor de linfócitos, porém os imunologistas não acreditavam que ele possuía alguma função imunológica, por três motivos. Primeiro, pois não havia centros germinativos nem plasmacitopoiese dentro do timo. Segundo, que os linfócitos derivados do timo não iniciavam nem transferiam respostas imunes contra antígenos. E terceiro, os animais timectomizados quando adultos não

apresentavam alteração nas suas respostas imunes celular e humoral, por meio de demonstrações em experimentos *in vitro* (MILLER, 2002).

Finalmente, em 1961, o médico francês Jacques Miller demonstrou que camundongos recém-nascidos timectomizados exibem um pobre desenvolvimento dos tecidos linfoides, respostas imunes reduzidas e infecções recorrentes. E no ano de 1967, foi demonstrado que os linfócitos derivados do timo dão origem a uma progênie de células não-produtoras de anticorpos, mas que combatem os antígenos por meio de proliferação. Assim, foram descritas as subpopulações de linfócitos T (derivados do timo) e B (provenientes da medula óssea) (MILLER, 2002; RIBATTI, et al., 2006).

Nesta época, o timo foi registrado como o órgão linfóide central mais importante do corpo. Experimentos combinando as técnicas de timectomia e injeção de células marcadas no timo levaram à conclusão de que as células derivadas do timo eram os pequenos linfócitos, capazes de circular no sangue e linfa por muitos meses em roedores e por anos no ser humano. Esses achados mudaram o curso da imunologia, abrindo uma nova área de conhecimento nas ciências biomédicas: a biologia das células T (COHEN, 2005).

Nas décadas seguintes (após 1960), com a descoberta do camundongo *nude* (atímico e imunodeficiente), houve um crescimento expressivo nas pesquisas acerca da heterogeneidade dos linfócitos, das respostas imunes mediadas por células T, tolerância, AIDS e outras doenças resultantes de disfunções imunes. Atualmente, o foco sobre células T relaciona-se com a manutenção da homeostase imunológica, a localização tecidual de diferentes subpopulações de células T, bem como o desenvolvimento de estratégias, baseadas na modulação destas células, em vacinas, imunoterapias e imunologia dos transplantes (KUMAR, et al., 2018).

3.2.2 Embriologia, Anatomia e Histologia tímicas

O timo, como órgão linfóide primário, é responsável pelo desenvolvimento das células T funcionais, e está presente em todos os vertebrados mandibulados, apesar das diferenças morfológicas entre as espécies. Estas diferenças incluem o número de órgãos por animal, a localização anatômica, a origem embrionária e a fisiologia tímica. No entanto, a morfologia básica deste órgão é mantida entre as classes dos vertebrados. Embora se admita que um timo verdadeiro esteja

ausente em Agnatha, estruturas difusas linfo-epiteliais primitivas são encontradas nas brânquias de lampreias. São denominadas timoides e indicadas como o sítio de desenvolvimento das células *T-like* (FRANCHINI & OTTAVIANI, 2017).

O desenvolvimento embrionário do timo é um processo de múltiplos estágios, sendo ele o primeiro órgão linfoide a ser formado. O timo origina-se do endoderma da terceira (ou quarta, em algumas espécies) bolsa faríngea, estrutura transitória bilateral que gera tanto o timo quanto o par inferior das glândulas paratireoides. Posteriormente, o primórdio tímico separa-se da paratireoide. Sabe-se que o estroma tímico é formado a partir de células de origem endodérmica, enquanto que a cápsula e septos são formados com o envolvimento das células da crista neural (VASIL'EV & POLEVSHCHIKOV, 2015).

Com a entrada das células progenitoras linfoides comuns (CLP), provenientes do fígado fetal, neste primórdio estromal do timo, inicia-se uma interação molecular bidirecional entre as células epiteliais e as linfoides. Esse *crosstalk* é crítico para a completa maturação funcional e morfológica de ambos compartimentos celulares. Além disso, a sinalização via Delta/Notch e, também, a citocina IL-7 (bem como seu receptor CD127) direcionam a diferenciação das células T (HOLLÄNDER, et al., 2006).

Anatomicamente, o timo consiste em um órgão linfoepitelial localizado no mediastino anterior e superior - caudal à tireoide, dorsal ao esterno e ventral ao coração e os grandes vasos, possuindo uma forma bilobada com duas projeções superiores que podem ascender ao pescoço. Seu peso varia de acordo com desenvolvimento pós-natal (10-15g), atingindo seu maior peso na puberdade (30-40g), para, então, iniciar uma involução progressiva com a idade, sendo infiltrado por tecido adiposo no final da vida, chegando a 6g. Sua coloração é cinza avermelhada e sua superfície possui aspecto lobulado (PLAZA & MORENO, 2018).

Os dois lobos são ligeiramente diferentes no tamanho, sendo o direito mais largo, geralmente. Eles estão interligados por tecido conjuntivo, podendo ocasionalmente formar um lobo intermediário entre ambos. Seu suprimento arterial é proveniente, na parte superior, da artéria tireoidiana; lateralmente, pela artéria mamária, e inferiormente, pela artéria braquiocefálica e aorta. A

drenagem venosa do timo, basicamente, consiste de um plexo venoso posterior (grandes veias de Keynes) que emerge da cápsula do órgão. Há também pequenos capilares linfáticos (eferentes) que convergem ao nível da cápsula (SAFIEDDINE & KESHAVJEE, 2011).

Dos vários tecidos linfoides no organismo, o timo, em termos histológicos, é o mais consistente entre as espécies. A fina cápsula de tecido conjuntivo que o circunda dá origem a septos, que parcialmente subdividem os lobos tímicos em lóbulos interconectantes, de variável tamanho e orientação. A cápsula é composta por uma camada externa e interna de colágeno e fibras reticulares. O córtex, densamente corado pela hematoxilina, apresenta muitos timócitos imaturos com células estromais mais esparsas entre eles. É possível observar corpos apoptóticos de timócitos fagocitados por macrófagos corticais (PEARSE, 2006).

A medula, de coloração mais pálida, apresenta menor densidade celular, e contém mais timócitos maduros, além de células estromais proeminentes. Nesta região encontram-se os corpúsculos de Hassall, que são raros em timos de roedores, quando comparados aos de humanos. A região entre as zonas cortical e medular é chamada de junção corticomédular, rica em vasos sanguíneos (principalmente arteríolas) e um tecido conjuntivo perivascular. Nesta região há o acúmulo de células T fenotipicamente maduras (PEARSE, 2006).

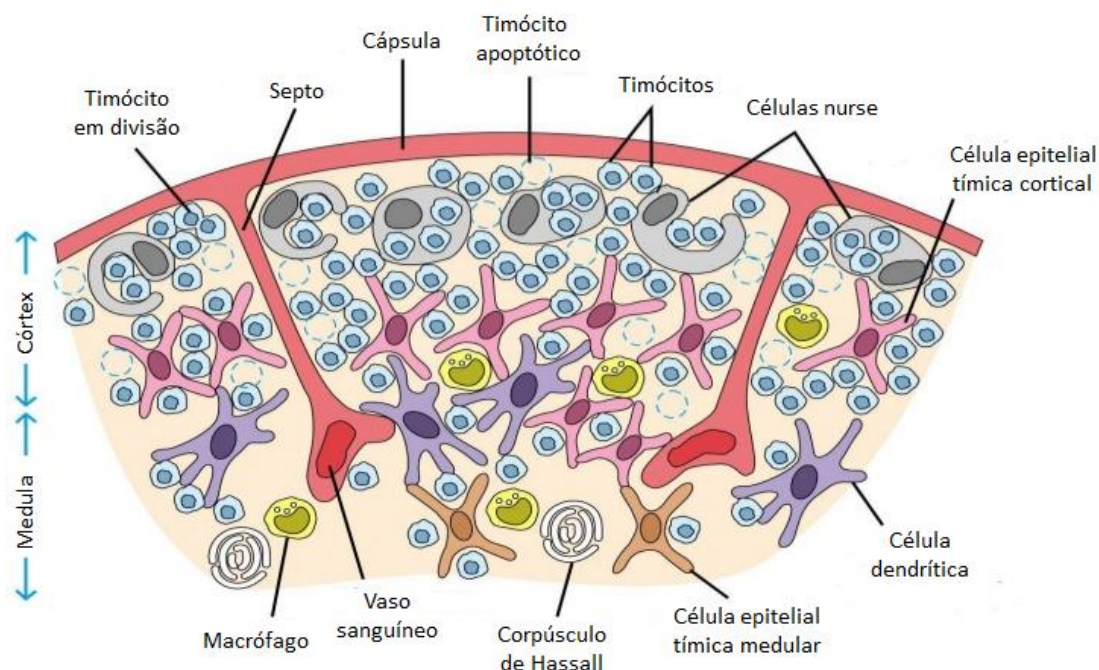
3.2.3 O microambiente tímico

O microambiente tímico é único em virtude da sua arquitetura tridimensional, no qual as interações entre os timócitos em desenvolvimento e as células estromais acontecem. O timo exibe internamente diferentes microambientes, cada um composto por tipos celulares específicos (figura 2). São eles as TECs (bastante heterogêneas entre si), fibroblastos, células mesenquimais, neurais e vasculares, bem como as populações hematopoiéticas de células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (CEPEDA & GRIFFITH, 2018).

As TECs são as células estromais mais proeminentes no microambiente tímico, sendo responsáveis pela quimiotaxia necessária à entrada dos precursores de timócitos no timo, pela diferenciação dos timócitos para a linhagem de linfócitos T, pela proliferação e seleção destas células. Existem dois

tipos principais de TECs, as TECs corticais (cTECs), que residem na parte periférica do órgão e direcionam as fases iniciais da diferenciação dos timócitos, incluindo a seleção positiva. As TECs medulares (mTECs) são morfologicamente distintas e ocupam as regiões internas do timo, sendo importantes para a indução da tolerância imunológica (JAIN & GRAY, 2014).

Figura 2. Esquema do microambiente tímico.



O córtex e a medula dos lóbulos tímicos exibem vários tipos diferentes de células estromais. Essas células formam o arcabouço do órgão, juntamente com os elementos da matriz extracelular, e provêm os sinais necessários ao correto posicionamento e diferenciação dos timócitos (adaptado de KINDT, et al., 2008).

Moléculas que medeiam essas funções exclusivas de TECs incluem o componente $\beta 5t$ do proteossoma, especificamente expresso na maioria das cTECs, e a proteína nuclear AIRE, que é abundante na subpopulação de mTECs. As TECs são surpreendentemente dinâmicas, com uma alta taxa proliferativa (cerca de 8 a 10% por dia), e são capazes de substituir o compartimento tímico inteiro em aproximadamente duas semanas. A celularidade total de TECs isoladas a partir de um timo de um camundongo adulto é estimada em cerca de 10^5 células, mas este número pode exceder 10^6 (JAIN, et al., 2018; SAKATA, et al., 2018).

As células *nurse* tímicas (TNCs) são uma subpopulação de cTEC, que podem conter até 200 timócitos dentro de vacúolos citoplasmáticos altamente

especializados. As TNCs expressam MHC das classes I e II em sua membrana, bem como as citoqueratinas 5 e 8. Elas se distribuem em muitos nichos intratímicos, desde a região subcapsular até a junção corticomedular. As TNCs proveem um microambiente aos timócitos que é necessário para a sua completa diferenciação. Acredita-se que elas atuem, em parte, na restrição ao MHC próprio e à geração de células T reguladoras (Tregs) (GUYDEN, et al., 2015).

As DCs tímicas atuam em conjunto com as mTECs e possuem um papel crítico na indução da tolerância central no timo, pela eliminação de timócitos auto-reativos, e também atuam na geração de Tregs. Três subpopulações de DCs tímicas contribuem para a tolerância central: as DCs residentes, as DCs migratórias e as DCs plasmocitoides. As DCs residentes originam-se a partir dos precursores linfoides tímicos, são a subpopulação mais abundante (acima de 50% do total) e localizam-se principalmente na medula. Elas são responsáveis por apresentar auto-antígenos amplamente expressos pelo organismo aos timócitos em desenvolvimento. As DCs migratórias e plasmocitoides desenvolvem-se na periferia e migram para a junção corticomedular tímica, onde elas capturam e apresentam antígenos presentes no sangue (HASEGAWA & MATSUMOTO, 2018).

Os macrófagos intratímicos constituem, juntamente com as DCs, células apresentadoras de antígeno (APCs) para os timócitos em diferenciação, e sabidamente são responsáveis pela remoção (*clearance*) dos timócitos apoptóticos no microambiente tímico. Eles são encontrados em todas as regiões do órgão, inclusive dentro dos corpúsculos de Hassall. No entanto, maiores pesquisas são necessárias para avaliar se os macrófagos estão envolvidos em outros processos, como a regulação da sobrevivência, proliferação, restrição ao MHC ou seleção negativa de timócitos (LOPES, et al., 2018; MIKUŠOVÁ, et al., 2017).

Os fibroblastos estão presentes principalmente na zona subcapsular, septos e próximo aos vasos sanguíneos do timo, sendo importantes células produtoras de citocinas, como IL-7 e o fator de célula-tronco (SCF), para os timócitos mais imaturos. Os fibroblastos também são a fonte dos fatores de crescimento: epidérmico (EGF), derivado de plaquetas (PDGF) e fibroblástico (FGF) (YARILIN & BELYAKOV, 2004). Além disso, os fibroblastos tímicos dão

suporte à microestrutura tímica e estão envolvidos na proliferação e manutenção das TECs (SUN, et al., 2015)

As células mesenquimais tímicas compõem uma subpopulação distinta, estrutural e funcionalmente, das demais células estromais. Há pouca informação sobre seu envolvimento na diferenciação de timócitos, mas elas estabelecem contatos célula-célula com os outros componentes celulares do órgão. Durante o desenvolvimento embrionário, as células mesenquimais regulam a proliferação de TECs através da produção do FGF-7 e -10, dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e -2) e do ácido retinoico. No entanto, pouco se sabe sobre o papel destas células no timo durante a vida pós-natal, além do fato de que elas desempenham um papel na revascularização do timo após infecções, e de que são essenciais para a manutenção das mTECs (AZGHADI, et al., 2016; PATENAUDE & PERREAULT, 2016).

As células endoteliais tímicas (ECs), especialmente aquelas localizadas dentro dos espaços perivasculares (PVSs) na junção corticomedular, desempenhem papéis críticos no *homing* dos precursores celulares que chegam no timo e dos timócitos maduros que saem do órgão. Embora uma cascata de eventos de adesão e sinalização, envolvendo principalmente P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, e CCL25 e CCL21 / 19 (SCIMONE, et al., 2006), tenha sido sugerida para mediar o progresso do *homing* tímico, sua base celular não está bem definida. Portanto, a natureza das ECs tímicas permanece em grande parte indefinida (SHI, et al., 2016).

A interação dos timócitos com as células estromais se dá pelo contato célula-célula, por moléculas solúveis e também por meio da matriz extracelular (MEC) produzida pelo estroma tímico, composta principalmente de colágeno dos tipos I, III e IV, fibronectina (FN) e laminina (LM). Estas proteínas estão mais concentradas na cápsula e septos tímicos, bem como na membrana basal dos vasos sanguíneos. Além disso, elas formam fibrilas mais finas no córtex e mais espessas e frequentes na medula. Fibras elásticas e reticulina também compõem a MEC tímica, juntamente com glicosaminoglicanos, como heparan sulfato e ácido hialurônico. Esses componentes da matriz estão sujeitos a mecanismos regulatórios que envolvem o controle dinâmico da degradação da MEC, por meio das metaloproteinases (MMPs) e dos seus inibidores teciduais (TIMPs) (SAVINO, et al., 2004).

A FN é uma glicoproteína de alto peso molecular presente nos vertebrados, encontrada na forma solúvel (produzida por hepatócitos e secretada na corrente sanguínea) e insolúvel (secretada localmente e depositada sobre as células de diversos tecidos). A FN está envolvida em processos normais, como a organogênese, adesão e migração celular, e hemostase (MAURER, et al., 2015). A glicoproteína LM, por sua vez, tem como função interagir com receptores ancorados na membrana plasmática de células adjacentes à membrana basal. Elas também se ligam a outras moléculas de MEC, sendo importantes no sequestro, estocagem e apresentação de fatores de crescimento e citocinas às células do organismo (AUMAILLEY, 2013).

Os principais receptores de membrana à MEC são as integrinas, heterodímeros transmembrana, compostos pelas subunidades α e β , compreendendo 18 membros α e 8 membros β , que se combinam para formar 24 dímeros distintos. As integrinas são compostas de grandes domínios extracelulares e caudas citoplasmáticas geralmente curtas. Elas permanecem num estado inativo e podem sofrer uma rápida mudança conformacional em frações de segundo, pela ligação à MEC (ALON & SHULMAN, 2011; DALMAU, et al., 1999). Os timócitos em desenvolvimento nas diferentes subpopulações, bem como as células estromais, expressam integrinas, como VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$, CD49d/CD29), VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$, CD49e/CD29) e VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$, CD49f/CD29) (LINHARES-LACERDA, et al., 2010; GOLBERT, et al., 2018).

A principal interação, a nível intracelular, que as integrinas possuem é com o citoesqueleto de actina. Este citoesqueleto é composto por uma rede dinâmica de filamentos proteicos que confere às células a sua morfologia típica, a emissão de protrusões de membrana tais como lamelipódios e filopódios, e a motilidade celular incluindo os eventos de adesão e migração (DUPRÉ, et al., 2015). Neste contexto, a adequada migração de timócitos é decisiva para a seleção do repertório de linfócitos T (HALKIAS, et al., 2013). A migração de timócitos é direcionada principalmente por interações célula-célula e célula-MEC, sendo estas interações mediadas por integrinas e facilitadas pela sinalização de diversas quimiocinas, tais como CXCL12, CCL21 e CCL19, que são secretadas pelo estroma tímico e os timócitos possuem receptores a elas (LOVE & BHANDoola, 2011).

Interações MEC-integrina-citoesqueleto desempenham um papel crítico na regulação de vias de sinalização que coordenam vários processos biológicos, incluindo a adesão celular, migração, proliferação e sobrevivência. Durante a diferenciação intratímica, a MEC tem participação ativa, pois permite a correta localização dos timócitos em virtude da maior ou menor expressão de receptores de matriz. As células estromais tímicas são responsáveis pela produção da maioria dos sinais indutivos da diferenciação tímica, incluindo citocinas, quimiocinas, hormônios tímicos e outros fatores solúveis (BERTONI, et al., 2018).

Todos os tipos de células tímicas produzem citocinas. Das interleucinas mais estudadas no contexto intratímico, cita-se a IL-7. Embora seu efeito mais marcante seja a manutenção da sobrevivência de células T periféricas, a produção de IL-7 por TECs e DCs é importante para a proliferação de timócitos e, em camundongos, ela aumenta a timopoiese em timos atrofiados (VAN DEN BRINK, et al., 2004). A IL-2, por sua vez, influencia a geração de Tregs no timo, pois induz a transcrição de FoxP3 no núcleo e outros fatores de diferenciação (SERETI, et al., 2002). Além disso, a IL-12 demonstrou aumentar a resposta proliferativa de timócitos induzida por IL-7 ou IL-2 com um papel na manutenção da função e diferenciação dos timócitos durante o envelhecimento (REZZANI, et al., 2008).

As quimiocinas são as principais proteínas envolvidas no sensoriamento ambiental e na migração celular guiada em muitos processos biológicos. No timo, as TECs e outras células estromais, incluindo as DCs, produzem múltiplas quimiocinas. Por sua vez, os timócitos em diferentes estágios de diferenciação respondem a essas quimiocinas através da expressão de receptores específicos. Foi demonstrado que a localização de timócitos para um dado microambiente tímico é impedida se essas células não possuírem o receptor para tais quimiocinas (AGHAALLAEI & BAJOGHLI, 2018).

3.2.4 Diferenciação intratímica dos timócitos

Os timócitos migram através de distintos microambientes, ao longo das regiões tímicas cortical e medular, durante os estágios sucessivos da sua diferenciação, recebendo sinais essenciais provenientes das células estromais. Uma extensiva pesquisa tem identificado o papel do microambiente tímico na

orientação de cada etapa da diferenciação tímica, na qual timócitos imaturos tornam-se linfócitos T imunocompetentes, restritos ao MHC próprio e autotolerantes. Além disso, uma importação contínua de progenitores da medula óssea é necessária para manter a linfopoiese T, visto que os progenitores tímicos perdem seu potencial de autorrenovação (ABRAMSON & ANDERSON, 2017).

Progenitores linfoides comuns ou sua progênie imediata entram no timo por meio da vasculatura da junção corticomedular, e subsequentemente dão origem aos timócitos em diferenciação. A transmigração através do endotélio é iniciada por rolagem celular mediada pela P-selectina, seguida por adesão firme via integrinas ($\alpha 4\beta 1$ e $\alpha L\beta 2$) em conjunto com a sinalização de receptores de quimiocina (CCR9, CCR7) e a laminina. Dentro do timo, as cTECs fornecem IL-7, fator de célula-tronco (SCF) e o *Delta-like canonical Notch ligand 4* (DLL4), que são indispensáveis para a sobrevivência, diferenciação e comprometimento com a linhagem T para os timócitos (HU, et al., 2015).

Os timócitos inicialmente expressam o fenótipo duplo-negativo (DN) para os correceptores CD4 e CD8, sendo ainda subdivididos em 4 estágios (DN1 a DN4), de acordo com a expressão dos marcadores c-Kit, CD25 e CD44. Timócitos DN1 (c-Kit⁺CD44⁺CD25⁻) localizam-se no córtex, próximos à junção corticomedular. Os timócitos DN2 (c-Kit⁺CD44⁺CD25⁺) migram para o meio do córtex tímico, enquanto rearranjam os genes da cadeia β do TCR. Esses rearranjos ocorrem por meio de um processo denominado recombinação V(D)J, que permite a geração de uma alta diversidade de receptores de antígenos. Em seguida, timócitos DN3 (c-Kit⁻CD44⁻CD25⁺) que passaram pelo *checkpoint* da β -seleção (rearranjaram corretamente a cadeia β do TCR), proliferam no córtex subcapsular e se diferenciam em DN4 (c-Kit⁻CD44⁻CD25⁻) para se tornar timócitos duplo-positivos - DP (CD4⁺CD8⁺) (BOUDIL, et al., 2015).

