

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUCIANA PEIXOTO VENEZIANI

Efeitos de análogos da acetilcolina e noradrenalina sobre interações entre timócitos e células epiteliais tímicas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Wilson Savino

Prof. Dr^a. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz

RIO DE JANEIRO

2020

Veneziani, Luciana Peixoto.

Efeitos de análogos da acetilcolina e noradrenalina sobre interações entre timócitos e células epiteliais tímicas. / Luciana Peixoto Veneziani. - Rio de Janeiro, 2020.

XIV, 79f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

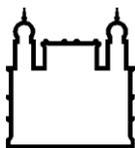
Orientador: Wilson Savino.

Co-orientadora: Daniella Arêas Mendes da Cruz.

Bibliografia: f. 69-79

1. Inervação do Timo. 2. Acetilcolina. 3. Carbacol. 4. Arterenol. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LUCIANA PEIXOTO VENEZIANI

**EFEITOS DE ANÁLOGOS DA ACETILCOLINA E NORADRENALINA SOBRE
INTERAÇÕES ENTRE TIMÓCITOS E CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS.**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Wilson Savino
Prof. Dr^a. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz

Aprovada em: 14/05/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Patrícia Machado, Instituto Oswaldo Cruz (Presidente)
Prof. Dr. Claudio Serfarty, Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Alexandre de Castro Keller, Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Vinicius Frias de Carvalho, Instituto Oswaldo Cruz (revisor e suplente)
Prof. Dra. Tatiana Maron, Instituto Oswaldo Cruz (Suplente)

Rio de Janeiro, 11 de maio de 2020

À minha mãe Elenir
meu exemplo de força
e determinação

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, por possibilitarem que eu seguisse meu caminho na vida acadêmica e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu esteja aqui. Principalmente a minha mãe, Elenir, e meus avós, Rubéns e Eni, que me criaram, acreditaram em mim e investiram no meu futuro com muito carinho e amor, obrigada por tudo. Aos meus primos, Júlia e Felipe, por terem me acolhido na casa deles e entre experimentos, me levaram pra conhecer SP e comer pizza sem ketchup. Amo vocês.

Ao meu namorado, Lucas, por todo o amor, apoio, carinho e toda a ajuda, seja pra fazer divulgação científica no sábado ou pra me socorrer na hora de usar o excel, não teria conseguido sem você. Te amo.

Aos meus amigos de fora do laboratório, Camila, Héber, Marina e Romario por todo o apoio, piadas, conselhos, conversas de madrugada e broncas quando necessário. Não sei o que seria de mim sem vocês.

Agradeço aos meus orientadores, Daniella e Savino, por terem me dado a oportunidade de trabalhar nesse projeto. Por me receberem de braços abertos, pela paciência, apoio e orientações práticas e teóricas. Sou muito grata pela oportunidade de ser aluna deles e de aprender sobre a ciência e beleza do timo, com grandes cientistas.

A todos no LPT que fazem o dia-a-dia de trabalho ser muito mais leve. Gostaria de agradecer ao meu grupo de pesquisa, Beth, Carol, Júlia e Mariana, apesar das mudanças, sou muito grata pelo tempo que passamos juntas, por tudo que me ensinaram e pela cumplicidade. Especialmente à Beth e Mari, por todas às vezes que ficamos até mais tarde no laboratório terminando experimentos e passando tubos no citômetro. Tenho muita sorte de fazer parte de um grupo e de um laboratório, cheio de mulheres que me inspiram todos os dias. Aos amigos do grupos de Chagas, Alessandro e Dina, que tive a oportunidade de conviver por um tempo que considero curto demais, mas que guardo com muito carinho. Aos Dumith's, por terem me acolhido e sempre me desafiarem a pensar além dos dados, especialmente Jairo e Rhaissa, que admiro muito e espero um dia ser uma cientista como eles são. Aos amigos Bruno, Bárbara, Camila e Lia pelas risadas, piadas internas, referências diárias de *FRIENDS*, companhia no ônibus e passeios culturais. A todos os outros alunos que fazem parte do LPT, por toda a ajuda, risadas e desabafos. Agradeço também ao suporte técnico e secretaria do laboratório, Raquel, Yohan e Elaine, indispensáveis para o funcionamento e rotina do laboratório; aos pesquisadores, por todas as discussões, conselhos e críticas, especialmente ao Dr. Dumith Chequer Bou-Habib pelo carinho, cafézinhos, debates, conversas literárias na hora do almoço e por sempre me incluir nas atividades de seu grupo; a Dra. Adriana Bonomo e Dr. Rudimar Frozza, por todas as discussões,

