

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

Marvin Paulo Lins

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

Maceió – AL

2015

MARVIN PAULO LINS

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

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

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

Maceió – AL

2015

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

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

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

Bibliografia: f. 54-60.

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

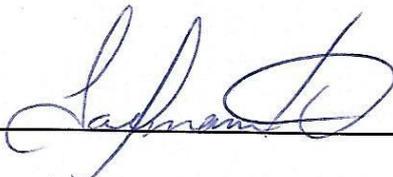
CDU: 612.018

## Folha de Aprovação

Marvin Paulo Lins

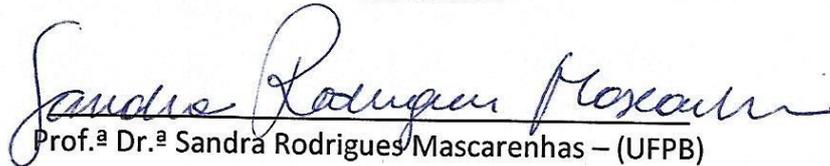
Participação do hormônio do crescimento nas interações entre timócitos/endotélio tímico envolvidas no processo migratório

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



Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto (Orientador)

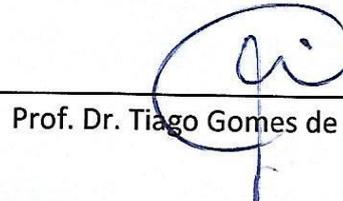
### Banca Examinadora



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



Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely – (UFAL)



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

## DEDICATÓRIA

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

## SUMÁRIO

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

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

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

### **2.2 Específicos:**

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

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Timo

#### 3.1.1 Histórico

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

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

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

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

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

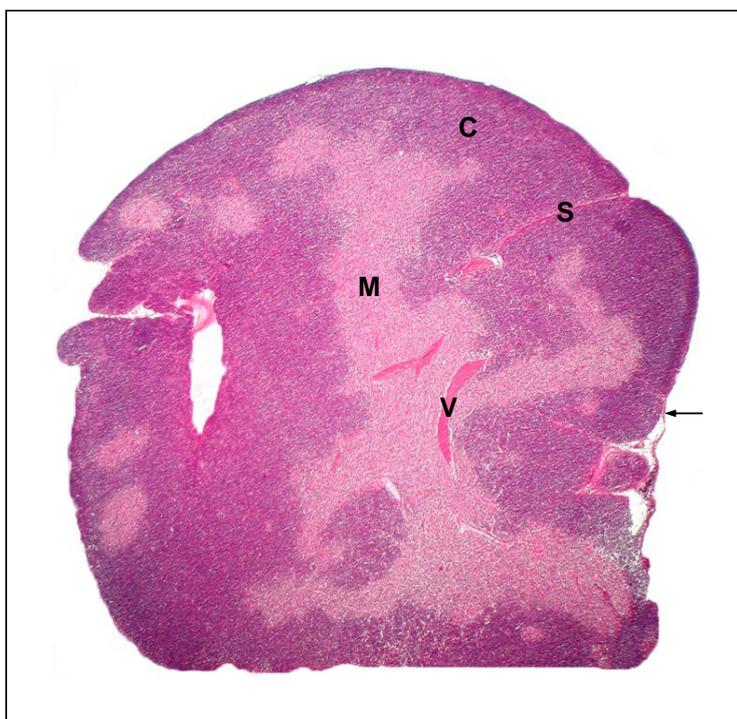
O timo é considerado um órgão-chave do sistema imune dos vertebrados, pois provê o microambiente necessário para o desenvolvimento das células T. Ele é considerado como órgão linfóide primário porque, da mesma forma que a medula óssea, é responsável pelo suprimento de células imunes aos órgãos linfóides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