Após esses estágios altamente proliferativos, outra parada na diferenciação ocorre quando as células atingem o estágio de DP e começam a rearranjar o gene da cadeia α do TCR. O seu rearranjo eficiente leva à expressão de um complexo TCR $\alpha\beta$ na superfície celular. Então, estes receptores são testados funcionalmente para o reconhecimento de moléculas do MHC próprio (seleção positiva). Os timócitos que expressam um TCR com baixa afinidade por um auto-peptídeo exibido por uma molécula do MHC são induzidos a se diferenciar em células T *naïves*. No entanto, os timócitos com TCR de alta

afinidade pelo MHC são eliminados por apoptose, mas alguns diferenciam-se em Tregs. Caso o TCR seja incapaz de ligar-se ao MHC, os timócitos “morrem por negligência”, entrando em apoptose (YAP, et al., 2018).

Para timócitos DP que já passaram pela seleção positiva, a escolha para diferenciarem-se em timócitos simples-positivo (SP) CD4 ou CD8 é influenciada pela força e duração da ligação ao TCR. Aquelas células que recebem sinais de TCR mais fortes e longos tendem para o destino SP4, e sinais mais fracos/transitórios favorecem a diferenciação para SP8. Adicionalmente, decisões de destino SP4/SP8, podem ser afetadas por outras influências intra ou extracelulares na transdução do sinal do TCR, além das citocinas e fatores locais do estroma tímico. Vários fatores de transcrição específicos à linhagem são necessários para a decisão de linhagem SP4/SP8, incluindo ThPok (Zbtb7b), Gata3, Runx1, Runx3 e Mazr, mas o modo como são ativadas requer maiores estudos (conforme revisado por SOLANKI, et al., 2018).

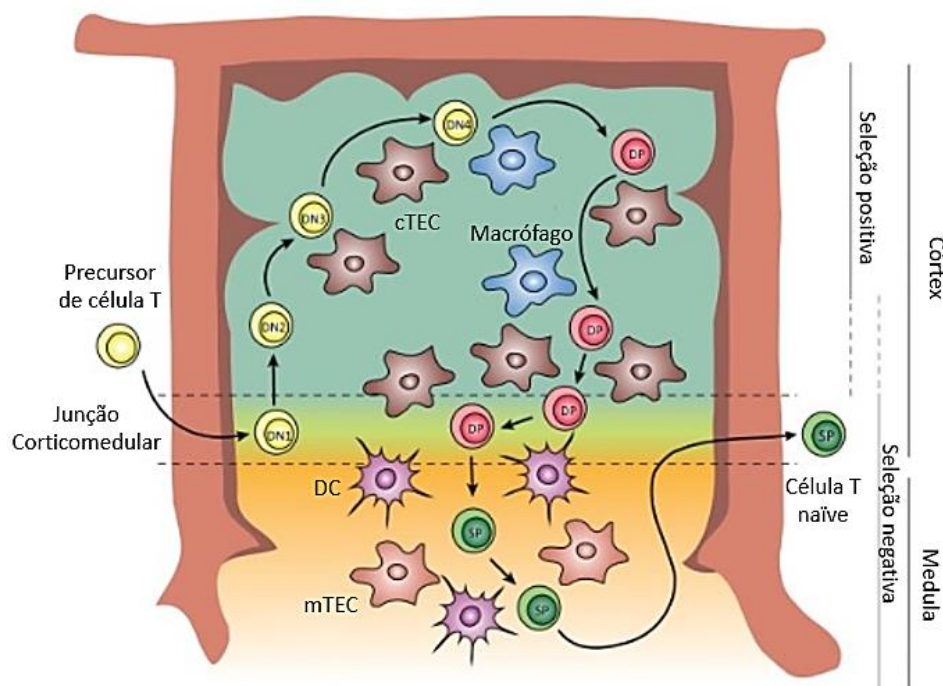
Após seleção positiva, os timócitos regulam positivamente o CD69 e os receptores de quimiocina CCR4 e CCR7. As respectivas quimiocinas ligantes são expressas por DCs medulares e mTECs, criando assim um gradiente quimiotático que promove a entrada medular de timócitos selecionados positivamente. Após a seleção positiva, os timócitos migram muito mais rapidamente (12-16µm/min pós-seleção *versus* 6-8µm/min pré-seleção) e chegam na medula como timócitos simples-positivos (CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺). A medula tímica é crítica para a indução da tolerância central nos linfócitos T (HAMAZAKI, et al., 2016).

mTECs (e DCs) expressam e apresentam numerosos auto-antígenos tecido-específicos (TSA – que são normalmente encontrados em tecidos periféricos) em associação com moléculas do MHC. Diversos genes de TSA são expressos sob o controle dos fatores nucleares AIRE e Fezf2 (TAKABA, et al., 2015). A seleção negativa envolve a deleção clonal de células T autorreativas para evitar sua fuga para os tecidos periféricos. Assim, ocorre a apoptose de timócitos que possuem TCR de elevada afinidade para auto-peptídeos. Além disso, na medula tímica, há a expressão do fator de transcrição Foxp3, em alguns timócitos SP4, resultando na formação de Tregs que deixam o timo e povoam os tecidos periféricos para limitar respostas funcionais de células T autorreativas que escaparam da seleção negativa (JAMES, et al., 2018).

À medida que os timócitos SP amadurecem, eles aumentam a expressão dos fatores Foxo1 e Klf2, que por sua vez regulam a expressão positiva de CD62L, ao mesmo tempo que o CD69 é regulado negativamente (SCHWAB & CYSTER, 2007). O processo de egresso dos timócitos envolve três estágios. O primeiro é o aumento na expressão do receptor a esfingosina-1 fosfato (S1PR1), assim essas células migram frente a um gradiente de S1P ao redor dos vasos sanguíneos na junção corticomedular. A segunda fase ocorre quando os timócitos cruzam a membrana basal dos vasos, e situam-se entre as células endoteliais e os pericitos, entrando no espaço perivascular (PVS). A última fase é a migração transendotelial reversa, que os timócitos deixam o PVS e entram na corrente sanguínea, juntando-se ao *pool* de células T periféricas como recentes emigrantes tímicos (RTE) (FINK, 2013).

Após a descrição do processo de maturação dos timócitos (figura 3), e conforme já explicitado, o microambiente tímico, em seus componentes celulares e moleculares, é crucial neste processo. Porém fatores extrínsecos ao órgão são capazes de influenciar positiva ou negativamente o timo. Inclusive, diversas condições patológicas e alterações ambientais, alimentares e hormonais atuam sobre a fisiologia tímica. Assim, por vários estudos publicados e evidências, assume-se que o papel imunoendócrino do timo é inquestionável (CSABA, 2016).

Figura 3. Esquema da diferenciação de timócitos



Os precusores de células T entram no timo na junção corticomedular, e então começam a migrar e se diferenciar através do estroma tímico. No córtex, os timócitos passam pela seleção positiva, frente ao contato principalmente com cTECs, e na medula ocorre a seleção negativa. As cores nos timócitos indicam seu estágio, sendo em amarelo: timócitos DN, em vermelho: timócitos DP, e em verde: timócitos SP (adaptado de NUNES-ALVES, et al., 2013).

3.2.5 Controle neuroendócrino do timo

A imunoneuroendocrinologia foi reconhecida como um campo científico no início do século XX, logo após Paul Ehrlich identificar a imunologia como um domínio específico de pesquisa. Na década de 1930, Hans Selye introduziu o conceito de imunossupressão secundária e da involução tímica induzida pelo estresse e mediado pelo córtex adrenal. A dissecção das intrincadas interações celulares e moleculares entre os principais sistemas de sinalização célula a célula - os sistemas neural, endócrino e imunológico - foi relançada na década de 1980, mas este domínio científico vem recebendo uma aceitação gradual pela comunidade científica (GEENEN, et al., 2013).

A imunoneuroendocrinologia foi crescendo exponencialmente e a auto-tolerância imunológica de proteínas neuroendócrinas é agora reconhecida como uma necessidade óbvia para a preservação geral da homeostase de organismos vivos. De fato, todos os hormônios e neuropeptídeos exercem um controle importante sobre as respostas inflamatórias e imunes através da ligação e ativação de receptores neuroendócrinos expressos por células

imunocompetentes. Além disso, as inervações dos sistemas simpático e parassimpático sobre o timo, baço, medula óssea e linfonodos sustentam a existência de relações inter-sistêmicas (GEENEN, 2012).

O estresse é capaz de quebrar a homeostase do sistema imunológico, e várias condições estressantes causam involução tímica aguda, incluindo sofrimento emocional, desnutrição e gravidez. Além disso, numerosos processos podem desencadear a involução tímica durante condições patológicas, tais como infecções bacterianas e virais, inflamação, tratamento clínico do câncer e regimes preparativos para transplantes de medula óssea (SHANLEY, et al., 2009; DOOLEY & LISTON, 2012). Portanto, devem existir mecanismos para regular estes processos em vários contextos (YAN, et al., 2017).

A involução tímica transiente (decorrente de fatores ambientais ou patológicos) está relacionada a um aumento no risco de autoimunidade, pois a timopoiese diminuída leva a uma proliferação homeostática de células T na periferia, que por sua vez, pode aumentar a proliferação de células T auto-reativas e desencadear doenças autoimunes. Concernente à atrofia tímica induzida pelo estresse, deve-se levar em consideração que a secreção de catecolaminas e glicocorticoides são o ponto-chave deste processo, tendo em vista que as células tímicas, como TECs e as diferentes subpopulações de timócitos expressam os receptores a essas substâncias (DIMITRIJEVIC, et al., 2012).

Hormônios e neuropeptídeos modulam as interações do microambiente tímico, a produção de citocinas e a atividade endócrina tímica, influenciando a apoptose e proliferação dos timócitos, bem como sua diferenciação. Dentre estes hormônios, citam-se a prolactina (PRL) (SAVINO, 2017), o hormônio do crescimento (GH) (SAVINO, et al., 2003) e os hormônios da tireoide (DORSHKIND & HORSEMAN, 2000), que são capazes de modular (via seus receptores específicos) a secreção de hormônios tímicos (como a timulina) pelas TECs. Por sua vez, TECs e timócitos também podem secretar hormônios neuroendócrinos, como GH, PRL, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), além de citocinas que influenciam a atividade do sistema nervoso (BORGHETTI, et al., 2009).

Dentre as células do estroma tímico, existem as células neurais, que durante o desenvolvimento embrionário são derivadas da crista neural. Estas

células são requeridas para o desenvolvimento do órgão e participam da diferenciação dos timócitos. Além disso, há a expressão de marcadores neuronais, neuropeptídeos e fatores neurotróficos pelo epitélio tímico e outras células do estroma, sugerindo que uma rede neural esteja presente dentro do microambiente tímico e que influencie a interação entre timócitos e células estromais (MARODER, et al., 2000).

Os neuropeptídeos são pequenas proteínas localizadas dentro do sistema nervoso central e periférico que regulam muitas atividades fisiológicas no organismo, ao ligarem-se aos seus receptores específicos. Como exemplos, citam-se a somatostatina, a substância P, o polipeptídeo vasointestinal (VIP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o neuropeptídeo Y (NPY). Estas proteínas são altamente conservadas e expressas pelo timo de diferentes espécies, sendo capazes de modular a fisiologia tímica (SILVA & PALMER, 2011).

O timo também é alvo de ação dos neuropeptídeos ocitocina e vasopressina, os quais são secretados pelo lobo posterior da pituitária – neuro-hipófise (HANSENNE, et al., 2005). As TECs produzem ambos os neuropeptídeos, mas não foi detectada a produção de vasopressina em timócitos (MOLL, et al., 1988). Acerca do receptor de ocitocina, todas as subpopulações de timócitos o expressam, no entanto, o receptor de vasopressina foi diferencialmente encontrado apenas em timócitos DP e SP CD8, no entanto o papel destas proteínas no timo ainda precisa ser melhor elucidado (SAVINO, et al., 2016).

As moléculas de orientação de axônios, como semaforinas, efrinas e netrinas, estão principalmente envolvidas no direcionamento de axônios, segregação em zonas entre populações axonais, e na polaridade e migração de neurônios. Entretanto, recentes evidências indicam que elas desempenham funções importantes na regulação do sistema imune (GARCÍA-CECA, et al., 2015; FEINSTEIN & RAMKHELAWON, 2017). Embora o significado fisiológico e patológico destas proteínas (especialmente das semaforinas) sobre o timo não seja completamente conhecido, já foi reportado que elas possuem efeitos sobre a migração de timócitos ou o seu desenvolvimento (TAKEGAHARA, et al., 2005; GUO, et al., 2013).

3.3 Semaforinas e seus receptores

Semaforinas foram nomeadas por suas propriedades que são análogas ao sistema de bandeiras e luzes usados na comunicação ferroviária e marítima. Elas foram inicialmente identificadas como moléculas repulsivas de orientação para axônios, direcionando-os aos seus alvos apropriados. Mais de 20 tipos de semaforinas foram identificadas, e elas têm diversas funções em muitos processos fisiológicos, incluindo cardiogênese, angiogênese, vasculogênese, osteoclastogênese e a regulação imunológica. Semaforinas também estão implicadas na patogênese de doenças humanas, incluindo tumorigênese/metástase tumoral, doenças neurodegenerativas, morte súbita e distúrbios imunológicos (TAKAMATSU & KUMANOGOH, 2012).

Semaforinas são proteínas secretadas ou associadas à membrana celular, que são caracterizadas por um domínio extracelular amino-terminal "Sema" bastante conservado. Baseado em suas estruturas C-terminais, este grupo diverso de proteínas foi ainda dividido em oito subclasses. As semaforinas nas classes I (expressas em invertebrados) e IV-VII (expressas em vertebrados) estão associadas à membrana, enquanto que aquelas nas classes II (invertebrados), III (vertebrados) e VIII (codificados por vírus) são secretadas. Dois grupos de proteínas, plexinas e neuropilinas (NPs), foram identificados como receptores primários de semaforina (TAKAMATSU, et al., 2010a).

As semaforinas secretadas pertencentes à classe 3 não se ligam diretamente a plexinas, mas se ligam à neuropilina 1 ou 2, que por sua vez, ativam as plexinas (ANDREWS, et al., 2017). As neuropilinas formam complexos com plexinas e estas funcionam como elementos de transdução de sinal. As neuropilinas também funcionam como receptores de vários fatores pró-angiogênicos, incluindo várias formas do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (RAIMONDI, 2014). A ativação de plexinas por semaforinas modula a adesão celular e induz mudanças na organização do citoesqueleto de células-alvo. A exposição prolongada de Sema3 às NPs inibe a proliferação celular e induz a apoptose em células endoteliais, neurônios e células de câncer de mama e pulmão (NEUFELD & KESSLER, 2008).

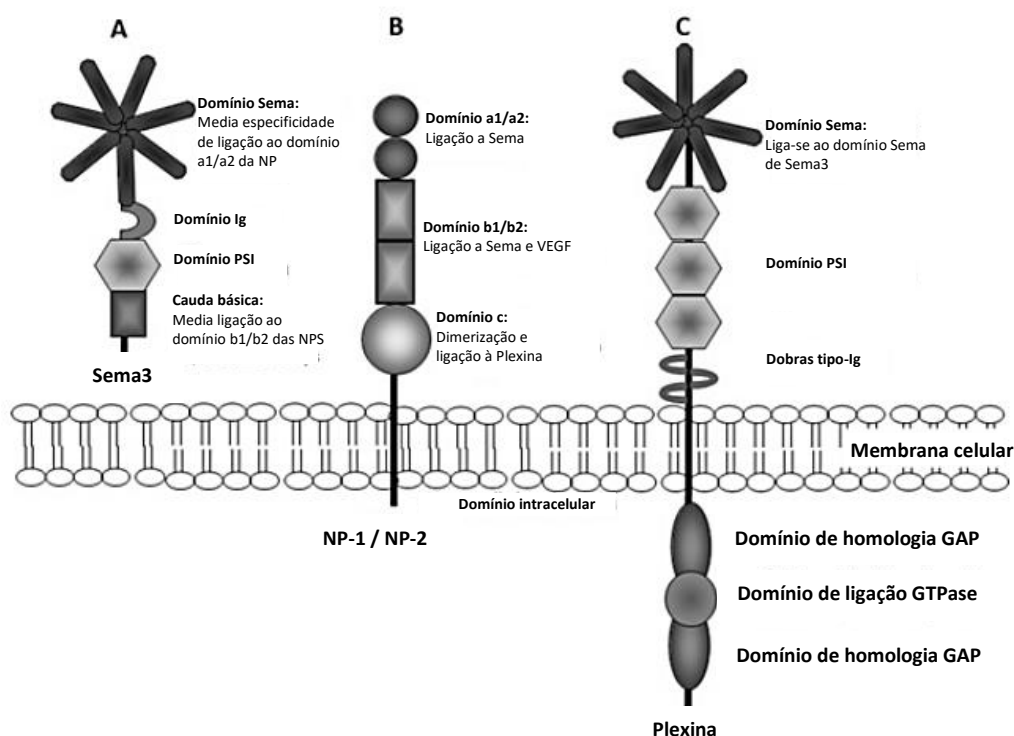
A classe 3 das Semas consiste em sete moléculas solúveis de ~100 kDa (designadas por letras de A a G), que são produzidas como proteínas secretadas

por células de múltiplas linhagens, incluindo células endoteliais e epiteliais, neurônios e células tumorais. Em Sema3 (figura 4A), o domínio Sema N-terminal é seguido por um domínio plexina-semaforina-integrina (PSI), um domínio semelhante à imunoglobulina (Ig) e um domínio básico C-terminal (KRUGER, et al., 2005).

O domínio extracelular da NP-1 (figura 4B) contém dois domínios de ligação ao complemento C1r e C1s (a1/a2), dois domínios de homologia do fator de coagulação V/VIII (b1/b2) e um domínio MAM (meprina, A5 e receptor de tirosina fosfatase μ), enquanto que o curto domínio citoplasmático tem cerca de 40 aminoácidos e contém uma sequência C-terminal com 3 aminoácidos (SEA) que representa um motivo de ligação a PDZ. Por esta curta cauda citoplasmática da NP-1, ela não exibe atividade de sinalização intracelular (VALDEMBRI, et al., 2016).

Na estrutura das plexinas (figura 4C), o domínio intracelular contém um domínio de ativação da GTPase que é altamente conservado em toda a família de plexinas e é ativado na presença do seu ligante. Além disso, na estimulação da Sema3, quinases intracelulares como Fes / Fps e Fyn ligam-se ao domínio intracelular das plexinas, resultando na fosforilação do receptor e transdução de sinal (STATON, 2011).

Figura 4. Representação esquemática de Sema3 e seus receptores.



A) Sema3 são solúveis e caracterizadas por um grande domínio Sema, um domínio PSI e uma sequência básica C-terminal. (B) As neuropilinas são receptores transmembranares consistindo em dois domínios do tipo complemento (a1 / a2), dois domínios do tipo fator de coagulação V / VIII (b1 / b2) e um domínio MAM (domínio c). (C) Plexinas A1-A4 e D1 são também receptores transmembrana que contêm um domínio Sema, três domínios PSI, três dobras tipo Ig em sua região extracelular e dois domínios de homologia GAP (proteína ativadora de GTPase) e um domínio de ligação ao GTPase em sua região citoplasmática (adaptado de STATON, 2011).

3.3.1 Sema classe 3 e timo

A Sema3A é uma proteína de orientação que desempenha funções na localização de axônios, e direciona o movimento celular durante a organogênese, especialmente nos tecidos cardiovasculares, do pulmão e rim. Após a ligação ao seu receptor, os eventos intracelulares de sinalização são complexos, envolvendo a inibição de integrinas e da via PI3K/Akt, regulando a dinâmica dos microtúbulos; bem como a fosforilação de GTPases Rho, Rac e MICAL, alterando a dinâmica de polimerização de F-actina (TUFRO, 2014).

Efeitos de Sema3A sobre o timo foram inicialmente descritos por Lepelletier e colaboradores (2007), mostrando que as TECs e as subpopulações de tímócitos humanos produzem constitutivamente Sema3A, e que na adesão TEC:tímócitos ocorre um aumento na expressão de NP-1 em tímócitos. Além disso, a adesão de tímócitos a TEC é reduzida de maneira dose-dependente na

presença de Sema3A e esta molécula possui um efeito repulsivo na migração de timócitos. Mendes-da-Cruz e colaboradores (2009), em sua revisão, demonstram a porcentagem de timócitos positivos para NP-1, avaliando todas as subpopulações de timócitos em humanos e camundongos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Expressão de NP-1 nas subpopulações de timócitos humanos e murinos.

	Timócitos Totais	DN	DP	CD4	CD8
Humano	5,1 ± 1,2	10,5 ± 2,4	5,8 ± 1,3	8,4 ± 1,9	8,9 ± 2,0
Camundongo neonato	90,2 ± 1,1	55,5 ± 2,1	95,9 ± 0,9	54,5 ± 4,3	87,8 ± 2,8
Camundongo adulto jovem	88,5 ± 0,6	25,2 ± 1,3	98,9 ± 0,7	21,9 ± 0,5	94,6 ± 2,4

Valores representam a média ± erro padrão da média de timócitos positivos para NP-1, provenientes de 19 amostras de timo humano, cinco camundongos neonatos e dois camundongos adultos (adaptado de MENDES-DA-CRUZ, et al., 2009).

Garcia e colaboradores (2012) demonstraram que a migração de timócitos humanos frente a CXCL12 é inibida pela Sema3A, por meio da redução na expressão de CXCR4. Lins e colaboradores (2018) observaram que o tratamento de timócitos murinos por 30 minutos com Sema3A altera as propriedades biomecânicas da membrana celular, resultando na diminuição da adesão e migração destes timócitos.

Ao contrário de outras proteínas da classe Sema3, a Sema3E liga-se diretamente à Plexina-D1, sem intermédio das neuropilinas. Sua função biológica foi explorada pela primeira vez na formação de vasos intersomáticos (localizados entre os somitos e tubo neural durante o desenvolvimento embrionário) e a sinalização Sema3E-Plexina-D1 foi descrita no envolvimento funcional de muitos tipos celulares (OH & GU, 2013).

Choi e colaboradores (2008) demonstraram a expressão de transcritos de *Sema3E* no RNA total do timo. A análise regional dos transcritos indicou que esta Sema é expressa muito fortemente na medula em comparação com a junção corticomedular, córtex e zona subcapsular. Estes resultados sugerem que Sema3E pode formar um gradiente da medula para a cápsula tímica e regular a

migração dos timócitos. Ueda e colaboradores (2016) mostraram que Sema3E reduz a adesão de timócitos a ICAM-1 na presença de CCL21 e CCL25, e também inibe o contato entre timócitos e APCs.