ajuda e inclusão em atividades científicas; ao Dr. Vincius Cotta-de-Almeida, chefe do laboratório, por todas as contribuições a esse trabalho, pela ajuda, conselhos e pelo empenho em manter todos no laboratório motivados.

À Dra. Elizabeth Giestal e Msc. Sula Bittencourt do Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer na Universidade Federal Fluminense, que cederam reagentes essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à todos os membros do laboratório por sempre me receberem tão bem e por todos os conselhos, críticas e sugestões.

Ao Dr. Alexandre Keller e Msc. Michelangelo Gonzatti do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE), pela colaboração nos experimentos de biologia molecular e por terem me recebido no laboratório. Sou muito grata por toda a equipe do LIPE e seus colaboradores por toda a ajuda.

Ao meu revisor, Dr. Vinicius Frias, por ter aceitado o convite de ser meu revisor, por todas as críticas e sugestões.

Agradeço também à banca examinadora, por terem aceitado esse convite, pela discussão e conselhos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeitos de análogos da acetilcolina e noradrenalina sobre interações entre timócitos e células epiteliais tímicas.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Peixoto Veneziani

O timo é um órgão linfóide primário responsável pelo desenvolvimento e seleção de células T. Diversos fatores podem afetar o desenvolvimento de células T, como citocinas, quimiocinas e moléculas da matriz extracelular, mas também hormônios, neuropeptídeos e neurotransmissores. O timo recebe densa inervação simpática, liberando majoritariamente noradrenalina (NA), timócitos e células tímicas não linfóides expressam receptores adrenérgicos e podem sintetizar catecolaminas, sugerindo modulação de NA por diferentes vias. Por outro lado, poucas evidências anatômicas suportam a hipótese da inervação tímica parassimpática. Entretanto, acetilcolina (ACh) parece ser endogenamente produzida no órgão, uma vez que diferentes células no timo expressam a enzima sintetizadora de ACh (ChAT) e receptores colinérgicos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o papel funcional de ACh e NA sobre os componentes linfóide e microambiental do timo, e sobre as interações entre células epiteliais e timócitos. Avaliamos a expressão de receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 e colinérgicos M1, M3, M5 e α_7 em timócitos e TECs, através do método de PCR quantitativa. Todas as populações celulares testadas expressavam os receptores selecionados. Além disso, buscamos caracterizar o efeito de drogas análogas aos neurotransmissores sobre a morte e a proliferação de timócitos, através da marcação com anexina-V/iodeto de propídio (IP) e CFSE respectivamente. Timócitos obtidos do timo de camundongos C57BL/6 fêmeas, foram tratados com carbacol (análogo de ACh - em concentrações variando de 10 nM a 1000 nM) ou arterenol (análogo de NA - em concentrações variando de 10 nM a 1 mM). Verificamos que apenas arterenol na concentração de 1 mM induziu a apoptose nas células tratadas. Nenhum dos análogos modulou a proliferação celular. Avaliamos ainda o efeito das drogas sobre a migração de timócitos, agindo como quimioatrente ou modulando a migração induzida por fibronectina. Nenhuma das drogas demonstrou efeito quimioatraente ou alterou a migração induzida por fibronectina. Além disso, avaliamos o efeito das drogas sobre a interação TEC/timócitos através de ensaios de adesão e observamos que carbacol foi capaz de diminuir a adesão de timócitos a TECs em todas as concentrações testadas. Essa diminuição é refletida no número de timócitos que aderem às TECs e parece estar associada a modulação da expressão do receptor de laminina VLA-6. Nossos dados sugerem que timócitos e as linhagens de TECs testadas expressam receptores e que neurotransmissores, em especial a ACh, podem modular a interação entre TECs e timócitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Effects of acetylcholine and norepinephrine analogs on interactions between thymocytes and thymic epithelial cells