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

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

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

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



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

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

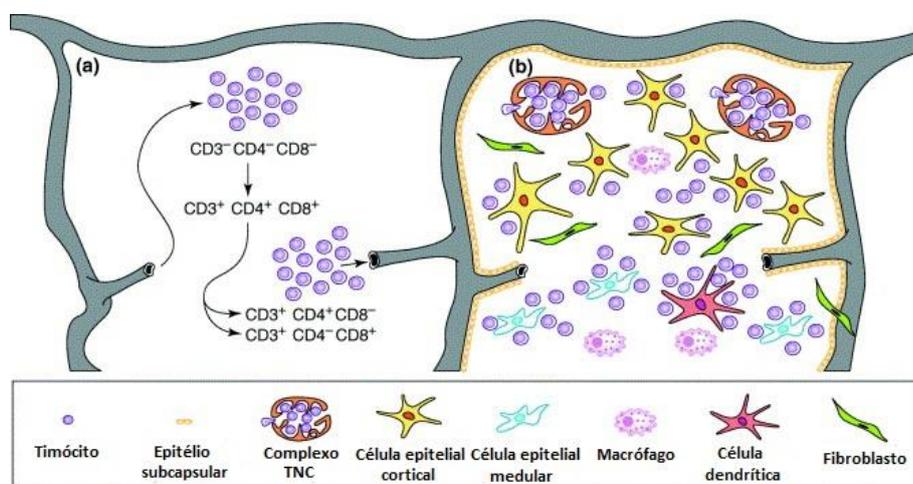
A capacidade única que o microambiente tímico possui para o desenvolvimento das células T é reconhecida há muitos anos e sugere-se, inclusive, que este seja um dos motivos para que sua estrutura tenha sido conservada filogeneticamente entre as espécies (TAKEOKA, et al., 1997). Este conceito é amplamente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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **3.2 Hormônio do Crescimento**

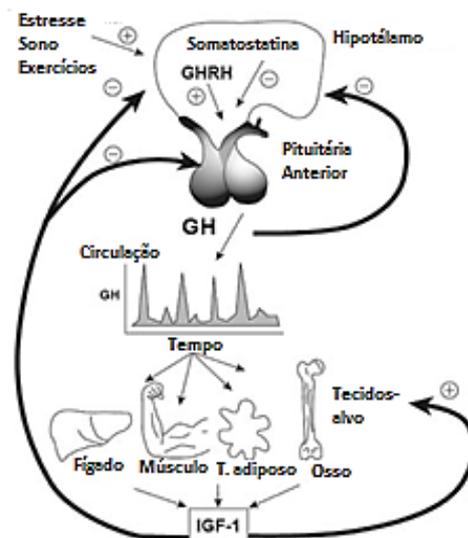
### **3.2.1 Fisiologia do eixo GH/IGF-1**

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

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

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

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



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

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

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

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

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

### **3.2.2 Ações do GH no timo**

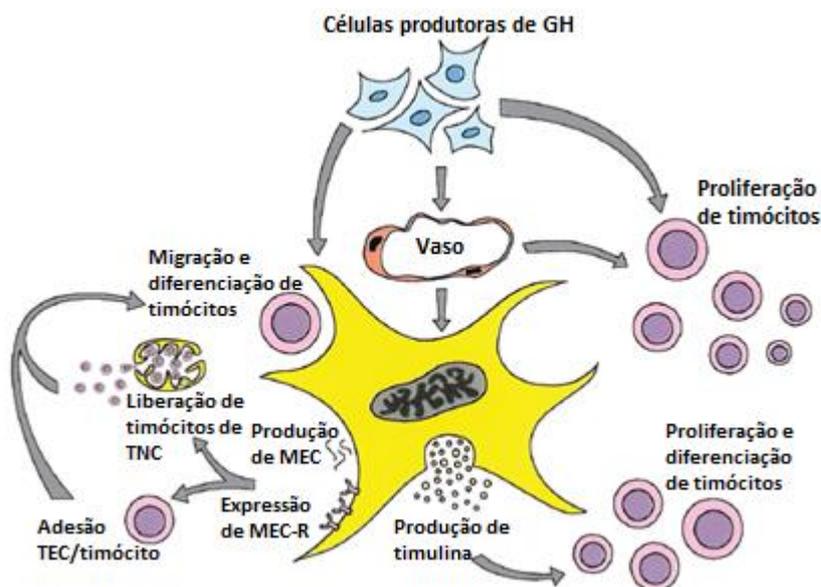
Um estudo feito há 80 anos associou, pela primeira vez, a hipofisectomia com a atrofia tímica em ratos. Embora as funções do GH e do timo não fossem precisamente conhecidas nessa época, esta foi uma observação preliminar para experimentos posteriores sobre o papel do GH na imunorregulação. A ideia de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