A Sema3F, embora classicamente considerada como uma molécula de orientação axonal, é altamente expressa em múltiplos órgãos durante o desenvolvimento, como pele, pulmão e rim (MUNRO, et al., 2017). No desenvolvimento vascular, a Sema3F inibe a angiogênese e a sua sinalização, via NP, resulta na redução da sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais (SAKURAI, et al., 2012). Adicionalmente, Sema3F é capaz de inibir o crescimento de tumor e a metástase, realizando um papel inibitório na tumorigênese nos cânceres de pulmão, ovário e de mama (LIU, et al., 2016).

Com relação às ações de Sema3F sobre o timo, Takahashi e colaboradores (2008), relataram que esta Sema é expressa no primórdio tímico no décimo dia embrionário em camundongos e o seu nível de expressão reduz progressivamente com o desenvolvimento do órgão. Acredita-se que a Sema3F influencie as interações do timo em desenvolvimento com os tecidos adjacentes, como vasos sanguíneos e nervos, provavelmente recrutando precursores de células T para o timo. Mendes-da-Cruz e colaboradores (2014) demonstraram que Sema3F, isoladamente, teve um efeito repulsivo nos timócitos, e quando adicionado conjuntamente com CXCL12 ou S1P, esta Sema reduziu a migração de timócitos, envolvendo o bloqueio da reorganização do citoesqueleto de F-actina.

Acerca dos outros membros da classe 3 das Semas, que são Sema3B, Sema3C e Sema3G, ao melhor do nosso conhecimento, não foram encontrados trabalhos relacionando essas Semas ao timo. O único relato encontrado sobre Sema3D e timo demonstra que os transcritos para esta proteína são expressos nos primórdios embrionários do tecido tímico murino, mas não houve a detecção da proteína no tecido diferenciado posteriormente (TAKAHASHI, et al., 2008).

Considerando as informações sobre Sema3A no timo, e embora ser esta a principal Sema estudada neste contexto, ainda há muitas hipóteses a serem testadas. Dados recentes de nosso grupo demonstraram uma associação entre alterações biomecânicas e a capacidade migratória de timócitos quando tratados com Sema3A (LINS, et al., 2018 – Anexo A). Diante do exposto, parece-nos importante aprofundar os estudos sobre os efeitos da Sema3A nos componentes

linfoide e principalmente do estroma tímico, no que diz respeito aos aspectos da morfologia, citoesqueleto, ligantes e receptores de matriz extracelular e, conseqüentemente, nas interações das células estromais com os timócitos nos processos de adesão e migração.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (machos ou fêmeas, entre 4 a 8 semanas de idade) da linhagem isogênica C57BL/6, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas, e mantidos sob barreiras sanitárias restritas, temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz/escurecimento de 12h. A água filtrada e a ração irradiada foram fornecidas “*ad libitum*”. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios internacionais de bem-estar animal, sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL, CEUA nº 14/2015 (Anexo B).

4.2 Obtenção dos timócitos e células estromais tímicas

Após eutanásia dos animais por aprofundamento anestésico com o barbitúrico tiopental (Cristália, Itapira, São Paulo), 120 mg/Kg, via intraperitoneal, o timo foi removido cirurgicamente. Para obtenção dos timócitos, o órgão foi macerado com auxílio de um êmbolo de seringa estéril, e as células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), contendo 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA), 1% de L-glutamina e 400 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina (ambas de Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). Os timócitos foram mantidos a 4°C até serem utilizados para os experimentos.

Para obtenção das células estromais tímicas, o protocolo de Gray e colaboradores (2002) foi utilizado com algumas modificações. Após eutanásia dos animais, três a cinco timos foram picotados em ínfimos fragmentos com uma tesoura estéril, e lavados extensivamente com PBS (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) para liberar os timócitos dos fragmentos. Então estes foram transferidos para uma solução com uma mistura enzimática (Colagenase tipo II 300 µg/mL, DNase tipo IV 150 µg/mL e Dispase tipo I 75 µg/mL – todas as enzimas provenientes de Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) em RPMI puro e deixados a 37°C por 2 horas. A cada 15 minutos, o tubo com as células e mistura enzimática foi agitado no vórtex por 10 segundos. Após centrifugação, as células foram passadas pelo *cell strainer* de 100 µm, homogeneizadas e plaqueadas em garrafas de cultura com meio RPMI completo suplementado com aminoácidos não-essenciais (1%) e piruvato de sódio (1%), ambos de Sigma, St. Louis,

Missouri, EUA. Após trocas diárias de meio (para remover os timócitos não-aderentes e debris celulares), as células estromais foram mantidas a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, durante cinco ou seis dias. A passagem das células foi realizada por tratamento com solução de tripsina-EDTA (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) e auxílio de *cell scraper*, e posteriormente utilizadas para os experimentos. Para caracterização das células estromais por citometria de fluxo, as células eram desaderidas da garrafa de cultura com PBS-EDTA (10 mM) gelado (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

4.3 Tratamento com semaforina-3A

Em todos os ensaios, os tratamentos com Sema3A (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), na concentração de 100 ng/mL (LEPELLETIER, et al., 2007), foram realizados em meio RPMI a 2% de SBF. As células estromais foram previamente plaqueadas por 16h para adesão e espraiamento celular (VIANA, et al., 2015), em meio RPMI completo. Após substituição do meio, as células foram tratadas durante 24h com Sema3A. No caso dos timócitos, após a obtenção destas células de maneira estéril a partir da maceração dos timos dos camundongos, os timócitos foram plaqueados em placas de 24 poços e tratados durante 1h antes dos ensaios.

4.4 Avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

Timócitos (5×10^6) ou células estromais (2×10^4) foram plaqueados sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços e tratados com Sema3A. Posteriormente, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 0,5% de glutaraldeído (VETEC, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) em PBS por 5 minutos e lavadas com água ultrapura. Após secagem das lamínulas, elas foram submetidas a um processo de metalização com alvo de ouro (10 mA), durante 5 minutos. Fotomicrografias foram obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan, no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas.

Nas eletromicrografias de timócitos, foram avaliados os seguintes parâmetros para quantificação dos filopódios: a) total de células, b) células com filopódios, c) células sem filopódios, e d) total de filopódios. Dessa forma, obteve-

se a média de filopódios por célula e também a porcentagem de células com e sem filopódios.

4.5 Ensaio de citometria de fluxo

Timócitos frescos (1×10^6) ou células estromais (1×10^5) tratados ou não com Sema3A, foram transferidos para placas de 96 poços fundo U, centrifugados e incubados com uma mistura apropriada de anticorpos acoplados a fluorocromos, durante 20 minutos, a 4°C e protegidos da luz. Posteriormente as células foram lavadas com PBS, fixadas com 2% de formaldeído (VETEC, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) em PBS e analisadas pelo citômetro de fluxo FACSCanto II, com aquisição dos dados pelo *software* Diva e, para confecção dos gráficos, foi empregado o *software* WinMDI 2.9. Os anticorpos utilizados neste trabalho estão listados no quadro abaixo.

Quadro 1. Lista de anticorpos utilizados neste trabalho.

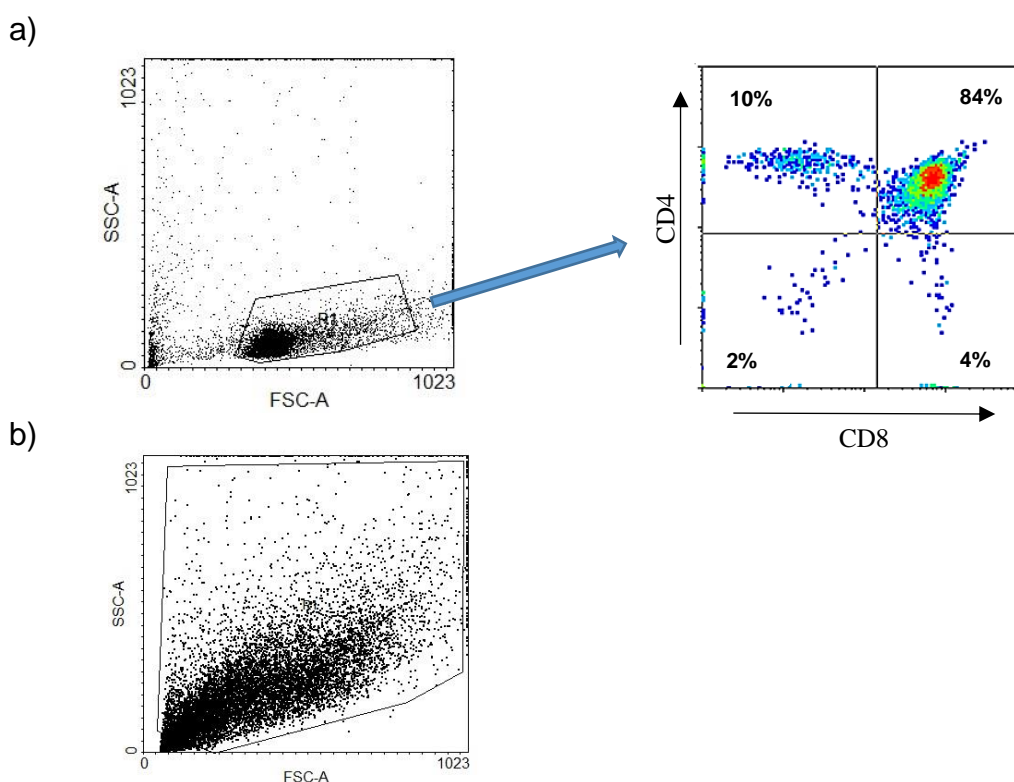
Anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem				
Marcador	Anticorpo	Molécula-alvo	Fluorocromo	Marca
Subpopulações de timócitos	Anti-CD4	Co-receptor do TCR para ligação ao MHC de classe II	APC	BD
	Anti-CD8	Co-receptor do TCR para ligação ao MHC de classe I	PerCP	eBioscience
Integrinas	Anti-CD11b	Integrina α M	APC	eBioscience
	Anti-CD11c	Integrina α X	FITC	BD
	Anti-CD49b	Integrina α 2	APC	BD
	Anti-CD49d	Integrina α 4	PE	BD
	Anti-CD49e	Integrina α 5	PE	BD
	Anti-CD49f	Integrina α 6	FITC	eBioscience
Receptor para Sema3A	Anti-CD304	Neuropilina-1	APC	Invitrogen
Células epiteliais	Anti-CD326	Molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM)	APC	eBioscience

	Anti-Pan-citoqueratina	Marcador de células epiteliais	FITC	eBiosciene
--	------------------------	--------------------------------	------	------------

Fonte: autor.

Os isotipos controles IgG1, IgG2a e IgG2b (conjugados aos seus respectivos fluorocromos) foram utilizados como controles negativos. A estratégia de *gate* utilizada para timócitos e células estromais está demonstrada na figura 5.

Figura 5. Estratégias de *gate* para timócitos e células estromais tímicas.



De acordo com os parâmetros pré-estabelecidos de tamanho e granulosidade para timócitos (a) e células estromais tímicas (b), as células foram analisadas por citometria de fluxo, e a estratégia de *gate* empregada para a avaliação fenotípica destas células está demonstrada nos *dotplots* e *density plots* acima.

4.6 Ensaio de imunofluorescência

As células estromais (2×10^4) foram plaqueadas em lâminas *labtek* (de 8 poços) e tratadas ou não com Sema3A. Após lavagem com PBS, as culturas foram fixadas com metanol absoluto (Synth, Diadema, São Paulo) por 5 minutos, seguido pelo bloqueio com 1% de BSA (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) em PBS durante 45 minutos. Então foram incubadas com o anticorpo primário (anti-fibronectina, anti-laminina, anti-pan-citoqueratina, anti-citoqueratina-5 ou anti-

citoqueratina-8, todos provenientes da Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) em câmara úmida por 1 hora. Em seguida, as culturas foram incubadas com o anticorpo secundário GAR-FITC durante 45 minutos. As células foram marcadas com DAPI (diluição 1:1000), para visualização do núcleo, e as lâminas foram montadas (por adição de PBS-glicerol 1:3 e recobertas com lamínula de vidro) para visualização ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A quantificação da deposição das moléculas foi determinada em pixels, a partir de dez fotomicrografias de campos aleatórios por grupo, utilizando o programa ImageJ 1.47.

4.7 Marcação direta para citoesqueleto de F-actina

Células estromais (2×10^4) foram plaqueadas em poços de uma lâmina *labtek* e tratadas com Sema3A. Após lavagem com PBS, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (Synth, Diadema, São Paulo) em PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) por 5 minutos. Em seguida, as células foram marcadas para F-actina pela coloração direta com faloidina-FITC (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) durante 1 hora e o núcleo marcado com DAPI. As lâminas foram montadas com glicerol (VETEC, Duque de Caxias, Rio de Janeiro) na proporção de 1:3 em PBS e cobertas com lamínulas para observação ao microscópio de fluorescência.

Por sua vez, os tímócitos em suspensão foram tratados e marcados para as moléculas CD4/CD8 em sua superfície celular por 20 minutos e, posteriormente, fixados e permeabilizados com o kit *Citofix/Citoperm* (BD Biosciences, San Jose, California, EUA). Em seguida, as células foram lavadas com tampão *Permwash* e marcadas com faloidina-FITC durante 30 minutos e avaliadas imediatamente por citometria de fluxo, para quantificação da intensidade de fluorescência – o que indica a quantidade de F-actina polimerizada no citoplasma. Em outros ensaios, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência (para avaliação do arranjo da F-actina no citoplasma) e fotomicrografias representativas foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i.

4.8 Ensaio de adesão celular

Este ensaio foi utilizado para avaliar o efeito da Sema3A na interação tímócito:célula estromal. O pré-tratamento com Sema3A foi aplicado da seguinte

forma: a) apenas os timócitos foram pré-tratados; b) apenas as células estromais foram pré-tratadas; c) ambas as células foram pré-tratadas, mas separadamente; d) a Sema3A foi adicionada durante o ensaio de adesão.

As células estromais (2×10^4) foram plaqueadas em garrafas de cultura em meio RPMI completo e após 24 horas, timócitos frescos (1×10^6) foram adicionados sobre essas culturas durante 1 hora em estufa a 37°C . Os timócitos não-aderentes foram retirados cuidadosamente por uma lavagem com PBS a temperatura ambiente. Os timócitos que aderiram ao estroma foram recolhidos por lavagem com PBS gelado, contados e marcados com anticorpos específicos para se determinar o fenótipo CD4/CD8 por citometria de fluxo.

4.9 Ensaio de migração celular

Os ensaios de migração de timócitos *ex-vivo* foram desenvolvidos utilizando-se o sistema “*transwell*”, empregando insertos com membranas de policarbonato de 6,5 mm de diâmetro e poros de 5 μm , em placas de 24 poços. Inicialmente, células estromais foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio RPMI completo e mantidas em estufa por 24 horas. Estas células foram tratadas ou não com Sema3A. O meio de cultura destas células não foi substituído para a inserção dos *transwells*.

Foi realizado o bloqueio da membrana do *transwell* utilizando-se PBS/BSA 0,1% antes de se adicionar os timócitos para a migração. Os *transwells* foram adicionados aos poços da placa de 24 poços (nos quais, 24 horas antes, já haviam 2×10^4 células estromais plaqueadas) e os timócitos (1×10^6), previamente tratados ou não, foram plaqueados na câmara superior do *well* juntamente com 100 μL de RPMI/BSA 1%. A migração dos timócitos ocorreu por três horas. As células que migraram para a câmara inferior foram quantificadas e avaliadas por citometria de fluxo, quanto à expressão das moléculas CD4/CD8, para identificação das subpopulações.

Foram realizadas três estratégias de tratamento com a Sema3A. A primeira foi realizar o pré-tratamento dos timócitos. Assim foi possível avaliar o efeito isolado da Sema3A sobre os timócitos, “preparando-os” para a migração. A segunda foi tratar apenas as células estromais e manter o meio condicionado. Dessa forma, foi possível verificar a ação da Sema3A sobre o estroma. A terceira estratégia foi adicionar a Sema3A na câmara superior juntamente com os

timócitos, para atuar durante o processo migratório. É importante frisar que em todos os experimentos, não houve troca do meio de cultura em que as células estromais foram cultivadas, para que os fatores solúveis secretados por elas estivessem presentes durante a migração dos timócitos.

4.10 Análise estatística

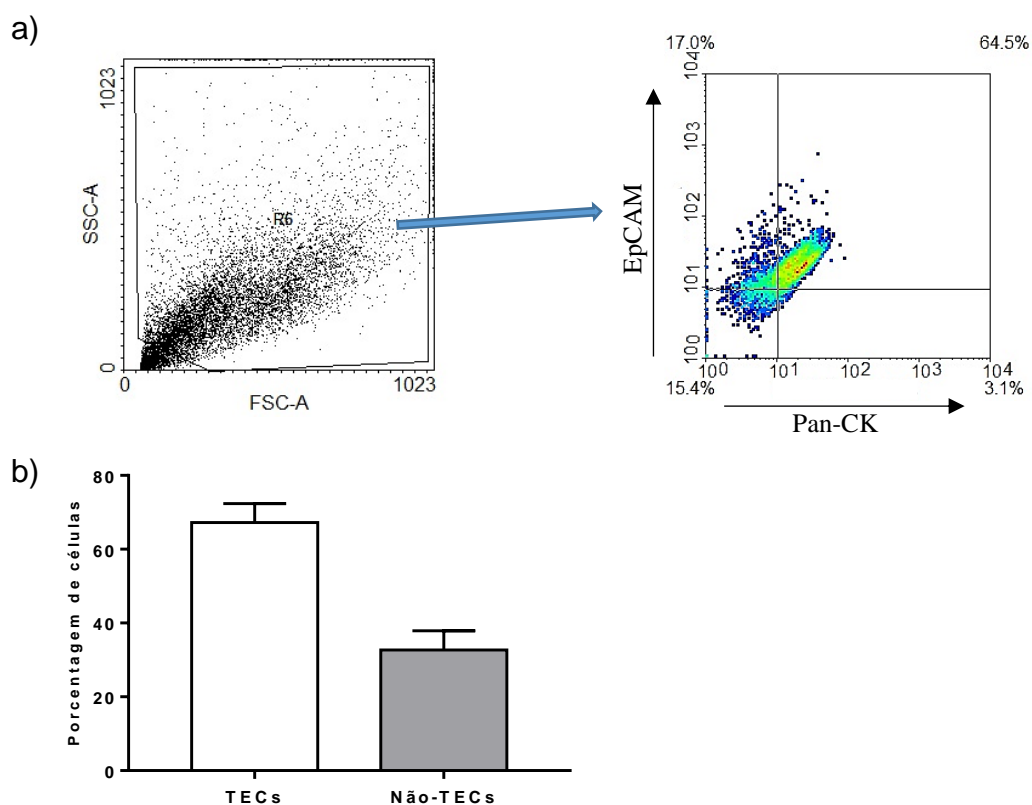
Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados através do teste *t* de Student. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para construção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7.00.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das células do estroma tímico.

Inicialmente, o fenótipo das células estromais tímicas foi avaliado por citometria de fluxo. Com esta análise, foram identificados e quantificados os tipos celulares majoritários presentes nesta cultura primária. De acordo com os resultados, verificou-se que 67,22% das células são positivas para Pan-citoqueratina (Pan-CK) e EpCAM, sendo caracterizadas como células epiteliais tímicas (TECs). Além disso, os outros tipos celulares presentes (32,72% do total) foram designados como células não-TECs, as quais expressaram outros receptores celulares, como CD11b ($\alpha M\beta 2$), CD11c ($\alpha X\beta 2$), e CD49b (VLA-2), que são marcadores não-exclusivos para macrófagos, células dendríticas e fibroblastos, respectivamente (figura 6).

Figura 6. Caracterização das células estromais tímicas obtidas por meio de digestão enzimática.

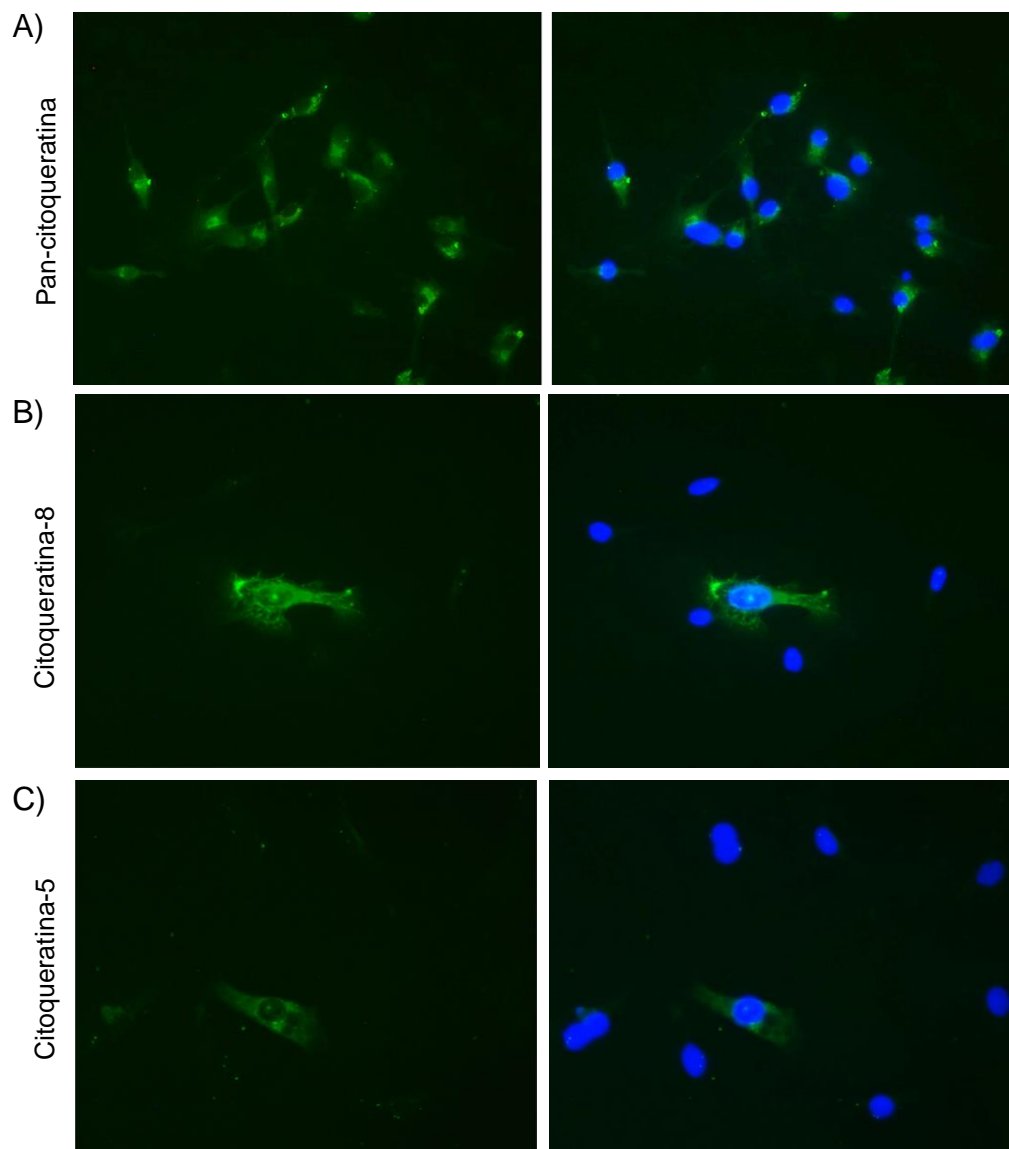


A) Após desaderir as células estromais, os anticorpos para EpCAM foram empregados para marcação extracelular, seguido da permeabilização da membrana plasmática, para marcação intracelular com pan-citoqueratina. O *dotplot* na esquerda mostra a estratégia inicial de *gate*. O *densityplot* na direita demonstra o percentual representativo das células com os diferentes fenótipos. Foram realizados dois experimentos independentes, com $n=5$. B) As barras representam média \pm desvio padrão da porcentagem dos tipos celulares supracitados.