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Peixoto Veneziani

The thymus is a primary lymphoid organ responsible for the development and selection of T cells. Several factors can affect T cell development in the thymus, such as cytokines, chemokines and extracellular matrix molecules, but also hormones, neuropeptides and neurotransmitters. The thymus receives dense sympathetic innervation, which mostly releases norepinephrine (NA). Thymocytes and non-lymphoid thymic cells express adrenergic receptors and can synthesize catecholamines, suggesting that NA modulation can occur in different pathways. On the other hand, little anatomical evidence supports the hypothesis of parasympathetic thymic innervation. However, acetylcholine (ACh) appears to be endogenously produced in the organ, since different cells in the thymus express the ACh-synthesizing enzyme (ChAT) and cholinergic receptors. Thus, the aim of this study was to determine the functional role of ACh and NA on the lymphoid and microenvironmental components of the thymus, and on the interactions between epithelial cells and thymocytes. We evaluated the expression of $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 2C$, $\beta 2$ adrenergic receptors and M1, M3, M5 and $\alpha 7$ cholinergic receptors in thymocytes and TECs, using the quantitative PCR method. All cell populations tested expressed the selected receptors. Then we evaluated the effect of neurotransmitter-like drugs on thymocyte cell death and proliferation, through annexin-V / propidium iodide (PI) and CFSE staining, respectively. Thymocytes obtained from C57BL /6 female mice were treated with carbachol (ACh analog - in concentrations ranging from 10 nM to 1000 nM) or arterenol (NA analog - in concentrations ranging from 10 nM to 1 mM). Only arterenol at 1 mM concentration induced apoptosis. None of the analogs altered cell proliferation. We also analyzed the effect of these drugs on thymocyte migration, evaluating if any of them could act as a chemoattractant or modulating cell migration induced by fibronectin. None of the drugs showed a chemoattractive effect or altered migration induced by fibronectin. In addition, we evaluated the effect of arterenol and carbachol on TEC / thymocyte adhesion through adhesion assays and observed that carbachol was able to diminished thymocyte adhesion to TECs at all concentrations tested. This decrease is reflected in the number of thymocytes that adhere to TECs and appears to be associated with modulation of the expression of the VLA-6 laminin receptor. Our data suggest that thymocytes and the tested TEC lineages express adrenergic and cholinergic receptors and that neurotransmitters, especially ACh, can modulate the interaction between TECs and thymocytes.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Timo	1
1.1.1. Desenvolvimento de células T	4
1.2. Fatores que influenciam o desenvolvimento de células T	9
1.2.1. Infecções	10
1.2.2. Hormônios.....	11
1.2.3. Neurotransmissores	14
1.3. Inervação de órgãos linfoides.....	23
1.3.1. Inervação do timo	23
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Animais	30
3.2. Linhagens celulares	30
3.3. Drogas Análogas à ACh e à NA.....	30
3.4. Isolamento de subpopulações de timócitos.....	30
3.5. RT-PCR quantitativa	31
3.6. Ensaio de morte celular.....	33
3.7. Ensaio de proliferação celular	33
3.8. Ensaio de migração	33
3.9. Ensaio de adesão timócitos/células epiteliais tímicas.....	35
3.10. Citometria de Fluxo de TECs.....	36
3.11. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	37
4.1. Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em timócitos e células epiteliais tímicas.....	37
4.2. Ensaio funcionais	42
4.2.1. Morte celular de timócitos	42
4.2.2. Proliferação celular	45
4.2.3. Ensaio de migração celular	47
4.2.4. Ensaio de Adesão de timócitos a TECs	55
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Posição anatômica do timo murino	1
Figura 1.2: Representação histológica do timo	2
Figura 1.3: Diagrama esquemático do microambiente tímico	4
Figura 1.4: Esquema da seleção negativa de células T e expressão de PTA no timo	8
Figura 1.5: Processo de diferenciação intratímica de timócitos no microambiente tímico.	9
Figura 1.6: Ativação do eixo HPA por citocinas	12
Figura 1.7: Diagrama esquemático de interações imuno-neuro-endócrinas e sua influência no timo	14
Figura 1.8: Estrutura molecular de acetilcolina e noradrenalina	16
Figura 1.9: Diagrama esquemático do <i>cross-talk</i> entre o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema imune	17
Figura 1.10: Representação esquemática do reflexo anti-inflamatório	20
Figura 1.11: Esquema mostrando a biossíntese de noradrenalina e adrenalina	21
Figura 1.12: Diagrama esquemático de “bouton” passante simpático e sua interação com uma célula alvo efetora. NA é sintetizada a partir do precursor tirosina	22
Figura 1.13: Vias catecolaminérgicas no timo	25
Figura 1.14: Influência de receptores α e β -AR nos estágios de diferenciação de timócitos de ratos.....	27
Figura 3.1: Diagrama esquemático do experimento de migração	35
Figura 4.1: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em amostras de timócitos totais e nas subpopulações de timócitos	38
Figura 4.2: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em amostras de TECs.	39
Figura 4.3: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em células 1.4C18 em alta e baixa confluência.....	40
Figura 4.4: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em células 3.10 em alta e baixa confluência	41
Figura 4.5: Esquema representativo de estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo após o tratamento com arterenol ou carbacol após 3 horas de incubação	43
Figura 4.6: Arterenol 1 mM induz a apoptose de timócitos	44
Figura 4.7: Carbacol não induz morte celular em timócitos.....	45
Figura 4.8: Análise citofluorométrica de timócitos marcados com CFSE	46
Figura 4.9: Arterenol e carbacol não influenciam a proliferação basal de timócitos	47
Figura 4.10: Arterenol não age como quimioatraente para timócitos	48