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

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

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

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



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

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

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

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção de timócitos murinos

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

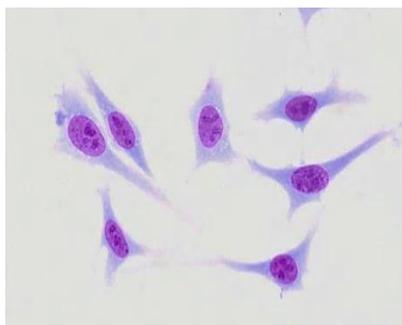
### 4.2 Linhagem de células endoteliais

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

### 4.3 Padronização da cultura celular

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

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



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

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

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

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

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

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

#### **4.6 Ensaio de adesão**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

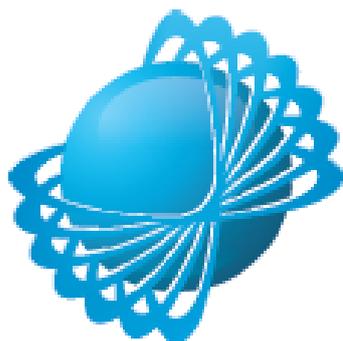
#### **4.9 Ensaio de migração transendotelial**

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

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

#### **4.10 Análise estatística**

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



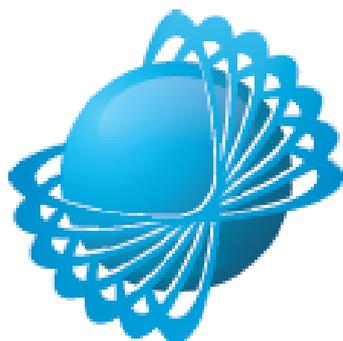
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



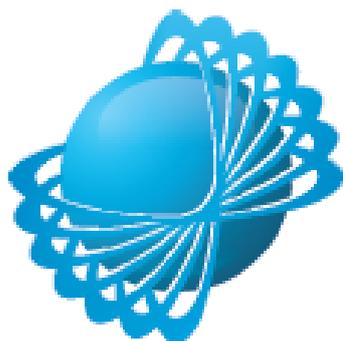
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



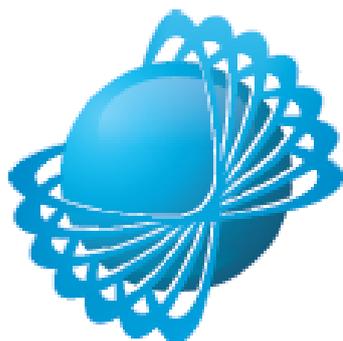
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



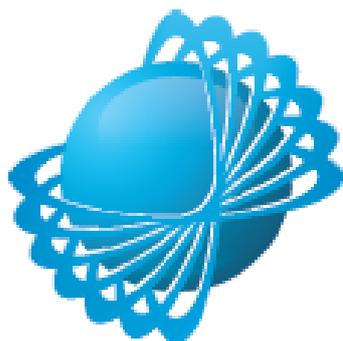
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