A partir desses dados, percebeu-se que as células epiteliais tímicas são o tipo celular predominante nesta cultura primária e foi também realizada a caracterização por meio de imunocitoquímica. A expressão das seguintes moléculas foi avaliada: pan-citoqueratina (para confirmar o fenótipo epitelial), citoqueratina 8 (marcador de célula epitelial tímica cortical) e citoqueratina 5 (marcador de célula epitelial tímica medular).

Foi constatado que a maioria das células do estroma foram positivas para pan-citoqueratina, confirmando a análise realizada por citometria de fluxo. Além disso, foram observadas células que expressavam a citoqueratina 8 ou a citoqueratina 5, confirmando seu fenótipo cortical ou medular, respectivamente (figura 7). Não foi realizada a quantificação desses subtipos epiteliais na cultura, apenas a constatação de que estavam presentes no estroma.

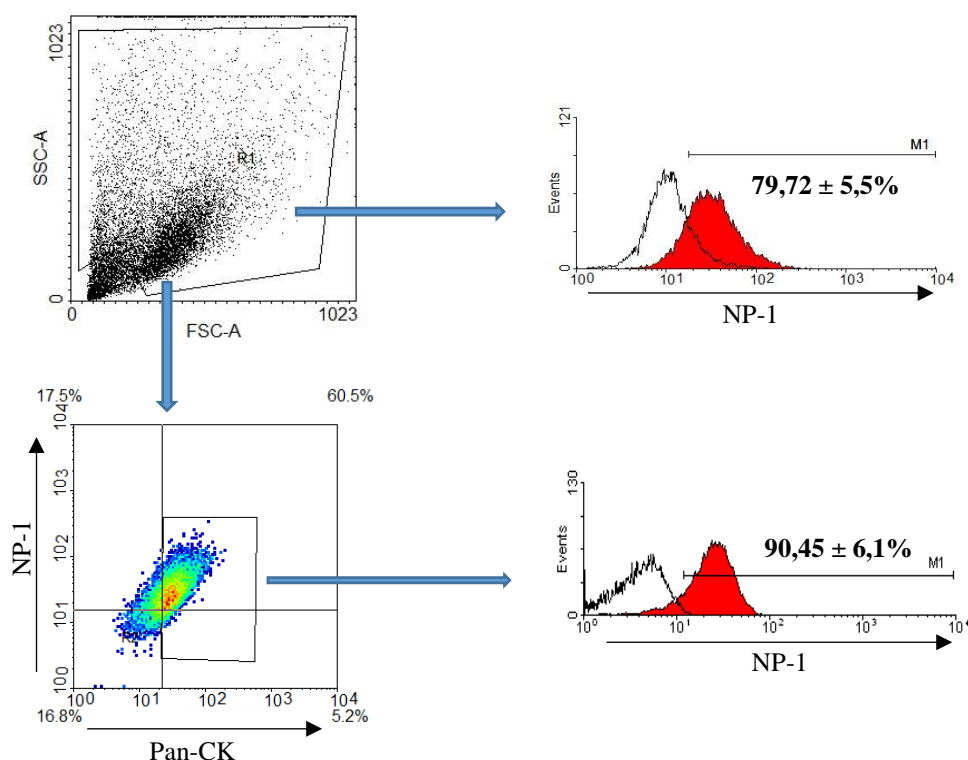
Figura 7. Caracterização das células epiteliais tímicas por imunocitoquímica.



As células foram plaqueadas em *labtek* e marcadas para pan-citoqueratina (A), citoqueratina 8 (B) e citoqueratina 5 (C). As células positivas apresentam marcação em verde e as negativas apresentaram apenas o núcleo em destaque pelo DAPI (em azul). Aumento: (A) 200x, (B) e (C) 400x.

Além dessa caracterização, foi avaliada a expressão do receptor da Sema3A, a NP-1, presente nas células estromais tímicas. Como resultado, observou-se que 79,72% do total de células estromais foram positivas para NP-1 e que 90,45% das TECs expressam o receptor NP-1 na superfície celular (figura 8).

Figura 8. Expressão de neuropilina-1 por células estromais tímicas murinas.



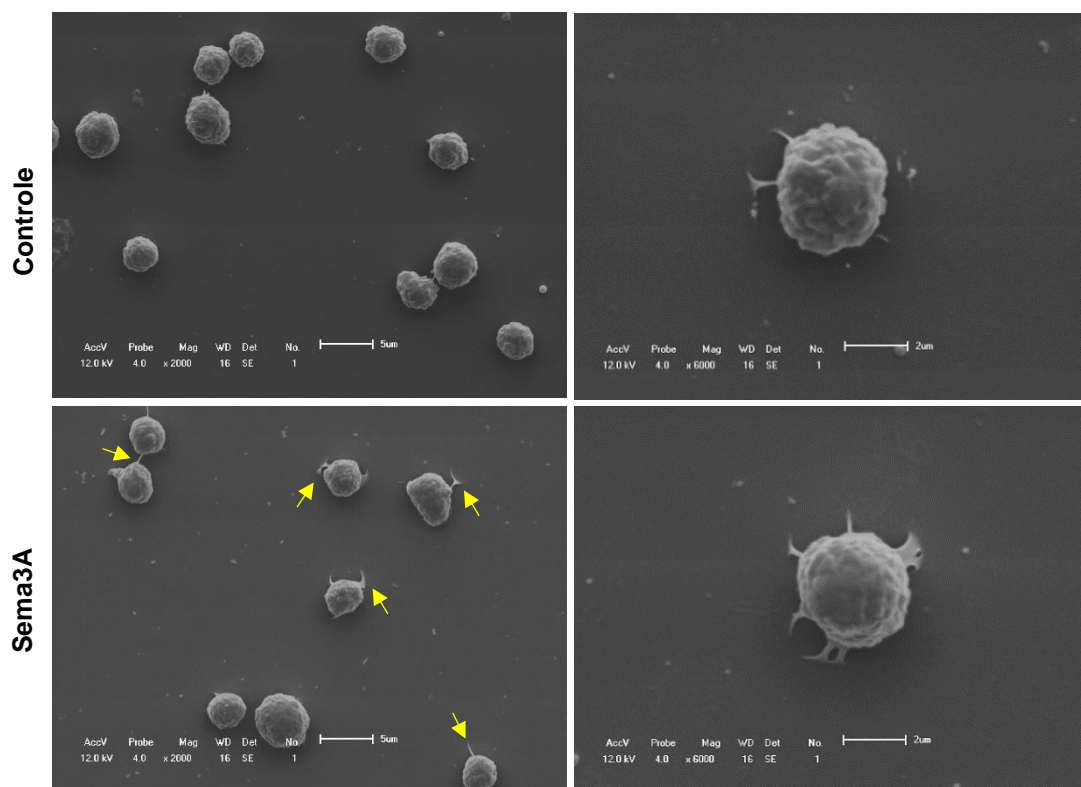
Células estromais tímicas foram marcadas com anti-CD304 (para avaliar expressão de NP-1) e anti-pancitoqueratina (Pan-CK), para determinar seu fenótipo epitelial. Após fixadas, foram avaliadas por citometria. O *dotplot* (superior à esquerda) revela a estratégia de *gate*. Ao lado direito superior, está a expressão de NP-1 em células totais do estroma, indicado pelo histograma representativo. O *densityplot* (inferior à esquerda) indica a expressão concomitante de Pan-CK e NP-1, sendo delimitado o *gate* apenas para TECs. Por fim, dentro da população de TECs, avaliou-se a expressão de NP-1 (histograma inferior à direita). O controle de marcação foi realizado com imunoglobulina não-relacionada (preto vazado). Os dados estão representados pela média \pm SD, com dois experimentos independentes, sendo $n=5$.

5.2 Sema3A altera a morfologia de timócitos e das células estromais tímicas.

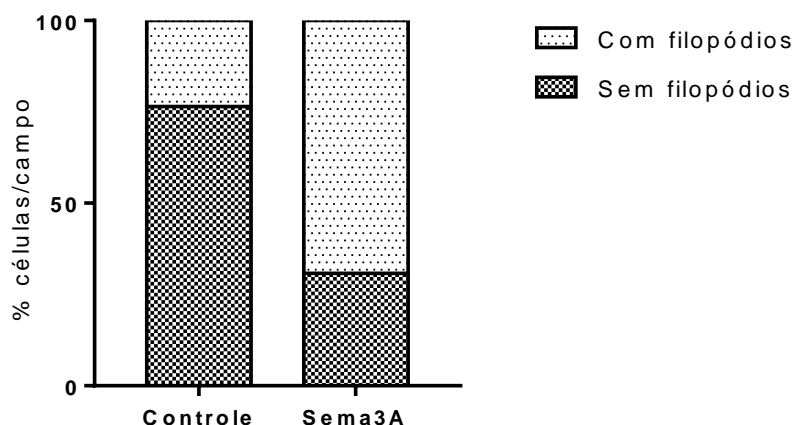
Para avaliar os aspectos morfológicos das células após a exposição ao tratamento com Sema3A, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. Após as análises, observou-se a aparência esférica dos timócitos, bem como ondulações em sua membrana celular. No grupo controle, foi possível identificar finas projeções citoplasmáticas em direção ao substrato, os filopódios. Na presença da Sema3A, qualitativamente, foi verificado que mais timócitos apresentavam filopódios e que estes eram mais proeminentes (figura 9).

Após quantificação dos timócitos e dos filopódios, constatou-se que o número de células com filopódios foi maior no grupo tratado com Sema3A, isto é, a Sema3A estimulou o surgimento de filopódios nos timócitos (figura 10). Ainda, foi observado o número médio de filopódios por célula e verificou-se que no grupo controle a média foi de 0,88 filopódios por timócito, enquanto que no grupo Sema3A, a média foi de 2,06 filopódios por célula.

Figura 9. Aspectos morfológicos dos timócitos após tratamento com Sema3A.



Células foram cultivadas sobre um *coating* de BSA 0,1%, em lamínulas redondas. Após fixação e metalização das amostras, as eletromicrografias foram obtidas. Setas em amarelo apontam para os filopódios. Aumento: 2000x e 6000x.

Figura 10. Efeitos da Sema3A na formação de filopódios em timócitos.

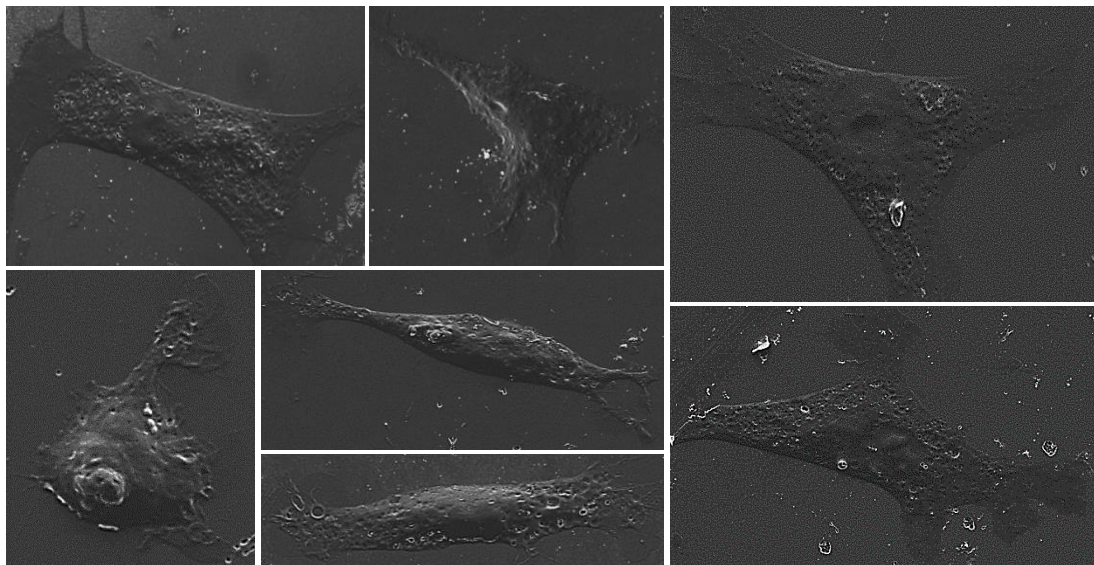
Dez eletromicrografias por grupo foram analisadas quanto à presença ou ausência de filopódios nos timócitos, da seguinte forma: o número total de timócitos por eletromicrografia foi contado e estabelecido como 100%. Seguidamente, foram contados (nestas mesmas eletromicrografias) o número absoluto de timócitos com e sem filopódios, e calculado por regra de três, o seu número correspondente em porcentagem. No gráfico, estão determinadas as porcentagens de células com e sem filopódios, indicando que o tratamento com Sema3A induz um aumento na quantidade de células com filopódios.

Posteriormente, as células estromais foram tratadas ou não com Sema3A e avaliadas quanto à sua morfologia utilizando microscopia eletrônica. As células apresentaram heterogeneidade quanto à sua forma, evidenciando os diferentes tipos celulares presentes na cultura. As células do grupo controle (independente do fenótipo celular) exibiram uma forma alongada, com citoplasma abundante e núcleo centralizado (figura 11A). As células expostas ao tratamento (independente do fenótipo celular) mostraram alterações morfológicas evidentes. Elas apresentaram prolongamentos citoplasmáticos mais proeminentes, condensados, que irradiaram a partir do corpo celular (figura 11B).

Figura 11. Morfologia das células estromais tímicas tratadas ou não com Sema3A.

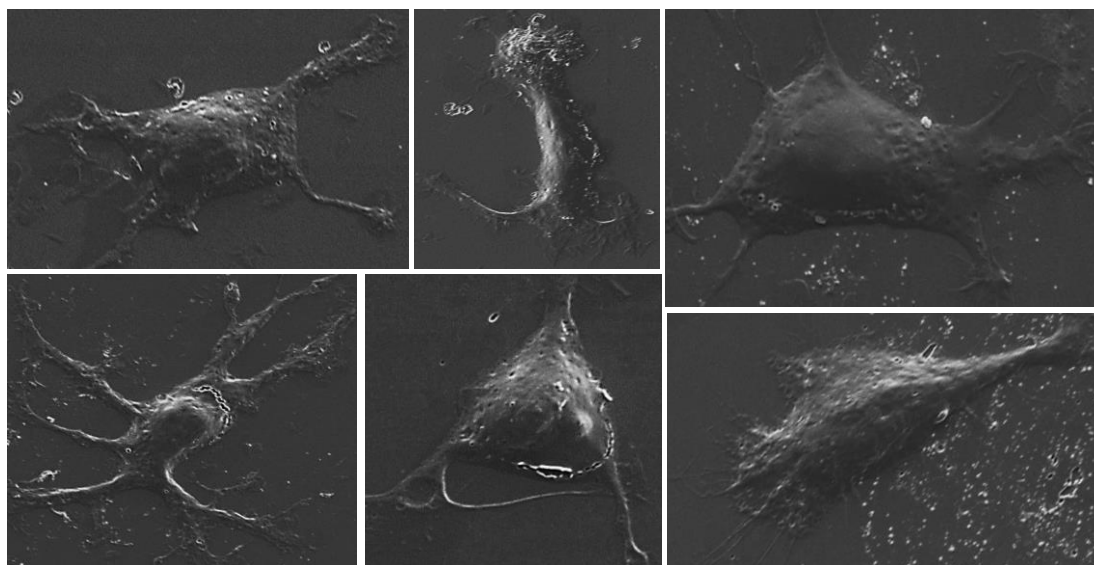
A)

Células estromais: grupo controle



B)

Células estromais: grupo Sema3A



A morfologia das células estromais tímicas foi avaliada. Em A) células do grupo controle observadas por microscópio eletrônico de varredura, com um citoplasma mais abundante e espraiamento sobre o substrato. B) O tratamento com Sema3A nas células estromais evidencia os prolongamentos citoplasmáticos que irradiam a partir do corpo celular. Aumento: 1500x.

Observou-se que a Sema3A possui efeitos sobre a morfologia de tímócitos, induzindo o surgimento de filopódios, e sobre as células estromais tímicas, promovendo a emissão de projeções celulares. Estas alterações estão diretamente ligadas à reorganização do citoesqueleto de F-actina; assim, o

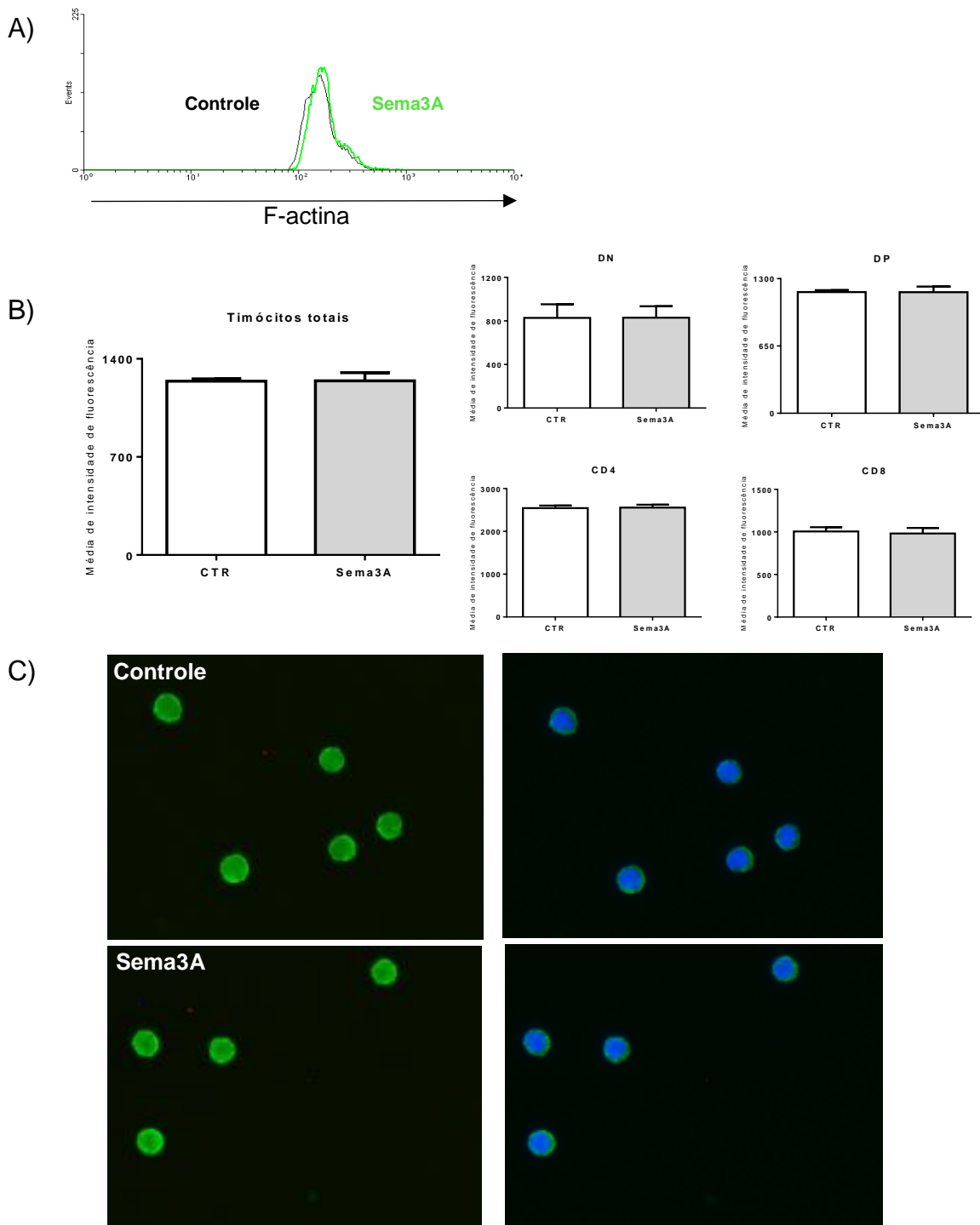
próximo objetivo foi verificar se a Sema3A atua sobre o citoesqueleto em timócitos e em células estromais.

5.3 Efeito da Sema3A sobre o citoesqueleto de F-actina em timócitos e células estromais tímicas.

Para a avaliação da F-actina, timócitos foram permeabilizados e marcados com faloidina-FITC. Posteriormente, analisados por citometria de fluxo (para medir intensidade média de fluorescência) e por microscopia de fluorescência (para a obtenção de fotomicrografias, a fim de se observar a organização do citoesqueleto). Na população total de timócitos a média intensidade de fluorescência não foi alterada na presença de Sema3A (figura 12A), mantendo-se inalterada em todas as subpopulações de timócitos (figura 12B) e não houve rearranjo na organização da F-actina no citoplasma dos timócitos (figura 12C), indicando que Sema3A não induz a formação de filamentos adicionais de actina no citoplasma destas células. O conteúdo de F-actina foi equivalente em períodos de tratamento mais curtos (15 e 30 minutos - dados não mostrados), reforçando o resultado encontrado. Além disso, em virtude de os filopódios serem estruturas transientes e delicadas, não foi possível observá-los nos timócitos neste ensaio, pois para esta análise as células estavam em suspensão no meio de cultura.