Figura 4.11: Esquema representativo de estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo após a migração.....	49
Figura 4.12: Carbacol não age como quimioatraente para timocitos	51
Figura 4.13: O pré-tratamento com arterenol não modula a migração de timócitos induzida por fibronectina (FN)	52
Figura 4.14: O pré-tratamento com carbacol não modula a migração induzida por fibronectina (FN).....	54
Figura 4.15: Figuras representativas da adesão timócitos às células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4	56
Figura 4.16: Índice de associação timócitos às células 2BH4	57
Figura 4.17: Cálculo do percentual do índice de associação (IA) TEC-timócitos após tratamento com arterenol (A) ou carbacol (B).....	57
Figura 4.18: Carbacol diminui o número de timócitos aderidos a TECs	58
Figura 4.19: Análise citofluorimétrica da expressão dos receptores VLA-4, VLA-5 e VLA-6 em células epiteliais tímicas (TECs) da linhagem 2BH4	59
Figura 6.1: Carbacol diminui a adesão de timócitos à TECs.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Primers utilizados na avaliação da expressão de receptores Adrenérgicos e Colinérgicos	32
Tabela 4.1: Número absoluto de subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de arterenol, testado como potencial quimioatraente	50
Tabela 4.2: Percentual do input nas subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de arterenol, testado como potencial quimioatraente	50
Tabela 4.3: Número absoluto de subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de carbacol, testado como potencial quimioatraente.....	51
Tabela 4.4: Percentual do input nas subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de carbacol, testado como potencial quimioatraente	52
Tabela 4.5: Número absoluto de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com arterenol.....	53
Tabela 4.6: Percentual de input de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com arterenol.....	53
Tabela 4.7: Número absoluto de timócitos, após ensaio de migração celular induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com carbacol.....	54
Tabela 4.8: Percentual de input de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com carbacol.....	55
Tabela 4.9: Números relativos de células epiteliais tímicas que expressam receptores de ECM, na ausência ou presença de carbacol.	60