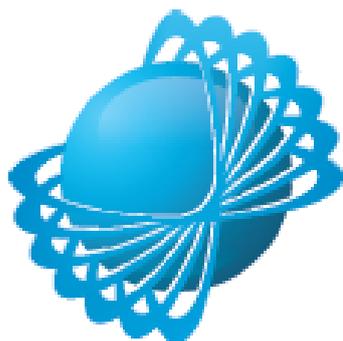
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



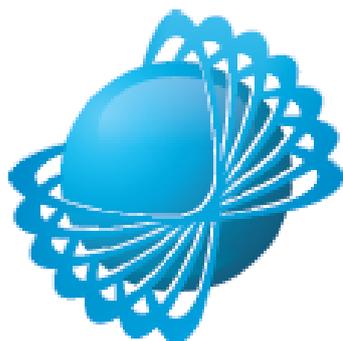
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



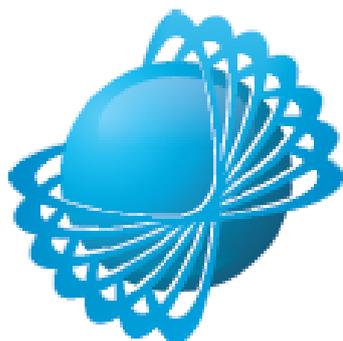
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



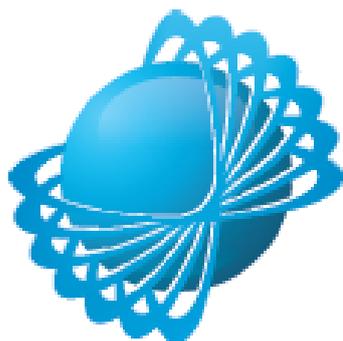
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



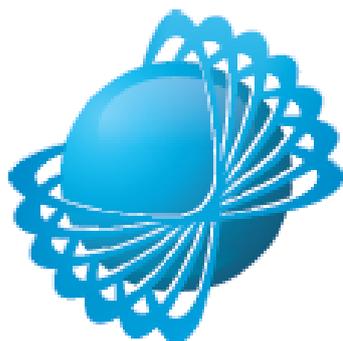
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



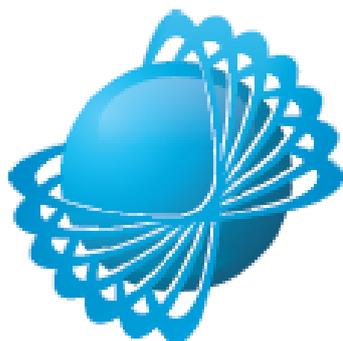
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



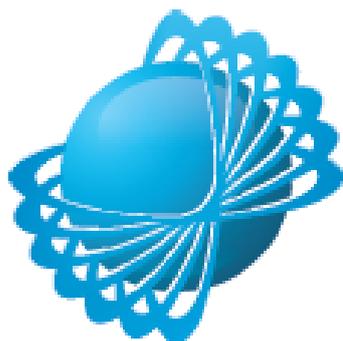
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



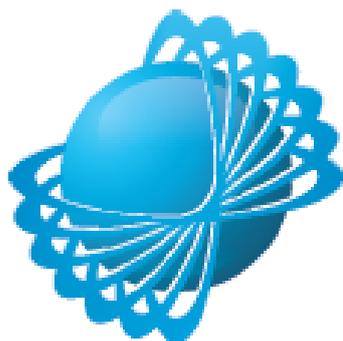
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



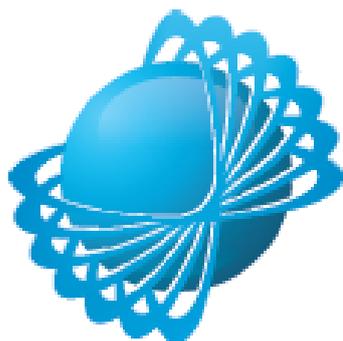
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