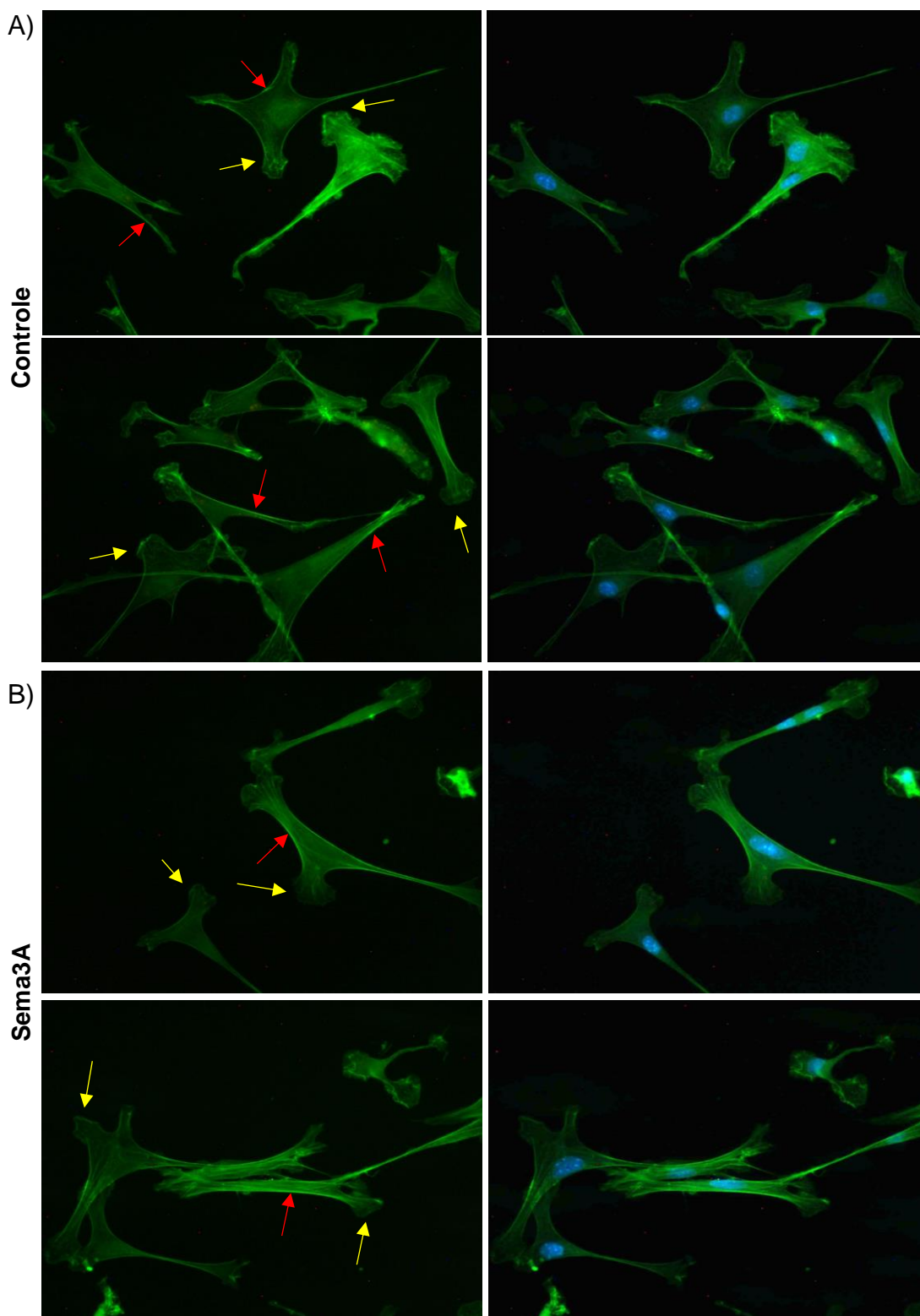
Em relação às células estromais, após a marcação com F-actina, foi observado que no grupo controle as células mostraram-se mais espalhadas (maior área de citoplasma), com lamelipódios largos e fibras de estresse dorsais e ventrais em abundância (destacadas nos limites periféricos da célula) (figura 13A). No grupo tratado com Sema3A, as células exibiram uma morfologia mais alongada, com menos ramificações e citoplasma mais condensado, os lamelipódios apresentaram-se menores, e as fibras de estresse presentes no meio do citoplasma (chamadas arcos transversais) destacaram-se mais quando comparadas ao grupo controle (figura 13B).

Figura 12. Citoesqueleto de F-actina em timócitos após tratamento com Sema3A.



(A) Histograma representativo indicando a intensidade média de fluorescência em timócitos totais do grupo controle (curva em preto) e tratado (curva em verde). (B) Quantificação de F-actina em timócitos totais e nas diferentes subpopulações, DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. Barras representam a média \pm SD da intensidade de fluorescência $n=6$ (C) Fotomicrografias de timócitos marcados com faloidina (em verde), mostrando a distribuição cortical de F-actina e que Sema3A mantém esta organização. Núcleos marcados em azul (DAPI). Aumento: 1000x.

Figura 13. Citoesqueleto de F-actina em células estromais sofre influência da Sema3A.



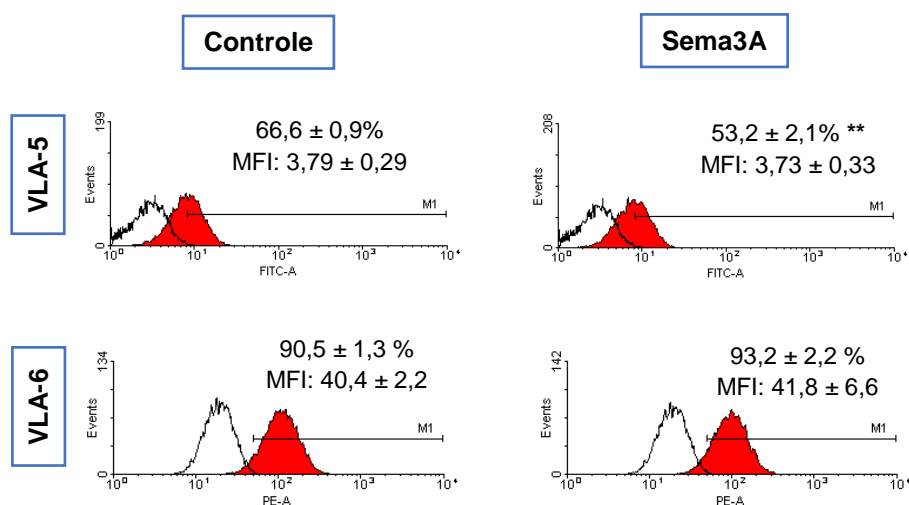
Fotomicrografias representativas dos grupos controle (**A**) e tratado com Sema3A (**B**). Com o uso de faloidina foi possível marcar o citoesqueleto (em verde) e observar as alterações nos lamelipódios (setas amarelas), fibras de estresse (setas vermelhas) e alongamento celular induzidas pelo tratamento de 24 horas com Sema3A. Núcleos são marcados com DAPI (em azul). Aumento: 200x.

Após constatar que a Sema3A mantém inalteradas a organização e a quantidade de F-actina em timócitos e reorganiza o citoesqueleto das células estromais tímicas, seguidamente foram explorados outros parâmetros celulares diretamente relacionados ao citoesqueleto: os ligantes e receptores da matriz extracelular.

5.4 Sema3A modula ligantes e receptores da matriz extracelular.

Em timócitos foi investigada a expressão das moléculas CD49e (cadeia $\alpha 5$ da integrina VLA-5) e CD49f (cadeia $\alpha 6$ da integrina VLA-6), visto que estas proteínas são os principais receptores para a fibronectina e para a laminina, respectivamente, e estabelecem uma ponte entre o citoesqueleto e a matriz extracelular. Por meio de citometria de fluxo, foram obtidos *dotplots* e *densityplots* para determinação do *gate* específico (figura 4A), a fim de se analisar os timócitos totais e as quatro subpopulações. Foram avaliados o percentual de células positivas para VLA-5 ou VLA-6 e a média da intensidade de fluorescência (MFI), expressa em valores arbitrários. Constatou-se que a Sema3A reduziu a porcentagem de timócitos positivos para VLA-5, sem interferir na intensidade de fluorescência na superfície celular, indicando que um menor número de células expressou VLA-5, sem alterar a quantidade de receptores por célula. Por conseguinte, Sema3A não foi capaz de modular os percentuais de timócitos positivos para VLA-6, além de não interferir na respectiva intensidade de fluorescência (figura 14).

Figura 14. Expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 em timócitos murinos.



Histogramas representativos demonstram o perfil da expressão de integrinas por timócitos totais do grupo controle e após 1 hora de tratamento com Sema3A. Curva em preto vazado corresponde ao isotipo controle e curva em vermelho corresponde à marcação específica. Valores indicam a porcentagem de células positivas e a média da intensidade de fluorescência (MFI) ± desvio padrão. ** $p < 0,01$. $n = 6$ por grupo.

Em relação às subpopulações, timócitos duplo-negativos exibiram um aumento no percentual de células que expressam VLA-5 quando tratados com Sema3A e comparado ao grupo controle. Entretanto, um menor percentual de timócitos duplo-positivos expressaram a integrina VLA-5 na presença de Sema3A. Não foi observado diferença no percentual de células que expressam VLA-5 em timócitos simples-positivos $CD4^+$ e $CD8^+$. Em contrapartida, a Sema3A não foi capaz de alterar o percentual de células que expressam VLA-6 nas subpopulações de timócitos (tabela 2). A intensidade de fluorescência das integrinas VLA-5 e VLA-6 não apresentaram variação nas diferentes subpopulações quando comparados os grupos controle e tratado com Sema3A. A expressão de CD49d, outro receptor à fibronectina, também não foi alterada na presença da Sema3A quando comparada ao grupo controle (dados não-mostrados).

Tabela 2. Expressão (%) das integrinas pelas subpopulações de timócitos murinos.

Subpopulações	VLA-5 (%)		VLA-6 (%)	
	Controle	Sema3A	Controle	Sema3A
DN	61,5 ± 1,3	67,1 ± 1,2 *	82,1 ± 1,4	87,9 ± 5,0
DP	71,4 ± 0,8	55,2 ± 2,2 ***	91,1 ± 1,7	95,1 ± 1,9
CD4-SP	72,7 ± 3,5	77,5 ± 4,1	86,1 ± 1,0	92,8 ± 3,2
CD8-SP	72,3 ± 2,3	73,3 ± 5,4	58,4 ± 5,2	65,2 ± 11,8

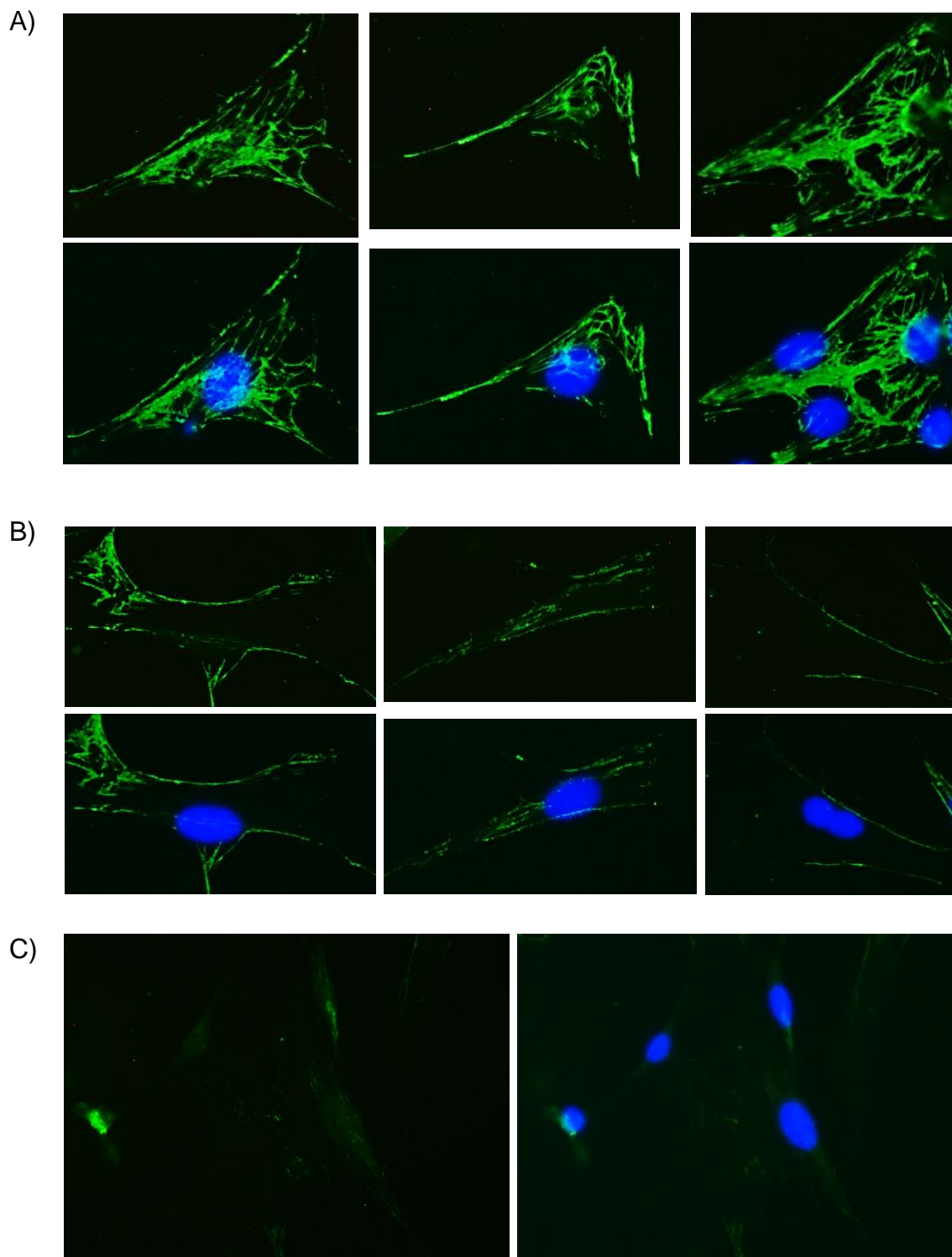
Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão. n=6. * p<0,05, ***p<0,001.

Fonte: autor

As células estromais foram analisadas quanto à produção das moléculas fibronectina e laminina. Em virtude da heterogeneidade celular, inicialmente foram observados diferentes padrões na produção de FN. O mais frequente foi a produção das fibras de FN na forma de uma trama ou rede, com várias orientações (figura 15A). Também, as fibras de FN encontravam-se apenas no contorno celular (figura 15B). Ainda, algumas células produziram muito pouca ou nenhuma FN (figura 15C). Por último, foi verificado que a Sema3A alterou a orientação das fibras de FN, de um padrão intricado em rede para feixes paralelos ao longo do eixo celular (figura 16A). Todavia, a quantidade de FN permaneceu a mesma nos grupos controle e tratado (figura 16B).

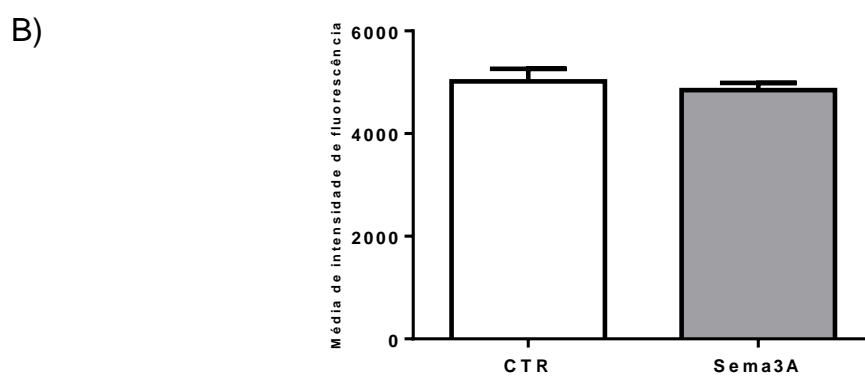
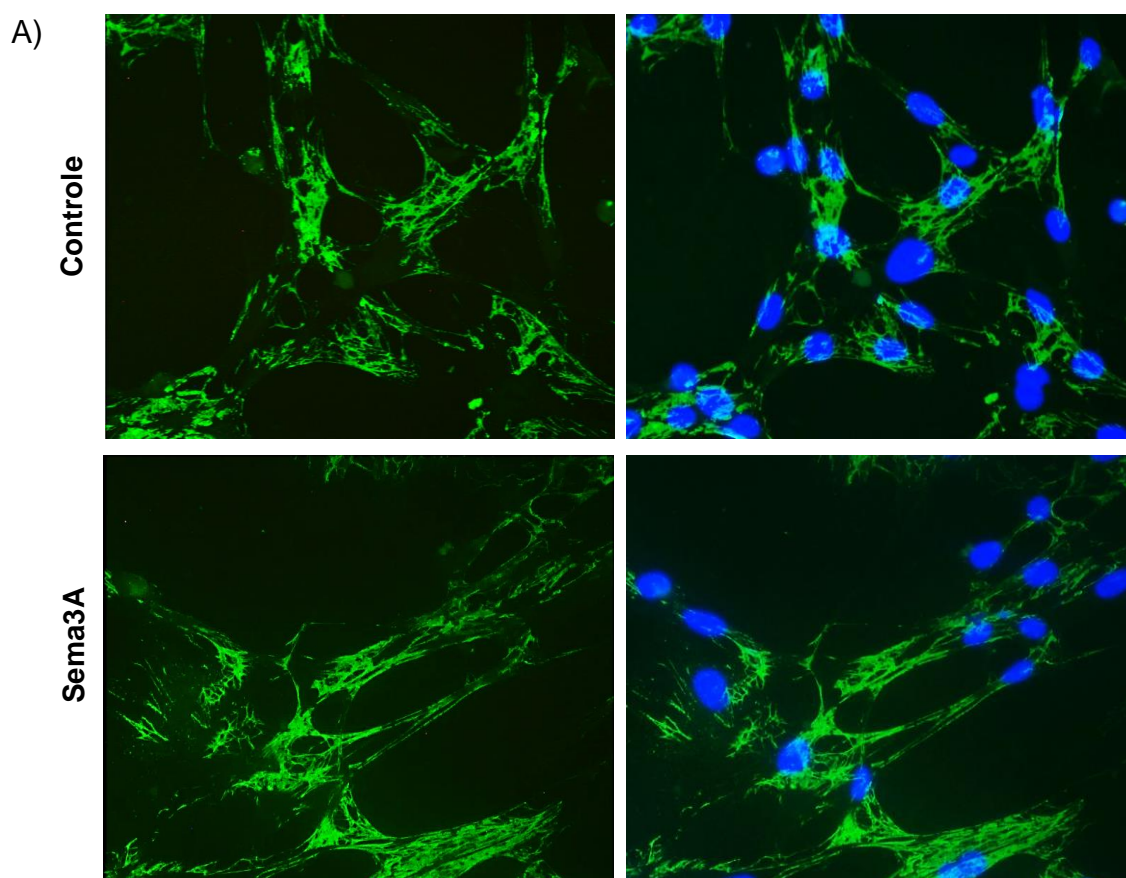
Em relação à laminina, percebeu-se que sua produção foi homogênea pelas células do estroma e foi constatado pela análise qualitativa um aumento na produção de laminina quando as células foram tratadas com a Sema3A conforme mostrado na figura 17A. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento estimulou de forma significativa a produção de laminina quando comparado ao grupo controle (figura 17B).

Figura 15. Heterogeneidade na produção de fibronectina pelas células estromais tímicas.



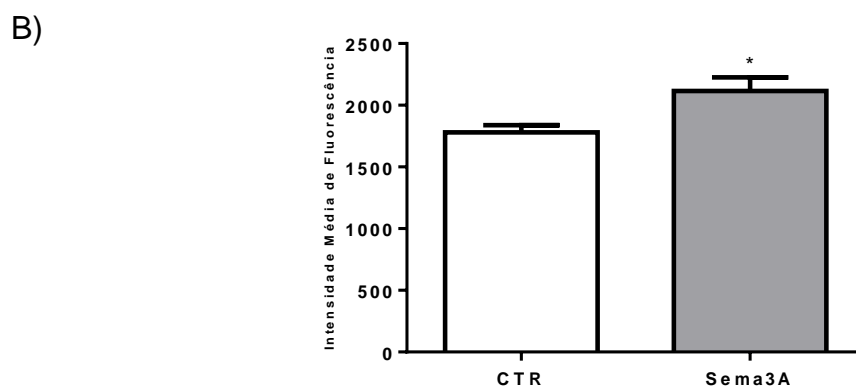
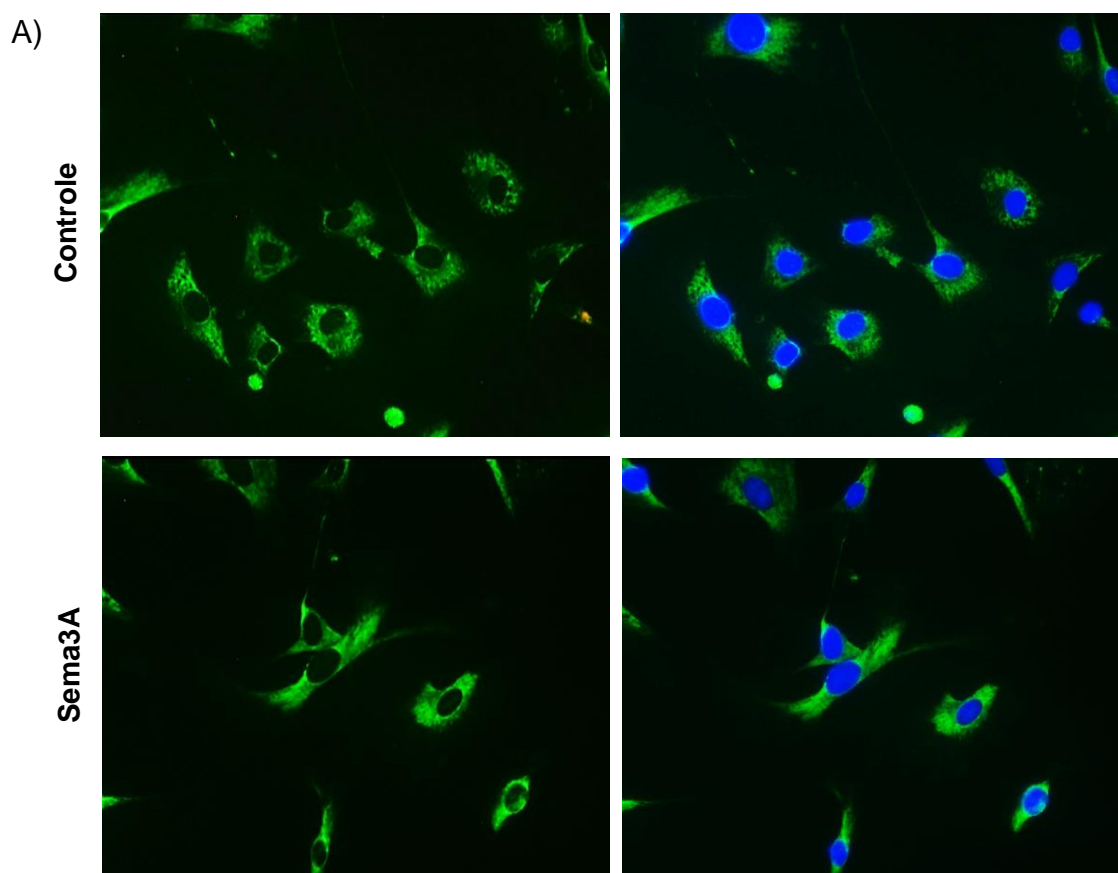
Fotomicrografias representativas das diferentes morfologias celulares e também distintos padrões na produção de FN pelas células estromais tímicas. Em (A), observa-se uma produção proeminente de FN na forma de uma intrincada rede de fibras. Em (B), observa-se uma deposição nos limites periféricos das células, contornando-as. E em (C), as células expressaram muito pouca ou nenhuma FN. Núcleos foram marcados com DAPI (em azul). Aumento: 400 e 600x.