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh – Acetilcolina (*Acetylcholine*)
- AChE – Acetilcolinesterase (*Acetylcholinesterase*)
- ACTH – Adrenocorticotropina (*Adrenocorticotropic hormone*)
- AIRE - Regulador autoimune (*Autoimmune regulator*)
- AR - Receptor adrenérgico (*Adrenergic Receptor*)
- Art – Arterenol
- ATP - Adenosina Trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
- AVP – Vasopressina (*Vasopressin*)
- BALT - Tecido linfoide associado aos brônquios (*Bronchus-associated lymphoid tissue*)
- BSA - Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)
- Carb – Carbacol (*Carbachol*)
- ChAT - Colina acetil transferase (*Choline acetyltransferase*)
- cTEC - Célula Epitelial Tímica cortical (*cortical Thymic Epithelial Cell*)
- DA – Dopamina (*Dopamine*)
- DAG - Diacilglicerol (*Diacylglycerol*)
- DBH - Dopamina β-hidroxilase (*Dopamine β-hydroxylase*)
- DN - Timócito duplo-negativo para a expressão das moléculas CD4 e CD8
- DOPA - 3,4-di-hidroxi-l-fenilalanina (*3,4-dihydroxy-l-phenylalanine*)
- DP - Timócito duplo- positivo para a expressão das moléculas CD4 e CD8
- ECM - Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)
- Fezf2 – fator de transcrição *forebrain-expressed zinc finger 2*
- FN – Fibronectina (*Fibronectin*)
- FSH -Hormônio folículo estimulante (*Follicle stimulating hormone*)
- GALT - Tecido linfoide associado ao intestito (*Gut-associated lymphoid tissue*)
- GC- Glicocorticoídes (*Glucocorticoids*)
- GH -Hormônio do crescimento (*Growth hormone*)
- GPCRs - Receptores acoplados a proteína G (*G protein- coupled receptor*)
- HPA - Hipotálamo – hipófise(pituitária) – Adrenal (*Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis*)
- IA – Índice de Adesão (*Adhesion index*)
- IL - Interleucina (*Interleukins*)
- JCM - Junção córtico-medular (*Cortico-Medullary Junction*)
- LH - Hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*)
- LM – Laminina (*Laminin*)
- LNs - Linfonodo (*Lymph node*)

LPS - Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharides*)
mAChR - Receptores muscarínicos de Acetilcolina (*Muscarinic Acetylcholine Receptors*)
MALT - Tecido linfoide associado a mucosa (*Mucosa-associated lymphoid tissue*)
MNL - Células mononucleares (*Mononuclear cells*)
mTEC - Célula Epitelial Tímica medular (*Medullary Thymic Epithelial Cell*)
NA – Noradrenalina (*Norepinephrine – NE*)
nAChR - Receptores nicotínicos de Acetilcolina (*Nicotinic Acetylcholine Receptors*)
NOD – Camundongo diabético não obeso (*Non-obese diabetic mouse*)
NPY - Neuropeptídeo Y (*Neuropeptide Y*)
OT – Ocitocina (*Oxytocin*)
OVA - Ovoalbumina (*Ovalbumin*)
OXO-M- Oxotremorina (*Oxotremorine M*)
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells*)
PKC - Proteína Cinase C (*Protein kinase C*)
PNM - Feniletanolamina - N - Metiltransferase (*Phenylethanolamine-N-methyltransferase*)
PRL – Prolactina (*Prolactin*)
PTA – Antígenos do tecidos periféricos (*Peripheral tissue antigens*)
S1P - Esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine-1-phosphate*)
S1P1 - Receptor de esfingosina - 1- Fosfato (*Sphingosine-1-phosphate receptor*)
SFB - Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)
SCF – Fator de célula-tronco (*Stem cell factor*)
SNC - Sistema nervoso central (*Central nervous system*)
SNE - Sistema nervoso entérico (*Enteric nervous system*)
SNPas - Sistema nervoso parassimpático (*Parasympathetic nervous system*)
SNS - Sistema nervoso simpático (*Sympathetic nervous system*)
SP - Timócitos simples-positivos para a expressão das moléculas CD4 ou CD8
TCR - Receptor de célula T (*T cell receptor*)
TEC – Célula epitelial tímica (*Thymic Epithelial Cell*)
TH - Tirosina hidroxilase (*Tyrosine Hydroxylase*)
TNC - Células nurse tímicas (*Thymic nurse cells*)
TNF- α - Fator de necrose tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)
TSH - Hormônio estimulante da tireoide (*Thyroid stimulating hormone*)
VLA - Antígeno de aparecimento muito tardio (*Very Late Antigen*)
WT – Tipo Selvagem (*Wild Type*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Timo