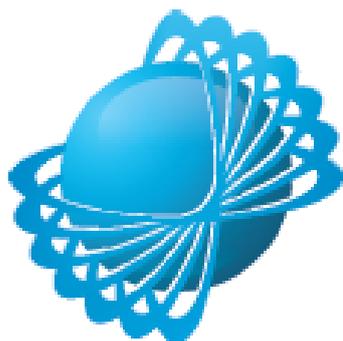
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



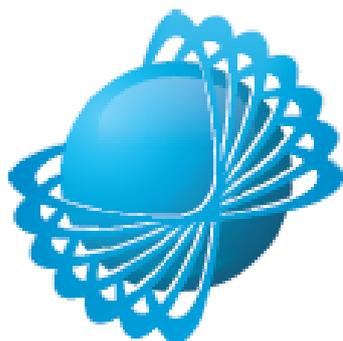
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



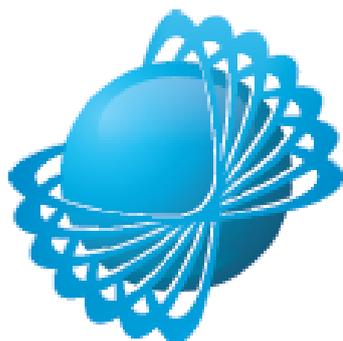
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



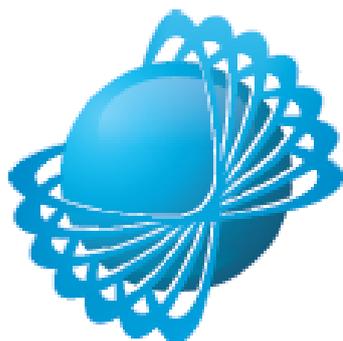
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



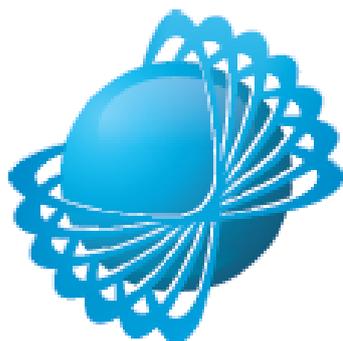
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



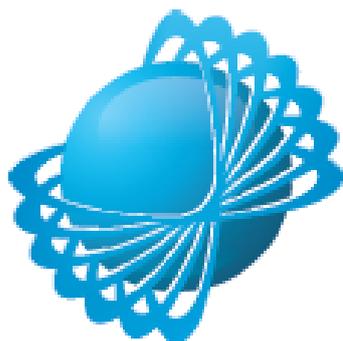
**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br



**FAPEAL**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA  
DO ESTADO DE ALAGOAS

Página não autorizada pelo  
Pesquisador(a)