Figura 16. Sema3A modifica a orientação das fibras de fibronectina sem alterar a quantidade produzida pelas células estromais.



Em (A), fotomicrografias mostram que as células controle exibem as fibras de FN em várias orientações, enquanto que nas células tratadas, as fibras se depositaram de maneira paralela ao longo do eixo celular. Núcleos foram marcados com DAPI (em azul). Aumento: 200x. (B) Quantificação em pixels por área (μm^2) da intensidade de fluorescência. Barras representam a média \pm desvio padrão da intensidade de fluorescência a partir de 12 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo.

Figura 17. Sema3A aumenta a produção de laminina pelas células estromais tímicas.



(A) Fotomicrografias mostram a produção de laminina por imunofluorescência. (B) Quantificação em pixels por área (μm^2) da intensidade de fluorescência. Barras representam a média \pm desvio padrão da intensidade de fluorescência a partir de 12 fotomicrografias tiradas aleatoriamente por grupo. Nas fotomicrografias, em verde está marcada a LM e em azul, o núcleo. Aumento: 200x. * $p < 0,05$.

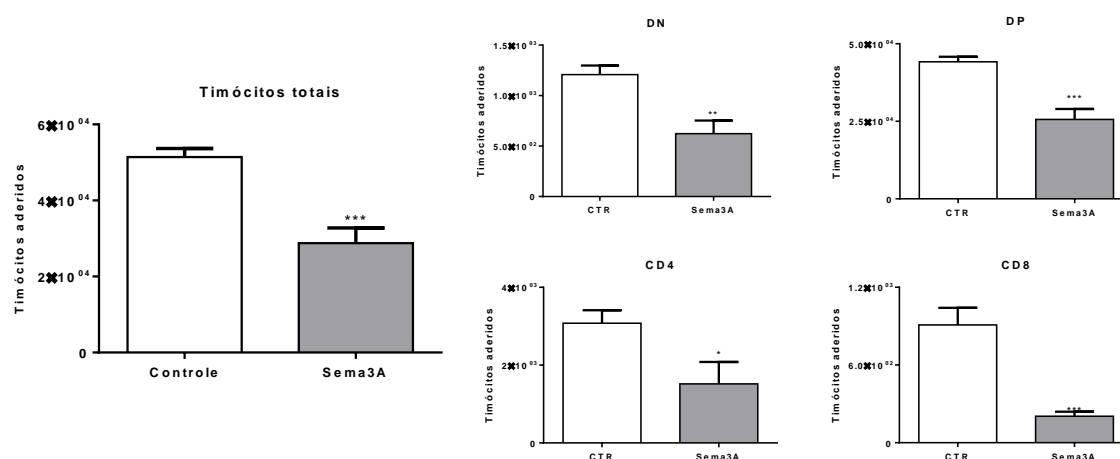
Sabendo-se da importância do citoesqueleto e da matriz extracelular nos eventos de adesão celular e da necessidade dos timócitos interagirem com as

células estromais tímicas, o próximo grupo de experimentos visou esclarecer a participação da Sema3A nos eventos de adesão timócitos:células estromais.

5.5 Ação antagonista da Sema3A sobre adesão de timócitos às células estromais tímicas.

Timócitos pré-tratados com Sema3A foram adicionados sobre uma monocamada de células estromais por uma hora. Os timócitos aderentes foram contados e marcados para o fenótipo CD4/CD8. Como resultado, a Sema3A reduziu em 45% a quantidade de timócitos totais aderidos ao estroma. Esse efeito também foi observado nas diferentes subpopulações de timócitos e mostrou-se mais evidente nas subpopulações de timócitos duplo-positivo e simples-positivo CD8⁺ (figura 18).

Figura 18. Sema3A reduz adesão de timócitos pré-tratados às células estromais.

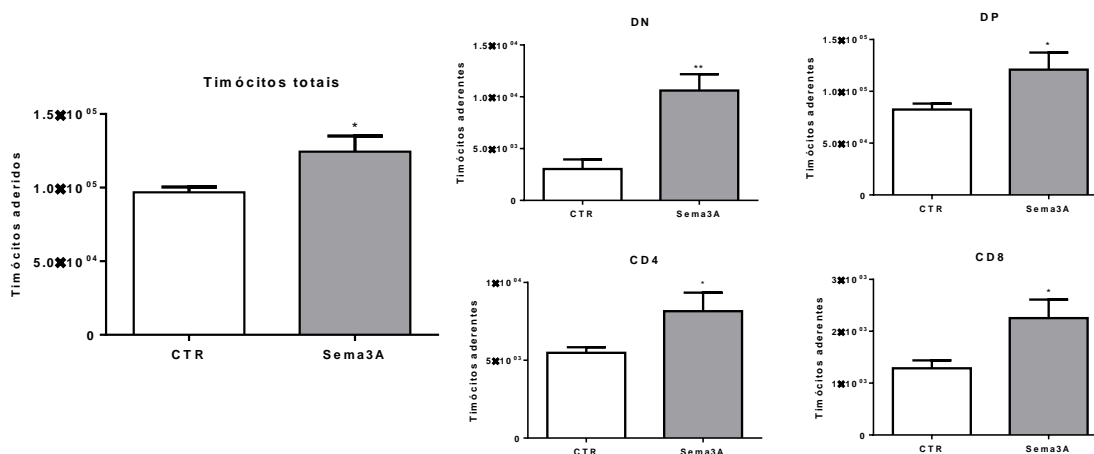


Timócitos foram pré-tratados e submetidos à adesão às células estromais por uma hora e então quantificados. Sema3A reduziu significativamente o número de células aderentes. O mesmo efeito foi observado nas subpopulações de timócitos. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. Barras representam a média \pm SD. n=6, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Em experimentos seguintes, as células estromais foram pré-tratadas com Sema3A para avaliar o efeito sobre estas células no processo de adesão com os timócitos. Após uma hora de adesão, os timócitos aderentes foram contados, e constatou-se que a Sema3A estimulou de forma significativa um aumento de

28% no número de timócitos totais aderidos ao estroma. Esse resultado foi igualmente observado nas diferentes subpopulações de timócitos (figura 19).

Figura 19. Sema3A estimula adesão de timócitos às células estromais pré-tratadas.

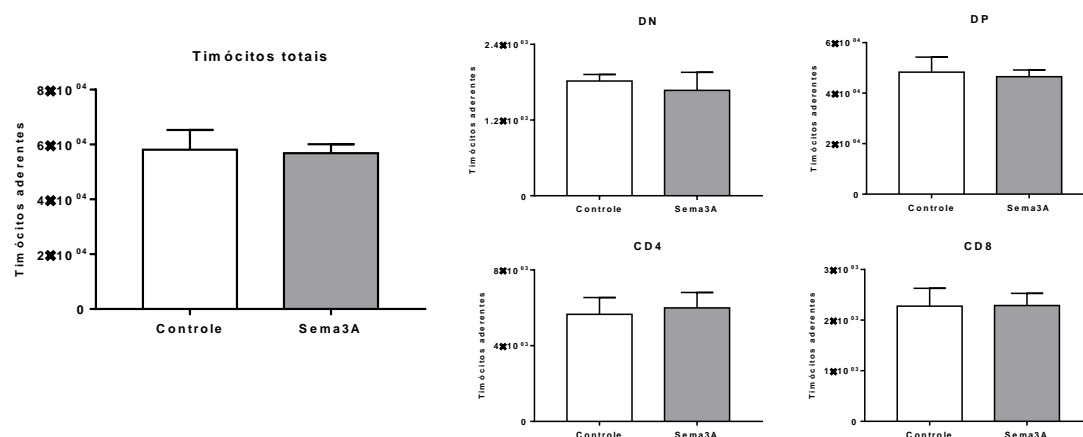


Células estromais foram pré-tratadas com Sema3A e os timócitos foram submetidos à adesão por uma hora. Os timócitos aderentes foram recolhidos, contados e marcados para citometria. Sema3A aumentou significativamente o número de timócitos totais aderentes. O mesmo efeito foi observado em suas subpopulações. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. Barras representam a média \pm SD. n=6, * p<0,05; ** p<0,01.

Em seguida, o ensaio de adesão foi realizado, pré-tratando os timócitos e as células estromais separadamente, com o objetivo de avaliar o efeito conjunto da Sema3A sobre estas células no processo de adesão. Foi verificado que o número de timócitos totais aderidos às células estromais não foi alterado pelo tratamento com Sema3A quando comparado ao grupo controle, assim como não alterou o número de células nas diferentes subpopulações de timócitos (figura 20).

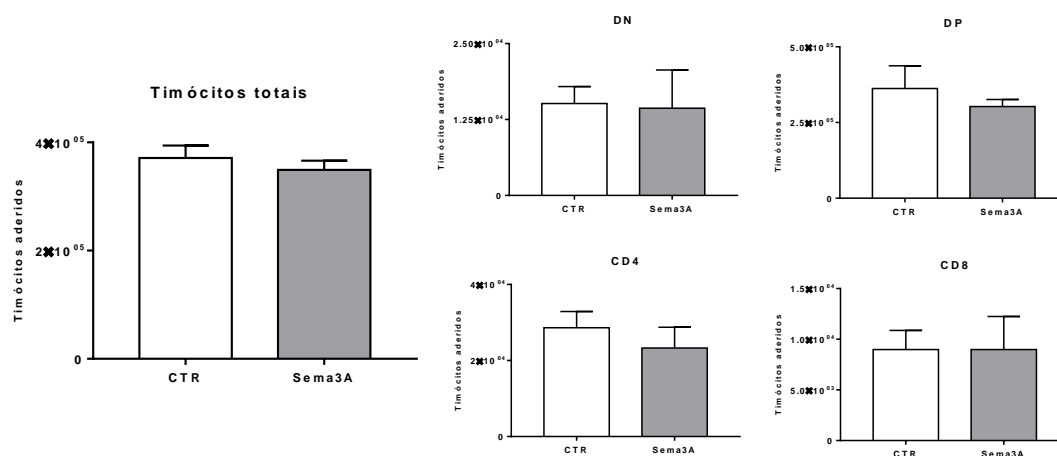
Por fim, a adesão celular foi avaliada quando os timócitos e células estromais tímicas foram tratados com Sema3A durante o ensaio de adesão (1 hora). Após a contagem dos timócitos aderidos, percebeu-se que não houve diferença significativa no número total de timócitos, como também, nenhuma alteração foi observada nas quatro subpopulações de timócitos entre o grupo controle e o grupo tratado (figura 21).

Figura 20. Adesão de timócitos às células estromais após o tratamento com Sema3A.



As células estromais e os timócitos foram pré-tratados com Sema3A e a adesão foi desenvolvida por uma hora. Timócitos aderentes foram recolhidos, contados e marcados para citometria. Não houve diferença estatística nos números obtidos. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. Barras representam a média ± SD. n=6.

Figura 21. Adesão de timócitos às células estromais tímicas na presença de Sema3A.



Timócitos e células estromais foram submetidos ao ensaio de adesão na presença de Sema3A. Timócitos aderentes foram recolhidos, contados e marcados para citometria. Não houve diferença estatística nos números obtidos. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. Barras representam a média ± SD. n=3.

Após avaliado o efeito exercido pela Sema3A no processo de adesão e constatado que a modulação foi dependente do tipo celular exposto ao tratamento, o último grupo de experimentos realizados foi a migração de timócitos frente às células estromais, em modelo de *transwell*.

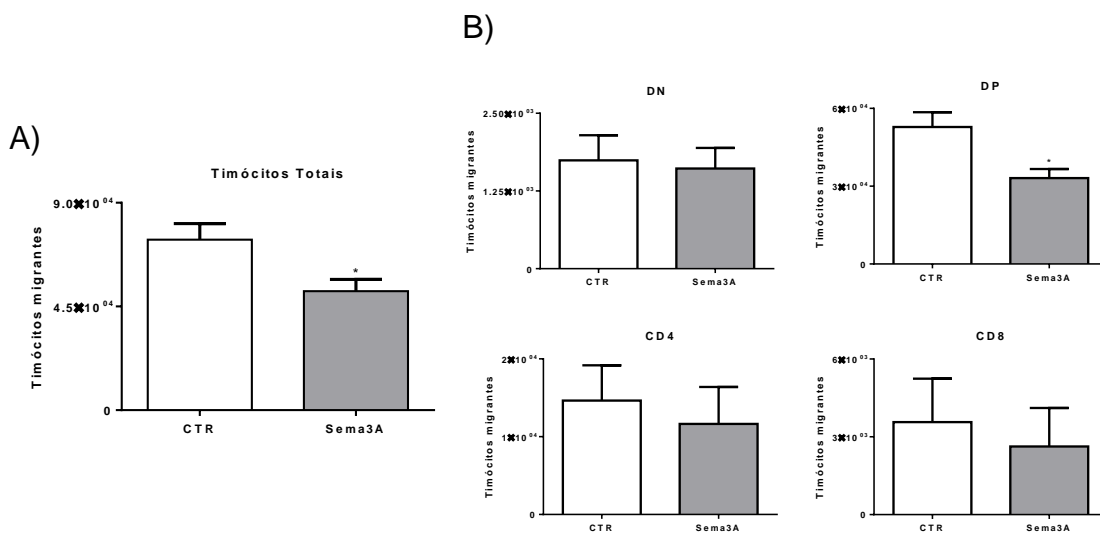
5.6 Influência da Sema3A sobre a migração de timócitos frente as células estromais tímicas.

Considerando a importância da migração de timócitos para a função tímica, bem como a carência de estudos sobre o efeito da Sema3A neste processo, decidiu-se avaliar o papel da Sema3A sobre os timócitos e/ou células estromais no processo migratório. Para tal, as células estromais foram plaqueadas 24 horas antes da inserção dos timócitos em *transwells* nos poços, e não foi realizada troca do meio de cultura, objetivando ter um meio condicionado (enriquecido com fatores solúveis produzidos e secretados pelas células estromais), na câmara inferior do *transwell*.

No primeiro e no segundo esquemas de tratamento (quando os timócitos foram pré-tratados e quando as células estromais foram pré-tratadas, respectivamente), a Sema3A não alterou o número de timócitos totais migrantes quando comparado ao grupo controle, assim como não alterou o número de células migrantes nas diferentes subpopulações de timócitos (dados não-mostrados).

Entretanto, a Sema3A, quando adicionada juntamente com os timócitos durante o processo migratório, foi capaz de diminuir o número de timócitos totais migrantes quando comparado ao grupo controle (figura 22A). Ao analisarmos, por citometria de fluxo, o fenótipo CD4/CD8 das células migrantes, foi constatado que a modulação negativa ocorreu nos timócitos duplo-positivos (figura 22B).

Figura 22. Efeito da Sema3A sobre a migração de timócitos frente às células estromais.



Sema3A foi adicionada na câmara superior do *well* juntamente com os timócitos durante o processo migratório. Em A, é mostrado o número total de timócitos migrantes. Em B, o número absoluto das subpopulações CD4/CD8. DN = timócitos duplo-negativos, DP = timócitos duplo-positivos, CD4 e CD8 = timócitos simples-positivos. As barras representam médias \pm SD. As diferenças estatísticas foram detectadas utilizando o do teste *t*. n=6, * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste estudo evidenciaram que a Sema3A exerce efeitos diferenciados sobre os timócitos e células estromais tímicas, como foi demonstrado pelas alterações morfológicas das células e reorganização do citoesqueleto; modulação da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular; alteração na adesão de timócitos às células estromais e diminuição no número de timócitos migrantes.

Inicialmente, foi padronizada a obtenção das células estromais tímicas e seu estabelecimento como cultura primária, tendo em vista a importância destas células na função tímica e a necessidade de aprofundar o conhecimento referente as ações da Sema3A sobre as células estromais. Sabe-se que as células estromais tímicas organizam-se numa rede tridimensional, com vários prolongamentos celulares, conectando-se a outras células e a matriz extracelular. Dessa forma, as células estromais possuem uma natureza frágil e são muito sensíveis quando em cultura. Além disso, estas células são raras no órgão adulto, compreendendo menos de 1% da celularidade total. O emprego de um protocolo com várias etapas de digestão enzimática e homogeneização é necessário para efetivamente se isolar as células estromais com o mínimo de dano celular (SEACH, et al., 2012).

Neste estudo, quando as células estromais foram avaliadas quanto ao seu fenótipo, aproximadamente 67% foram caracterizadas como células epiteliais e 32% como células não-epiteliais, incluindo: macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. No protocolo descrito por Gray e colaboradores (2002) a obtenção de células EpCAM⁺ (células epiteliais) foi entre 45 a 60%, seguido por 0,65% de macrófagos, 16% de fibroblastos e 2,65% de células dendríticas.

O estudo de Seach e colaboradores (2012), que também utilizou a digestão enzimática do timo, mostrou células estromais com maior tamanho que apresentam uma autofluorescência natural, e as células epiteliais corresponderam a 63,2%. Dentre estas, uma melhor caracterização das células epiteliais foi realizada, a partir das citoqueratinas-8 e -5. Os autores verificaram que aproximadamente 50% das TECs foram duplo-positivas para esta marcação, 25% foram positivas apenas para citoqueratina-8 e 15% para citoqueratina-5. Sabe-se que TECs que expressam ambas citoqueratinas estão localizadas na junção córtico-medular do timo ou podem ser precursores

imaturas das TECs localizadas no córtex (ODAKA, et al., 2013). Em nosso trabalho estas moléculas foram usadas para a fenotipagem das TEC, porém não foi realizada a quantificação. Conforme esperado, foram encontradas células positivas para citoqueratina-8 e células positivas para citoqueratina-5, indicando que o estroma tímico utilizado possuía TECs corticais e medulares.

Tendo-se caracterizado as células estromais, seguiu-se a verificação da expressão da neuropilina-1 por estas células. Este receptor é uma glicoproteína transmembrana, que além de se ligar a Sema3A, liga-se a certas isoformas de VEGF e a TGB- β . NP-1 possui importantes funções, em diferentes tipos celulares, exercendo efeitos na imunidade, desenvolvimento cardiovascular, migração celular, angiogênese e patogênese do câncer, sendo expresso por células humanas e murinas (CHAUDHARY, et al., 2014).

No nosso estudo, utilizando-se citometria de fluxo, foi constatado que 79% das células estromais tímicas murinas obtidas por meio de digestão enzimática são positivas para NP-1. E quando consideradas somente as TECs, 90% destas células foram positivas para NP-1. Este dado corrobora com o estudo de Lepelletier e colaboradores (2007) que mostrou em timo humano a expressão *in situ* de NP-1 na região cortical e medular do lóbulo tímico, e por citometria de fluxo em células epiteliais derivadas de células *nurse*, bem como em linhagens de TEC humana fetal e pós-natal.

Com relação aos timócitos, a expressão de NP-1 é baixa em células humanas (em torno de 5% em timócitos totais). Entretanto, essa expressão é aumentada quando os timócitos são estimulados com IL-7 ou com anti-TCR. Ainda, o contato célula-célula (TEC-timócito) também aumenta os níveis de NP-1 (LEPELLETIER, et al., 2007). Os timócitos murinos apresentam alta expressão deste receptor (88% em camundongos adultos jovens), principalmente nas subpopulações DP e CD8⁺ (MENDES-DA-CRUZ, et al., 2009). Ainda, NP-1 é um marcador de superfície de células Tregs (GAO, et al., 2016).

O efeito da Sema3A sobre a morfologia celular foi avaliado em timócitos utilizando microscopia eletrônica de varredura e observou-se células esféricas, com ondulações em sua membrana, podendo ou não apresentar filopódios. Nossos resultados corroboram com Cavallotti e colaboradores (2008) que também utilizando microscopia eletrônica de varredura, avaliaram o timo de adultos jovens (18 a 22 anos) e de idosos (65 a 70 anos) a partir de biópsia

tímica. Os timócitos foram descritos como células esferoides de pequeno diâmetro, apresentando alguns microvilos em sua superfície celular. O estudo de Lins e colaboradores (2018) observou ondulações na membrana e a formação de filopódios em timócitos após 30 minutos de tratamento com Sema3A.

O tratamento com Sema3A em timócitos promoveu o aumento do número de filopódios nestas células. Comparando os timócitos entre os grupos, a média de filopódios por célula aumentou 2,3 vezes quando os timócitos foram tratados com Sema3A. Filopódios são finas protrusões de membrana, ricas em actina e altamente dinâmicas que se estendem a partir da superfície celular (JACQUEMET, et al., 2015). Diversos tipos celulares apresentam filopódios, como os fibroblastos em migração, neurônios em desenvolvimento e macrófagos durante a fagocitose (MATILLA & LAPPALAINEN, 2008). Bhattarakosol & Donchai (2015) demonstraram que linfócitos ativados exibem a formação de filopódios e alteração da forma celular, além do rearranjo do citoesqueleto entre 15 a 30 minutos após o estímulo.