O timo é um órgão linfoide primário responsável pelo desenvolvimento e seleção de células T que uma vez formadas podem migrar para órgãos linfoides secundários nos quais poderão dar início à resposta imune celular (1). Anatomicamente, está localizado na porção superior do mediastino e posterior ao esterno, na altura dos grandes vasos do coração (Figura 1.1) (2). É composto por dois lobos revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, da qual se originam septos que dividem o parênquima em diversos lóbulos contínuos (2).

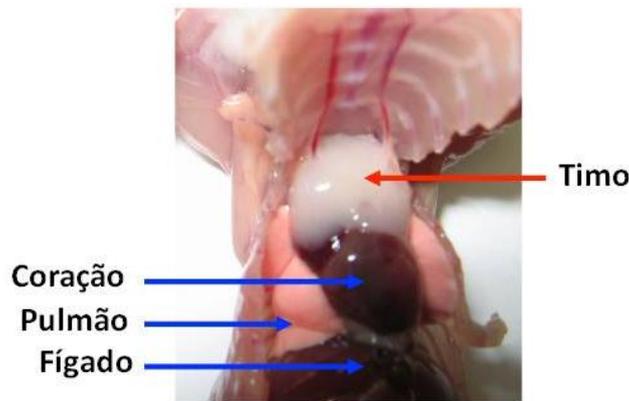


Figura 1.1: Posição anatômica do timo murino. (Obtido a partir de: Xing Y, Hogquist K A, 2014).

Cada lóbulo é composto por uma região cortical mais externa e uma região medular mais interna conectadas pela junção cortico-medular (JCM) (3). Apesar da denominação, não há limites anatômicos definidos entre as regiões, sendo essa uma denominação histológica. O córtex apresenta intensa coloração de hematoxilina, devido a maior presença de células T em desenvolvimento – timócitos - enquanto a região medular apresenta coloração mais branda devido a menor presença de timócitos (Figura 1.2) (2).

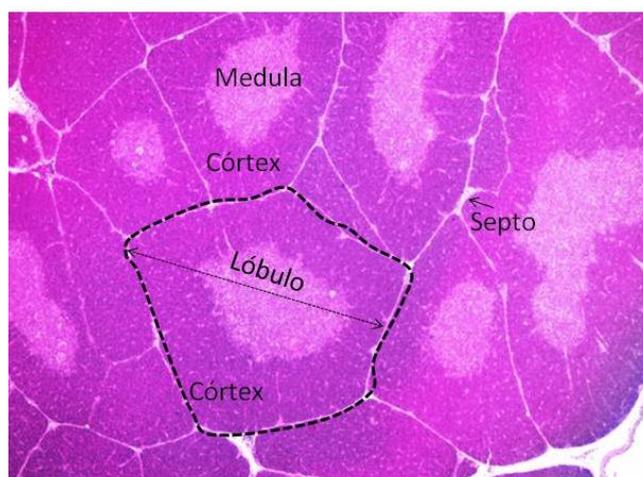


Figura 1.2: Representação histológica do timo. Na imagem é possível observar diferentes lóbulos tímicos e suas regiões principais, o córtex e a medula (Adaptado de: <http://mol.icb.usp.br/index.php/12-4-orgaos-linfoides/>)