---

BDTD FAPEAL  
arquivo@fapeal.br

## **7 CONCLUSÃO**

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

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

## REFERÊNCIAS

- ASTROF S, HYNES RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. (2009) 12(2):165–175.
- AW D, TAYLOR-BROWN F, COOPER K, PALMER DB. Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice. *Biogerontology* (2009) 10(3):311-322.
- BAHIA L, AGUIAR LGK, VILLELA NR, BOTTINO D, BOUSKELA E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* (2006) 50(2):291-303.
- BARNARD A, LAYTON D, HINCE M, SAKKAL S, BERNARD C, CHIDGEY A, BOYD R. Impact of the neuroendocrine system on thymus and bone marrow function. *Neuroimmunomodulation* (2008) 15:7–18.
- CASTELLANO G, AFFUSO F, DI CONZA P, FAZIO S. The GH/IGF-1 axis and heart failure. *Current Cardiology Reviews* (2009) 5:203-215.
- CHU Y, SCHMITZ S, CHOUDHURY B, TELFORD W, KAPOOR V, GARFIELD S, HOWE D, GRESS R. Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* (2008) 112: 2836-2846.
- DAVID JR, TERHORST C. Organs and cells of the immune system. *Decker Intellectual Properties* (2010).
- DE MELLO-COELHO V, VILLA-VERDE DM, DARDENNE M, SAVINO W. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol*. (1997) 76:39-49.
- DELON I, BROWN NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. (2007) 19(1):43-50.
- DZHAGALOV I, PHEE H. How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell. Mol. Life Sci* (2012) 69:663-682.
- FAUSTO CS, CHAMMAS MC, SAITO OC, GARCIA MRT, JULIANO AG, SIMÕES CA, CERRI GG. Timo: caracterização ultra-sonográfica. *Radiol Bras* (2004) 37(3):207-210.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ L, GUERRA B, DÍAZ-CHICO JC, FLORES-MORALES A. Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2013) 4:66.
- FERONE D, VAN HAGEN M, PIVONELLO R, COLAO A, LAMBERTS SWJ, HOFLAND LJ. Physiological and pathophysiological role of somatostatin receptors in the human thymus. *European Journal of Endocrinology* (2000) 143:S27-S34.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JOHNSON-LÉGER CA, AURRAND-LIONS M, BELTRAMINELLI N, FASEL N, IMHOF BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* (2002) 100(7):2479-2486.

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

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

LEPELLETIER Y, SMANIOTTO S, HADJ-SLIMANE R, VILLA-VERDE DM, NOGUEIRA AC, DARDENNE M, HERMINE O, SAVINO W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2007) 104(13):5545-50.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NAPOLITANO LA, LO JC, GOTWAY MB, MULLIGAN K, BARBOUR JD, SCHMIDT D, GRANT RM, HALVORSEN RA, SCHAMBELAN M, MCCUNE JM. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* (2000) 16:1103-1111.

NAPOLITANO LA, SCHMIDT D, GOTWAY MB, AMELI N, FILBERT EL, NG MM, CLOR JL, EPLING L, SINCLAIR E, BAUM PD, LI K, KILLIAN ML, BACCHETTI P, MCCUNE JM. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest* (2008) 118:1085-1098.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TAUB DD, TSARFATY G, LLOYD AR, DURUM SK, LONGO DL, MURPHY WJ. Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment. *J. Clin. Invest.* (1994) 94:293–300.

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

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

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

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

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

- WELNIAK LA, SUN R, MURPHY WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J. Leukoc. Biol.* (2002) 71:381–387.
- WIEDERMANN CJ, REINISCH N, BRAUNSTEINER H. Stimulation of monocyte chemotaxis by human growth hormone and its deactivation by somatostatin. *Blood* (1993) 82(3):954-960.
- WIESNER S, LEGATE KR, FÄSSLER R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci.* (2005) 62(10):1081-99.
- WILLAMS RL, COURTNEIDGE AS, WAGNER EF. Embryonic lethality and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* (1988) 52:121-131.
- WONG NK, LAI JC, BIRKENHEAD D, SHAW AS, JOHNSON P. CD45 down-regulates Lck-mediated CD44 signaling and modulates actin rearrangement in T cells. *J Immunol.* (2008) 181(10):7033-7043.
- XU X, JAEGER ER, WANG X, LAGLER-FERREZ E, BATALOV S, MATHIS NL, WILTSHIRE T, WALKER JR, COOKE MP, SAUER K, HUANG YH. Mst1 directs Myosin IIa partitioning of low and higher affinity integrins during T cell migration. *PLoS One.* (2014) 9(8):e105561.
- YUAN SY, SHEN Q, RIGOR RR, WU MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* (2012) 83(1): 82–88.
- ZHANG J, SHI F, BADOOR K, DENG Y, MCGAVIN MK, SIMINOVITCH KA. WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 99(4):2240-5.
- ZLOTOFF DA, BHANDoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann N Y Acad Sci.* (2011) 1217:122-138.