Os filopódios são importantes para diversos processos celulares: adesão e migração, estabilização da célula em seu microambiente, percepção do meio e a formação de contatos célula-célula (ARJONEN, et al., 2011). Ao descrevermos que a Sema3A induz a formação de filopódios em timócitos, sugere-se que ela contribui para os processos celulares supracitados, revelando a importância fisiológica desta proteína no microambiente tímico, principalmente para os timócitos. Segundo nossos dados (LINS, et al., 2018), o surgimento de filopódios em timócitos após o tratamento com Sema3A revela que os mecanismos moleculares pelos quais Sema3A media seus efeitos funcionais nas células são diversos e ainda não completamente entendidos.

Fan e colaboradores (1993) observaram que a Sema3A causa um transiente aumento no comprimento de filopódios em neurônios que desaparece após 30 minutos. Em contraste, McConnell e colaboradores (2016) descreveram que Sema3A diminui a área do lamelipódio e induz o desaparecimento dos filopódios em neurônios. Estes dados controversos mostram que os mecanismos moleculares pelos quais as semaforinas mediam seus efeitos são diversos e ainda não totalmente compreendidos. Estudos futuros para investigar os receptores e co-receptores ativados, bem como as vias de sinalização intracelular, serão necessários para elucidar melhor estes fenômenos.

Aspectos morfológicos das células estromais também foram avaliados. Devido aos diferentes tipos celulares presentes na cultura (células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas e outros), a heterogeneidade celular é bastante evidente. Assim, descrever as alterações que a Sema3A provoca na morfologia do estroma tímico é um objetivo complexo. Contudo, em termos gerais, foi observado que as células tratadas exibiram prolongamentos citoplasmáticos mais evidentes que irradiam a partir do centro celular.

Conforme dados da literatura, Sema3A é capaz de alterar a morfologia de diferentes células, por exemplo: podócitos *in vitro*, que exibem uma menor área celular e polarização (AGGARWAL, et al., 2015); neurônios que retraem seus axônios (BROWN, et al., 2009); células dendríticas que diminuem sua frente de migração (TAKAMATSU, et al., 2010), entre outras células, também responsivas à Sema3A, como endoteliais e cancerosas. Assim, nossos resultados somam-se aos dados já existentes na literatura, estendendo as ações da Sema3A também sobre a morfologia das células do estroma tímico.

Mudanças gerais na morfologia celular (como emissão de projeções da membrana e espraiamento celular) são causadas pela reorganização dos componentes do citoesqueleto, principalmente os microfilamentos de F-actina (DRÁBER & DRÁBER, 2015). E após observar que a morfologia dos timócitos foi alterada pela Sema3A, nós verificamos o citoesqueleto de F-actina nestas células. Entretanto, não houve alteração na quantidade nem na organização destes filamentos no citoplasma dos timócitos quando tratados com Sema3A.

Sema3A é expressa por células T ativadas e está envolvida com a reorganização de F-actina nestas células. O uso de bloqueadores anti-Sema3A impede a reorganização e polarização de F-actina, bem como do TCR, em células T durante a sinapse imunológica com células dendríticas (LEPELLETIER, et al., 2006). Semelhantemente, Sema3A inibe a proliferação de células T através da inibição da reorganização do citoesqueleto e regulação negativa da via MAPK (CATALANO, et al., 2006).

Estudo recente do nosso grupo (LINS, et al., 2018) mostrou que, apesar de não alterar a quantidade total, há um rearranjo na camada cortical de F-actina em timócitos tratados por 30 minutos com Sema3A, sendo possível a observação de *clusters* próximos à membrana celular. Os autores discutem que este fenômeno está relacionado à emissão de filopódios pelos timócitos. Também foi

descrita a redução da atividade de ROCK2 (via intracelular Rho/ROCK) que atua na contratilidade cortical do citoesqueleto. Assim, podemos sugerir que a Sema3A atua em tempos mais precoces sobre a organização F-actina em timócitos. Além de atuar na organização do citoesqueleto, ROCK2 está envolvido nos processos de adesão celular, motilidade e remodelamento da matriz extracelular. Por sua vez, transcritos de ROCK1 já foram descritos no timo (HARTMANN, et al., 2015; JULIAN & OLSON, 2014).

O citoesqueleto das células estromais, por sua vez, foi modulado pelo tratamento com Sema3A, que desorganizou as fibras de estresse ventrais e dorsais nas células tratadas. Este resultado está de acordo com a literatura, segundo descrito por Hou e colaboradores (2015), no qual células endoteliais não-tratadas exibem fibras de estresse mais evidentes no citoplasma, enquanto que a Sema3A causa o desarranjo de F-actina através da regulação negativa de Mical2, uma proteína moduladora do citoesqueleto.

Semelhantemente, a aplicação de Sema3A sobre neurônios de embriões murinos produz uma prolongada fase de colapso celular seguida por uma retração dos seus prolongamentos, gerando uma protuberância central no corpo do neurônio. Essas alterações são decorrentes da despolimerização de actina nas porções terminais da célula, e sua redistribuição para a região central. Também foi constatado que o tratamento reduz os níveis de Arp2/3, que é uma proteína reguladora de actina. Logo, Sema3A atua não apenas na organização da actina, mas também nas proteínas acessórias do citoesqueleto (BROWN & BRIDGMAN, 2009).

As semaforinas são conhecidas por terem efeitos desestabilizantes sobre a F-actina tais como: a perda (despolimerização) de F-actina, a diminuição da capacidade de polimerizar nova F-actina, a redução tanto do número de feixes, quanto da extensão de novos ramos de F-actina (HUNG, et al., 2010). Em relação aos microtúbulos, há menos relatos sobre os efeitos da Sema3A, no entanto, sabe-se que ela é capaz de diminuir a dinâmica destas proteínas na região central do citoplasma, culminando no colapso celular (DENT, et al., 2004).

Após avaliar o citoesqueleto de F-actina nos timócitos, foi verificada a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na membrana destas células. O citoesqueleto de actina interage com os elementos da matriz extracelular por meio das integrinas, que são receptores transmembrana heterodiméricos,

compostos pelas subunidades α e β . Há cerca de 24 tipos de integrinas nas células de mamíferos, que reconhecem de maneira específica diversos ligantes da matriz extracelular (SUN, et al., 2016).

Neste estudo, Sema3A diminuiu a expressão de VLA-5 em timócitos totais e duplo-positivos, e também aumentou os seus níveis em timócitos duplo-negativos. Em relação ao VLA-6, não houve variação. Lepelletier e colaboradores (2007) constataram que timócitos tratados com Sema3A mantêm inalterados os níveis de expressão das integrinas VLA-3 ao VLA-6, e $\alpha\beta3$. Diante desses dados, é importante destacar que a ativação de integrinas em leucócitos é rápida e reversível (MARGADANT, et al., 2011), e esta ativação pode passar despercebida em experimentos *in vitro*. Além disso, o tempo de tratamento também influi na expressão das integrinas.

Na literatura, os dados da ação da Sema3A sobre integrinas são controversos. Para endossar este tópico, timócitos provenientes de camundongos transgênicos para o GH expressam níveis normais de VLA-6 e são mais aptos a migrar (SMANIOTTO, et al., 2005), enquanto que timócitos derivados de camundongos diabéticos (induzidos por aloxano) apresentam níveis mais baixos de VLA-5 e VLA-6, sem alteração da sua capacidade migratória (NAGIB, et al., 2010). Entretanto, timócitos provenientes de camundongos diabéticos não-obesos (NOD) expressam níveis mais baixos de VLA-5 (migrando menos frente à FN) e níveis mais altos de VLA-6 (aumentando a migração frente à LM) (MENDES-DA-CRUZ, et al., 2008). Então, infere-se que essas alterações na expressão das integrinas, *per si*, nem sempre impactam a funcionalidade celular (na migração).

A produção das glicoproteínas de matriz extracelular fibronectina (ligante do VLA-5) e laminina (ligante do VLA-6) pelas células estromais tímicas frente ao tratamento com Sema3A foi avaliada neste estudo. Percebeu-se que a produção de fibronectina foi bastante heterogênea, o que reflete a ocorrência dos diversos tipos celulares no estroma. Os dados aqui apresentados demonstraram que a Sema3A reorientou as fibras de FN, que se dispuseram em feixes paralelos sobre as células estromais.

A molécula de FN é secretada na forma de dímeros solúveis, que se ligam ao VLA-5. Esta integrina promove a fibrilogênese de FN, a partir da extensão dos seus dímeros. Além disso, o VLA-5 faz a ponte entre a FN e o citoesqueleto de

actina, que é crucial para a montagem dessa rede fibrilar de FN, de modo que tratamentos que aumentem a contratilidade do citoesqueleto estimulam a montagem dessa matriz (MAO & SCHWARZBAUER, 2005). Nossa hipótese é que as alterações observadas na matriz de FN são um efeito indireto da Sema3A, da seguinte maneira: inicialmente, a sinalização intracelular proveniente da ligação da Sema3A ao seu receptor promove a reorganização da F-actina alterando assim as fibras de estresse no citoplasma da célula estromal, que por sua vez, reposiciona as integrinas $\alpha 5\beta 1$ na membrana celular, culminando na reorientação das fibras extracelulares de FN.

No que concerne à glicoproteína LM, o tratamento com Sema3A foi capaz de aumentar sua produção. Lins e colaboradores (2016) discutiram que as células do microambiente tímico são capazes de produzir esta glicoproteína, que está criticamente envolvida na diferenciação das células T, estabelecendo pontes moleculares entre os tímócitos e as células estromais. A expressão de LM no timo está sob regulação hormonal, como por exemplo o GH, que aumenta a deposição de LM em TECs *in vitro*; ou a triiodotironina (T3) que intensifica a expressão intratímica de LM. De igual forma, camundongos que receberam glicocorticoides (GCs) intra-peritoneal exibiram maior quantidade de LM nos lóbulos tímicos. Interessantemente, algumas situações patológicas também exacerbam a distribuição e densidade de LM no timo, como diabetes tipo 1, e infecções por *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium berguei* (SAVINO, et al., 2015).

Nossos resultados descritos aqui incrementam a literatura acerca da LM no timo, elencando a Sema3A como moduladora positiva da sua produção em células estromais tímicas murinas. Somado a este fato, Sema3A e seu receptor estão relacionados ao controle da adesão celular, migração e sobrevivência, induzidos por moléculas de matriz extracelular e quimiocinas diversas, em vários tipos celulares como células endoteliais e neoplásicas (MENDES-DA-CRUZ, et al., 2012a).

A análise utilizando o ensaio de adesão nos permitiu verificar que nos tímócitos tratados com Sema3A, houve uma redução de 45% no número de células aderidas ao estroma. Lepelletier e colaboradores (2007) observaram efeito similar em tímócitos humanos tratados com diferentes concentrações de Sema3A (5-50 ng/mL) e houve uma inibição de 50% na adesão sobre monoculturas de TEC (linhagem celular), de maneira dose-dependente.

Também foi relatado que a Sema3A inibe principalmente os timócitos NP-1⁺, resultando num aumento das células que não aderiram às TEC.

Moléculas que promovam a de-adesão dos timócitos às células do microambiente tímico são interessantes sob o ponto de vista migratório, visto que uma das etapas da migração é o término da adesão. Outras moléculas que atuam neste mesmo sentido são: a galectina-3, uma lectina produzida pelas células estromais tímicas, que se acumula na membrana destas células ou está associada com a MEC tímica (VILLA-VERDE, et al., 2002) e a Sema3E, outro membro solúvel da classe 3 das Semas, que atua na seleção intratímica e tráfego migratório (UEDA, et al., 2016).

Nós levantamos a hipótese que a Sema3A diminui a adesão dos timócitos ao estroma considerando os resultados anteriormente obtidos neste estudo, tais como as alterações morfológicas e principalmente pela redução nos níveis de expressão da integrina VLA-5. Ainda, apesar de não termos percebido mudanças na organização do citoesqueleto de F-actina, ele também deve contribuir com essa redução na adesão celular. Em estudo anterior (LINS, et al., 2018), foi demonstrado que os timócitos tratados com Sema3A aderiram menos ao substrato e apresentaram uma maior rigidez celular, o que pode estar envolvido nessa diminuição da capacidade adesiva.

No ensaio de adesão em que as células estromais foram pré-tratadas com Sema3A, houve um aumento de 28% na quantidade de timócitos aderidos. Sabe-se que a adesão de timócitos a TECs pode ser aumentada pelo tratamento com os hormônios T3 (DORSHKIND & HORSEMAN, 2000), prolactina (SAVINO, 2017), GH e IGF-1 (SAVINO, et al., 2003). Além disso, anticorpos anti-GH, anti-IGF-1, bem como anticorpos anti-matriz (anti-FN, anti-LM, anti-VLA5 e anti-VLA6) são capazes de diminuir a capacidade adesiva dos timócitos (SAVINO et al., 2000), revelando que as interações dependentes da matriz são fundamentais no microambiente tímico.

Como mencionado anteriormente, Sema3A foi capaz de reorientar as fibras de FN em células estromais. Os estudos de auto-associação dos dímeros de FN indicaram que a conformação desta molécula no meio extracelular é um importante determinante das propriedades adesivas das fibras de FN (ZOLLINGER & SMITH, 2017). Assim sendo, o novo posicionamento das fibras de FN em feixes paralelos após o tratamento com Sema3A pode expor novos

sítios de ligação desta matriz aos receptores presentes nos timócitos, ou a apresentação de fatores solúveis (como quimiocinas), previamente depositados nessa matriz, que os façam permanecer mais aderidos ao estroma.

Esta ação antagônica da Sema3A sobre a adesão heterocelular dos timócitos às células estromais tímicas é um tópico aberto a discussões posteriores e bem sugestivo acerca da complexa fisiologia tímica: uma mesma molécula com efeito dual, que promove/inibe a adesão a depender da célula-alvo. Mais interessante ainda foi constatar que este efeito na adesão foi anulado quando os timócitos e as células estromais foram pré-tratados com Sema3A. Podemos sugerir que a diminuição do VLA-5 na superfície dos timócitos seja compensada pela reorganização da FN, ou mesmo aumento da LM pelas células estromais, por isso não houve diferença na adesão entre os grupos controle e tratado. Além disso, a aplicação da Sema3A durante a adesão não mostrou impacto sobre o número de timócitos aderidos ao estroma. Acreditamos que o curto período de tempo em que a Sema3A foi aplicada pode explicar este resultado.

Mendes-da-Cruz e colaboradores (2012b) resumizam em sua revisão que a migração de timócitos é resultado de uma complexa rede de interações moleculares, que geram não apenas a atração celular (aumentando o número de células migrantes), mas também promovem a repulsão de progenitores de células T. Esta migração foi descrita, há vários anos, como um sistema multivetorial, derivado de um balanço de interações simultâneas, promovendo uma maior ou menor força de migração intratímica (SAVINO, 2010).

O atual conhecimento sobre migração celular é proveniente de estudos em 2D, que demonstram células migrando sobre um substrato plano. Com estes modelos, foi possível estudar o papel das adesões focais e do citoesqueleto. No entanto, estudos em 3D possibilitaram o entendimento de novos mecanismos regulatórios da migração. Por exemplo, a migração através de membranas porosas mostrou que nas células, a membrana, o citoplasma e as organelas são facilmente ajustáveis para facilitar o movimento celular. A associação com moléculas de matriz e fatores solúveis secretados por outras células também atuam nesse processo (CALERO-CUENCA, et al., 2018).

As células estromais tímicas, de maneira constitutiva ou induzida por agentes estimulantes, produzem diversas citocinas, quimiocinas, hormônios

tímicos e outros fatores solúveis. Essas substâncias são importantes para a função do órgão, controlando processos celulares, como a migração e a diferenciação dos timócitos. Semelhantemente, os timócitos também secretam citocinas que regulam a produção e modulam as respostas das citocinas intratímicas (YAN, et al., 2017).

Os ensaios de migração em *transwell* são utilizados para analisar a capacidade de células responderem direcionalmente a vários estímulos quimioatraentes, como quimiocinas e fatores de crescimento, além da habilidade a migrar através de uma barreira física (JUSTUS, et al., 2014). Neste trabalho, como estímulo quimioatraente, foi utilizado o meio condicionado após 24 horas de cultura das células estromais. Assim, na câmara inferior, estavam presentes fatores solúveis que modulam a migração dos timócitos, juntamente com os efeitos da Sema3A.

Em nossos resultados, quando os timócitos foram previamente tratados, não foi observado diferença no número de células migrantes. Segundo Lepelletier e colaboradores (2007), timócitos humanos pré-tratados com Sema3A migraram em números semelhantes quando utilizados *transwells* revestidos com BSA. Os resultados obtidos quando as células estromais foram pré-tratadas e a Sema3A permaneceu na câmara inferior do *well* durante a migração demonstraram que não houve diferença no número de células migrantes. Da mesma forma, no estudo realizado por Lepelletier e colaboradores (2007), mostrou que a Sema3A na câmara inferior do *well* não estimulou a migração de timócitos humanos.

Entretanto, foi mostrado em nosso trabalho que a presença da Sema3A na câmara superior do *well* durante a migração de timócitos diminuiu o número de células migrantes e esta diminuição ocorreu frente ao meio condicionado pelas células estromais. Considerando que neste meio há quimiocinas diversas produzidas pelas células estromais, nossos resultados estão comparáveis aos resultados de Garcia e colaboradores (2012), que mostram que Sema3A diminui a migração de timócitos humanos frente à quimiocina CXCL12. No tocante à redução na migração de timócitos DP, Orciari & Catalano (2012) afirmam que esta subpopulação é mais susceptível aos efeitos mediados por Sema3A.

Ainda, Garcia e colaboradores (2012) mostraram que Sema3A regula negativamente a expressão de CXCR4 (receptor da CXCL12) e inibe a

fosforilação das quinases envolvidas nas vias de sinalização, incluindo ERK-2 e ZAP-70. Sema3A também reduz a migração de timócitos frente a moléculas de matriz, como FN e LM, de maneira dose dependente. Assim sendo, a Sema3A é capaz de modular a migração de timócitos de maneira direta e também indiretamente, interagindo com ligantes e receptores de matriz, e com as quimiocinas e seus receptores.

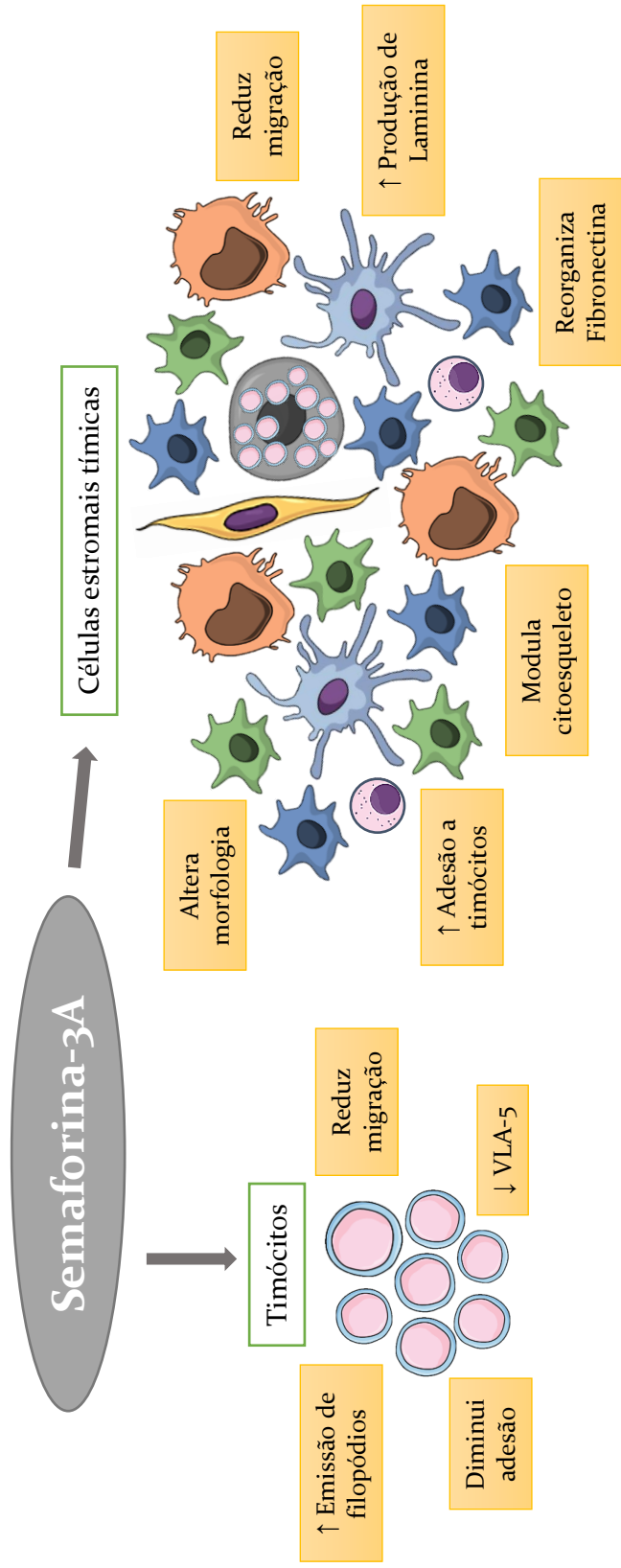
Segundo Moreti e colaboradores (2006), a sinalização intracelular de Sema3A envolve várias moléculas que são recrutadas ou ativadas pelo complexo NP-1/plexina A. Entre elas, citam-se as formas ativas da família das Rho GTPases, como Rac1 e Rnd1, que se ligam diretamente à cauda citoplasmática da plexina A1, mediando o remodelamento do citoesqueleto induzido por Sema3A. O recrutamento de Rnd1 também regula negativamente R-Ras, que por sua vez, suprime a ativação de integrinas. Além disso, há outros *links* entre a porção intracelular da plexina A e a dinâmica dos microtúbulos. Dessa forma, nós hipotetizamos que a diminuição da migração dos timócitos seja principalmente devida a alterações no citoesqueleto, em conjunto com a redução nos níveis da integrina VLA-5.

Em suma, nosso trabalho descreveu efeitos da Sema3A sobre timócitos e células estromais tímicas, conforme mostrado na figura 23. Juntamente com os estudos citados nesta discussão, contribuímos para um melhor entendimento da participação da Sema3A na fisiologia tímica. No entanto, os mecanismos moleculares que governam este órgão são um desafio para a imunologia. A influência do par: Sema3A/NP-1 está longe de ser completamente desvendada, sendo necessárias investigações posteriores mais aprofundadas.

O uso de camundongos geneticamente modificados, nocautes condicionais para genes da Sema3A e NP-1, representam ferramentas fundamentais nesta pesquisa. Para aprofundar o entendimento da contribuição relativa de cada molécula no processo da migração/diferenciação dos timócitos, deve-se ainda discutir a expressão e o papel das várias semaforinas no timo, e também como elas são reguladas. A quimioatração e a quimiorepulsão exercem uma ação cooperativa durante a migração intratímica e sua desregulação pode predizer alterações fisiológicas neste órgão (como a diminuição do exporte de timócitos maduros ou a saída de timócitos auto-reativos) de importância única para o organismo.

O conjunto de dados aqui apresentados e sumarizado no esquema abaixo (figura 23), aumenta o conhecimento sobre os efeitos da Sema3A nos componentes linfóide e estromal tímico. Este conhecimento servirá de base para um melhor entendimento sobre os aspectos moleculares e celulares que permitem propor e elencar novas terapias imunológicas para o timo, especialmente nos casos patológicos em que sua função esteja prejudicada.

Figura 23. Esquema das ações pleiotrópicas de Sema3A sobre timócitos e células estromais tímicas



Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, o esquema foi elaborado, compondo uma síntese dos principais efeitos observados do tratamento de Sema3A (100 ng/mL) sobre timócitos e células estromais tímicas murinas (Fonte: <https://mindthegraph.com/>).

7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui descritos sustentam a hipótese que a Sema3A exerce efeitos sobre as células estromais tímicas e sobre os timócitos provenientes de camundongos C57BL/6. Em virtude de a Sema3A modular diferentes parâmetros celulares, como morfologia, citoesqueleto, produção de ligantes de matriz extracelular e seus receptores, e os eventos de adesão e migração, pôde-se considerar que a Sema3A possui efeitos pleiotrópicos sobre as células do microambiente tímico.

A produção deste conhecimento revela-se muito importante tendo em vista a função do timo no organismo. Além disso, como este órgão ainda possui aspectos de sua fisiologia que carecem de estudos mais aprofundados, a aplicação deste estudo é de contribuir com a base de informações científicas sobre o funcionamento celular tímico. De maneira particular, os efeitos de Sema3A sobre o timo estão sendo estudados há pouco mais de uma década, sendo necessárias pesquisas mais específicas neste contexto.

REFERÊNCIAS

- Abramson J., Anderson G. Thymic epithelial cells. **Annual Review of Immunology**, 35, 85-118, 2017.
- Aggarwal P.K. et al. Semaphorin3A promotes advanced diabetic nephropathy. **Diabetes**, 64(5), 1743-1759, 2015.
- Aghaallaei N., Bajoghli B. Making thymus visible: Understanding T-cell development from a new perspective. **Frontiers in Immunology**, 9, 375, 2018.
- Alon R., Shulman Z. Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. **Experimental Cell Research**. 317(5), 632-641, 2011.
- Andrews W.D., Barber M., Nemitz M., Memi F., Parnavelas J.G. Semaphorin3A-neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons. **Brain Structure & Function**. 222(5), 2217-2233, 2017.
- Arjonen A., Kaukonen R., Ivaska J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. **Cell Adhesion & Migration**. 5(5), 421-430, 2011.
- Aumailley M. The laminin family. **Cell Adhesion & Migration**. 7(1), 48-55, 2013.
- Azghadi S.M. et al. Mesenchymal stromal cells support the viability and differentiation of thymocytes through direct contact in autologous co-cultures. **Histochemistry and Cell Biology**. 146(2), 153-165, 2016.
- Bertoni A. et al. Integrins in T cell physiology. **International Journal of Molecular Sciences**. 19(2), 485, 2018.
- Bhattarakosol P., Donchai P. One of the mechanisms to increase HSV-1 uptake in HSV-1-infected, activated T lymphocytes is the formation of filopodia. **Intervirology**. 58(4), 209-217, 2015.
- Bonilla F.A, Oettgen H.C. Adaptive immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 125(2), S33-40, 2010.
- Borghetti P. et al. Infection, immunity and the neuroendocrine response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 130(3-4), 141-162, 2009.
- Boudil A. et al. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte β -selection. **Nature Immunology**. 16(4), 397-405, 2015.
- Brodin P., Davis M.M. Human immune system variation. **Nature reviews Immunology**. 17(1), 21-29, 2017.
- Brown J.A., Bridgman P.C. Disruption of the cytoskeleton during Semaphorin 3A induced growth cone collapse correlates with differences in actin

organization and associated binding proteins. **Developmental Neurobiology**. 69(10), 633-646, 2009.

Brown J.A., Wysolmerski R.B., Bridgman P.C. Dorsal root ganglion neurons react to semaphorin 3A application through a biphasic response that requires multiple myosin II isoforms. **Molecular Biology of the Cell**. 20, 1167-1179, 2009.

Calero-Cuenca F.J., Janota C.S., Gomes E.R. Dealing with the nucleus during cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**. 50, 35-41, 2018.

Catalano A. et al. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. **Blood**. 107(8), 3321-3329, 2006.

Cavallotti C. et al. Age-related changes in the human thymus studied with scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**. 71(8), 573-578, 2008.

Cepeda S., Griffith A.V. Thymic stromal cells: Roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. **Experimental Gerontology**. 105, 113-117, 2018.

Chaudhary B. et al. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. 63(2), 81-99, 2014.

Chinn I.K. et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. **Seminars in Immunology**. 24(5), 309-320, 2012.

Choi Y.I. et al. PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla. **Immunity**. 29(6), 888-898, 2008.

Cohen S.G. Jacques Miller on the thymus. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 116(5), 1170-1171, 2005.

Cruvinel, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 50(4), 434-447, 2010.

Csaba G. The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 63(2), 139-158, 2016.

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**. 93(3), 974-990.

Dent E.W. et al. Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. **Journal of Neuroscience**. 24(12), 3002-3012, 2004.

- Dimitrijevic M. et al. End-point effector stress mediators in neuroimmune interactions: their role in immune system homeostasis and autoimmune pathology. **Immunologic Research**. 52(1-2), 64-80, 2012.
- Dooley J., Liston A. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. **European Journal of Immunology**. 42(5), 1073-1079, 2012.
- Dorshkind K., Horseman N.D. The Roles of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I, and Thyroid Hormones in Lymphocyte Development and Function: Insights from Genetic Models of Hormone and Hormone Receptor Deficiency. **Endocrine Reviews**. 21(3), 292-312, 2000.
- Dorshkind K. Genetic Regulation of Thymocyte Progenitor Aging. **Seminars in Immunology**. 2012.
- Dráber P., Dráber P. Membrane-cytoskeleton dynamics in the course of mast cell activation. **Methods in Molecular Biology**. 1220, 219-237, 2015.
- Dupré L., et al. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. **Frontiers in Immunology**. 6, 586, 2015.
- Ellis H. The mysterious thymus gland and its surgery. **Journal of Perioperative Practice**. 28(1-2), 33-34, 2018.
- Fan J. et al. The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. **Journal of Cell Biology**. 121, 867-878, 1993.
- Feinstein J., Ramkhalawon B. Netrins & Semaphorins: Novel regulators of the immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. 1863(12), 3183-3189, 2017.
- Fink P. The biology of recent thymic emigrants. **Annual Review of Immunology**. 31, 31-50, 2013.
- Franchini A., Ottaviani E. Thymus: Conservation in evolution. **General and Comparative Endocrinology**. 246, 46-50, 2017.
- Gao Y.L. et al. Neuropilin-1^{high}CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells exhibit primary negative immunoregulation in sepsis. **Mediators of Inflammation**. 2016, 7132158, 2016.
- Garcia F. et al. Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12. **Journal of Leukocyte Biology**. 91(1), 7-13, 2012.
- García-Ceca, J., et al. Eph/Ephrins-Mediated Thymocyte–Thymic Epithelial Cell Interactions Control Numerous Processes of Thymus Biology. **Frontiers in Immunology**. 6, 333, 2015.

- Geenen V. The appearance of the thymus and the integrated evolution of adaptive immune and neuroendocrine systems. **Acta Clinica Belgica**. 67(3), 209-213, 2012.
- Geenen V. et al. Programming of neuroendocrine self in the thymus and its defect in the development of neuroendocrine autoimmunity. **Frontiers in Neuroscience**. 7, 187, 2013
- Golbert D.C.F. et al. Small interference ITGA6 gene targeting in the human thymic epithelium differentially regulates the expression of immunological synapse-related genes. **Cell Adhesion & Migration**. 12(2), 152-167, 2018.
- Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. **Development (Cambridge, England)**. 138(18), 3865-3878, 2011.
- Gray D.H., Chidgey A.P., Boyd R.L. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**. 260(1-2), 15-28, 2002.
- Guo X. K., et al. The expression of netrin-1 in the thymus and its effects on thymocyte adhesion and migration. **Clinical and Developmental Immunology**. 2013, 462152, 2013.
- Guyden J.C. et al. Thymic nurse cells participate in heterotypic internalization and repertoire selection of immature thymocytes; their removal from the thymus of autoimmune animals may be important to disease etiology. **Current Molecular Medicine**. 15(9), 828-835, 2015.
- Halkias J., et al. Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. **The Journal of Clinical Investigation**. 123(5), 2131-2142, 2013.
- Hamazaki Y., Sekai M., Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells: role in thymic epithelial cell maintenance and thymic involution. **Immunological Reviews**. 271(1), 38-55, 2016.
- Hansenne, I. et al. Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network. **Journal of Neuroimmunology**. 158, 67-75, 2005.
- Hartmann S, Ridley A.J., Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. **Frontiers in Pharmacology**. 6, 276, 2015.
- Hasegawa H., Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. **Frontiers in Immunology**. 9, 350, 2018.
- Hoffmann J., Akira S. Innate Immunity. **Current Opinion in Immunology**. 25(1), 1-3, 2013.

- Holländer G. et al. Cellular and molecular events during early thymus development. **Immunological Reviews**. 209, 28-46, 2006.
- Hou S.T. et al. Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage. **Scientific Reports**. 5, 7890, 2015.
- Hu Z., Lancaster J.N., Ehrlich L.I. The contribution of chemokines and migration to the induction of central tolerance in the thymus. **Frontiers in Immunology**. 6, 398, 2015.
- Hung R-J. et al. Mical links semaphorins to F-actin disassembly. **Nature**. 463(7282), 823-827, 2010.
- Jacquemet G., Hamidi H., Ivaska J. Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. **Current Opinion in Cell Biology**. 36, 23-31, 2015.
- Jain R., Gray D.H. Isolation of thymic epithelial cells and analysis by flow cytometry. **Current Protocols in Immunology**. 107, 3.26, 1-15, 2014.
- Jain R. et al. How do thymic epithelial cells die? **Cell death and Differentiation**. 25(5), 1002-1004, 2018.
- James K.D., Jenkinson W.E., Anderson G. T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? **Journal of Leukocyte Biology**. 27, 2018.
- Julian L., Olson M.F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. **Small GTPases**. 5, e29846, 2014.
- Justus C.R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**. (88), 51046, 2014.
- KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704 p.
- Krueger A. Thymus Colonization: Who, How, How Many? **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 66(2), 81-88, 2018.
- Kruger R.P., Aurandt J., Guan K.L. Semaphorins command cells to move. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 6(10), 789-800, 2005.
- Kumar B.V., Connors T.J., Farber D.L. Human T cell development, localization, and function throughout life. **Immunity**. 48(2), 202-213, 2018.
- Lepelletier Y. et al. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. **European Journal of Immunology**. 36(7), 1782-1793, 2006.
- Lepelletier Y. et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 104(13), 5545-5550, 2007.

Linhares-Lacerda L. et al. RNA interference-mediated knockdown of CD49e ($\alpha 5$ integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. **BMC Genomics**. 11 Suppl 5, S2, 2010.

Lins M.P. et al. Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes in vitro. **Biological Research**. 49(1), 37, 2016.

Lins M.P. et al. Association between biomechanical alterations and migratory ability of semaphorin-3A-treated thymocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1862(4), 816-824, 2018.

Liu M.H. et al. Downregulation of semaphorin-3F is associated with poor prognostic significance in osteosarcoma patients. **American Journal of Cancer Research**. 6(10), 2252-2262, 2016.

Lopes N. et al. Lymphotoxin α fine-tunes T cell clonal deletion by regulating thymic entry of antigen-presenting cells. **Nature Communications**. 9(1), 1262, 2018.

Love P.E., Bhandoola A. Signal integration and cross-talk during thymocyte migration and emigration. **Nature reviews Immunology**. 11(7), 469-477, 2011.

Mao Y., Schwarzbauer J.E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biology**. 24(6), 389-399, 2005.

Margadant C. et al. Mechanisms of integrin activation and trafficking. **Current Opinion in Cell Biology**. 23(5), 607-614, 2011.

Maroder M. et al. The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 917, 741-747, 2000.

Mattila P.K., Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 9(6), 446-454, 2008.

Maurer L.M., Ma W., Mosher D.F. Dynamic structure of plasma fibronectin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. 51(4), 213-227, 2015.

McConnell R.E. et al. A requirement for filopodia extension toward Slit during Robo-mediated axon repulsion. **The Journal of Cell Biology**. 213(2), 261-274, 2016.

Mendes-da-Cruz D.A. et al. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **The Journal of Immunology**. 180(7), 4639-4647, 2008.

Mendes-da-Cruz D.A. et al. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1153, 20-28, 2009.

Mendes-da-Cruz D.A. et al. Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. **The FASEB Journal**. 26(11), 4390-4399, 2012. **(a)**

Mendes-da-Cruz D.A. et al. Semaphorins and neuropilins: new players in the neuroendocrine control of the intrathymic T-cell migration in humans. **Experimental Physiology**. 97(11), 1146-1150, 2012. **(b)**

Mendes-da-Cruz D.A. et al. Semaphorin 3F and neuropilin-2 control the migration of human T-cell precursors. **PLoS One**. 9(7), e103405, 2014.

Mignini F. et al. Neuro-immune modulation of the thymus microenvironment (Review). **International Journal of Molecular Medicine** 33(6), 1392-1400, 2014.

Mikušová R. et al. What do we know about the structure of human thymic Hassall's corpuscles? A histochemical, immunohistochemical, and electron microscopic study. **Anatomischer Anzeiger**. 211, 140-148, 2017.

Miller J.F. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. **Immunological Reviews**. 185, 7-14, 2002.

Moll, U.M., Lane, B.L., Robert, F., Geenen, V., Legros, J.J. The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin-, vasopressin-, and neurophysin-like peptides in epithelial cells. **Histochemistry** 89, 385–390, 1988.

Moretti S. et al. Neuronal semaphorins regulate a primary immune response. **Current Neurovascular Research**. 3, 295-305, 2006.

Munro D.A.D. et al. Refuting the hypothesis that semaphorin-3f/neuropilin-2 exclude blood vessels from the cap mesenchyme in the developing kidney. **Developmental Dynamics**. 246(12), 1047-1056, 2017.

Nagib P.R. et al. Thymic microenvironmental alterations in experimentally induced diabetes. **Immunobiology**. 215(12), 971-979, 2010.

Neufeld G., Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**. 8(8), 632-645, 2008.

Nitta T., Suzuki H. Thymic stromal cell subsets for T cell development. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 73(5), 1021-1037, 2016.

Nunes-Alves C. et al. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. **Trends in Immunology**. 34(10), 502-510, 2013.

Odaka C. et al. Keratin 8 is required for the maintenance of architectural structure in thymus epithelium. **PLoS ONE**. 8(9), e75101, 2013.

Oh W.J., Gu C. The role and mechanism-of-action of sema3E and plexin-D1 in vascular and neural development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 24(3), 156-162, 2013.

Orciari S., Catalano A. Editorial: semaphorins: a further chemotropic family expressed in the thymus. **Journal of Leukocyte Biology**. 91(1), 1-2, 2012.

Pearse, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicologic Pathology**. 34, 504-514, 2006.

Patenaude J., Perreault C. Thymic mesenchymal cells have a distinct transcriptomic profile. **The Journal of Immunology**. 196(11), 4760-4770, 2016.

Plaza O.A., Moreno F. Anatomical variations of the thymus in relation to the left brachiocephalic vein, findings of necropsia. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. 107, 53-55, 2018.

Raimondi C. Neuropilin-1 enforces extracellular matrix signalling via ABL1 to promote angiogenesis. **Biochemical Society Transactions**. 42(5), 1429-1434, 2014.

Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. Development of secondary lymphoid organs. **Annual review of immunology**. 26, 627-650, 2008.

Rezzani R., Bonomini F., Rodella L.F. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**. 43(2), 73-120, 2008.

Ribatti D., Crivellato E., Vacca A. Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity. **Clinical & Experimental Immunology**. 144(3), 371-375, 2006.

Roy S. et al. Multifaceted role of neuropilins in the immune system: potential targets for immunotherapy. **Frontiers in Immunology**. 8, 1228, 2017.

Safieddine N., Keshavjee S. Anatomy of the thymus gland. **Thoracic Surgery Clinics**. 21(2), 191-195, 2011.

Sakata M., Ohigashi I., Takahama Y. Cellularity of thymic epithelial cells in the postnatal mouse. **The Journal of Immunology**. 200(4), 1382-1388, 2018.

Sakurai A, Doçi C.L., Gutkind J.S. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. **Cell Research**. 22(1), 23-32, 2012.

Savino W. et al. Laminin-mediated interactions in thymocyte migration and development. **Frontiers in Immunology**. 6, 579, 2015.

Savino W. et al. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**. 12(2), 77-89, 2016.

Savino W. et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **Journal of Leukocyte Biology**. 75(6), 951-961, 2004.

Savino W. et al. Is there a role for growth hormone upon intrathymic T-cell migration? **Annals of the New York Academy of Sciences**. 917, 748-754, 2000.

Savino W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. **Neuroimmunomodulation**. 17(3), 142-145, 2010.

Savino W. et al. In vivo effects of growth hormone on thymic cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 992, 179-185, 2003.

Savino W. Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease. **Frontiers of Hormone Research**. 48, 69-75, 2017.

Seach N. et al. Purified enzymes improve isolation and characterization of the adult thymic epithelium. **The Journal of Immunological Methods**. 385(1-2), 23-34, 2012.

Shanley D.P. et. al. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. **Trends in Immunology**. 30(7), 374-381, 2009.

Schwab S.R., Cyster J.G. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. **Nature Immunology**. 8(12), 1295-1301, 2007.

Scimone M.L. et al. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 103(18), 7006-7011, 2006.

Sereti I., et al. Long-term effects of intermittent interleukin 2 therapy in patients with HIV infection: characterization of a novel subset of CD4(+)/CD25(+) T cells. **Blood**. 100(6), 2159-2167, 2002.

Shi Y. et al. LT β R controls thymic portal endothelial cells for haematopoietic progenitor cell homing and T-cell regeneration. **Nature Communications**. 7, 12369, 2016.

Silva A.B., Palmer D.B. Evidence of conserved neuroendocrine interactions in the thymus: intrathymic expression of neuropeptides in mammalian and non-mammalian vertebrates. **Neuroimmunomodulation**. 18(5), 264-270, 2011.

Smaniotto S. et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology**. 146(7), 3005-3017, 2005.

Solanki A. et al. Gli3 in fetal thymic epithelial cells promotes thymocyte positive selection and differentiation by repression of Shh. **Development**. 145(3), 2018.

Staton C.A. Class 3 semaphorins and their receptors in physiological and pathological angiogenesis. **Biochemical Society Transactions**. 39(6), 1565-1570, 2011.

Sun L. et al. FSP1(+) fibroblast subpopulation is essential for the maintenance and regeneration of medullary thymic epithelial cells. **Scientific Reports**. 5, 14871, 2015.

Sun Z., Guo S.S., Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. **The Journal of Cell Biology**. 215(4), 445-456, 2016.

Takaba H. et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. **Cell**. 163(4), 975-987, 2015.

Takahashi K. et al. Expression of the semaphorins sema 3D and sema 3F in the developing parathyroid and thymus. **Developmental Dynamics**. 237(6), 1699-1708, 2008.

Takamatsu H., Kumanogoh A. Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system. **Trends in Immunology**. 33(3), 127-135, 2012.

Takamatsu H., Okuno T., Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. **Cellular & Molecular Immunology**. 7(2), 83-88, 2010. **(a)**

Takamatsu H. et al. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. **Nature Immunology**. 11(7), 594-600, 2010. **(b)**

Takegahara N., Kumanogoh A., Kikutani H. Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 360(1461), 1673-1680, 2005.

Tufro A. Semaphorin3a signaling, podocyte shape, and glomerular disease. **Pediatric Nephrology**. 29(4), 751-755, 2014.

Turvey S.E., Broide D.H. Chapter 2: Innate Immunity. **The Journal of allergy and clinical immunology**. 125(2), S24-S32, 2010.

Ueda Y. et al. Sema3e/plexin d1 modulates immunological synapse and migration of thymocytes by Rap1 inhibition. **The Journal of Immunology**. 196(7), 3019-3031, 2016

Valdembri D. et al. Class 3 semaphorins in cardiovascular development. **Cell Adhesion & Migration**. 10(6), 641-651, 2016.

Van den Brink M.R., Alpdogan O., Boyd R.L. Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. **Nature Reviews Immunology** 4(11), 856-867, 2004.

Vasil'ev K.A., Polevshchikov A.V. Thymus development in early ontogeny: a comparative aspect. **Ontogenez**. 46(3), 143-154, 2015.

Viana I.M. et al. Combined effect of insulin-like growth factor-1 and CC chemokine ligand 2 on angiogenic events in endothelial cells. **PLoS One**. 10(4), e0121249, 2015.

Villa-Verde D.M. et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **European Journal of Immunology**. 32(5), 1434-1444, 2002.

Yarilin A.A., Belyakov I.M. Cytokines in the thymus: production and biological effects. **Current Medicinal Chemistry**. 11(4), 447-464, 2004.

Yan F. et al. Thymic function in the regulation of T cells, and molecular mechanisms underlying the modulation of cytokines and stress signaling. **Molecular Medicine Reports**. 16(5), 7175-7184, 2017.

Yap J.Y. et al. Indirect presentation in the thymus limits naive and regulatory T-cell differentiation by promoting deletion of self-reactive thymocytes. **Immunology**. 12904, 2018.

Zollinger A.J., Smith M.L. Fibronectin, the extracellular glue. **Matrix Biology**. 60-61, 27-37, 2017.

ANEXO A

ANEXO B



**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 linfóides e células do sistema imunológico.

RESPONSÁVEL: Salete Smanioto

OBJETIVO: Avaliar os efeitos de hormônios hipofisários e semaforina sobre órgãos linfóides 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
 SIAPE 1120458