O timo foi descrito pela primeira vez nos manuscritos do médico e filósofo Galeno de Pérgamo (± 160 AD), o órgão foi chamado de timo devido a sua semelhança morfológica com a folha *Thymus cunula* (4). Galeno considerava que o timo serviria apenas como “almofada” entre o esterno e os vasos sanguíneos, porém foi capaz de observar que o timo era maior em animais jovens e que diminuía conforme a idade (4). Mesmo com sua primeira descrição na Grécia antiga, o timo foi considerado durante séculos apenas um órgão vestigial e seu papel essencial na diferenciação de células T foi demonstrado apenas nos anos 60 (4). Em 1961, Jacques Miller mostrou que camundongos que sofreram timectomia – retirada cirúrgica do timo - imediatamente após o nascimento apresentavam maior índice de mortalidade do que seus controles e que a morte desses animais era causada por infecções laboratoriais comuns, sugerindo então que esses animais seriam mais susceptíveis à infecções. Outras análises constataram ainda que esses animais apresentavam linfopenia no sangue, baço e linfonodos e que não eram capazes de rejeitar um transplante de pele, como o esperado em um camundongo imunocompetente (4,5,6). Miller concluiu que o timo teria um papel essencial em um sistema imune funcional, sendo o responsável pelo desenvolvimento de células T imunocompetentes (5,7).

O desenvolvimento de células T depende de um microambiente favorável, intensa sinalização celular e processos celulares controlados que formam uma rede tridimensional chamada microambiente tímico (8,9). O microambiente tímico é formado por células linfoides, como timócitos, células dendríticas (DCs), macrófagos e células B e células não-linfoídes como as células epiteliais tímicas (TECs), células endoteliais e células mesenquimais (9,10). As células do microambiente tímico participam não só da estrutura do órgão, mas também são fontes essenciais de sinalização para o desenvolvimento dos timócitos (1). Dentro desse contexto, destacam-se as TECs que formam o componente principal do microambiente tímico (8) e são responsáveis pela

produção de moduladores solúveis, incluindo hormônios e citocinas, além de expressarem complexos de histocompatibilidade que interagem com receptores de células T. Essa interação é essencial para o desenvolvimento de timócitos (11). Os hormônios tipicamente produzidos por TECs são quimicamente definidos e incluem timosina- α_1 , timopoetina e timulina que também podem modular a diferenciação de timócitos (12). A relação TECs-timócitos é evidenciada durante a embriogênese, uma vez que nesse período o timo carece de sua rede tridimensional e da divisão córtex e medula. A partir dos estágios de desenvolvimento embrionário E11 e E12 de camundongos, progenitores linfóides colonizam o timo, acompanhados por alterações no desenvolvimento e na organização de TECs (8,13). Portanto, timócitos e TECs se desenvolvem lado a lado durante a embriogênese, o que pode levar a hipótese de uma relação simbiótica entre timócitos e o ambiente em que estão inseridos (13).

TECs podem ser observadas nas regiões de córtex e medula onde podem formar nichos especiais contribuindo para o desenvolvimento de timócitos (14). A partir da sua localização, TECs podem ser classicamente divididas em células epiteliais tímicas corticais (cTEC) e medulares (mTEC) (8). No córtex é possível observar também a presença de um subconjunto adicional de TECs, denominado células *nurse* tímicas (TNC - do inglês *Thymic Nurse Cells*), que constituem um complexo linfoepitelial, onde uma única TEC envolve um número variável de timócitos (14,15). A diferenciação em populações especializadas de TECs contribui para diferentes fases do desenvolvimento de timócitos, uma vez que timócitos em diferentes estágios de maturação ocupam regiões tímicas diferentes (8). Classicamente o córtex abriga timócitos mais imaturos, que apresentam fenótipo duplo-negativo (DN), ou seja, que não expressam as moléculas de superfície CD4 ou CD8 e duplo-positivo (DP), que expressam CD4 e CD8. Na medula, observamos a presença de timócitos maduros simples-positivos (SP), que expressam CD4 ou CD8 na superfície celular, considerados portanto SP CD4 ou SP CD8. Essa diferença indica que o desenvolvimento de células T está intimamente ligado a processos migratórios altamente controlados (8,14).

No córtex tímico, as cTECs apresentam uma forma tridimensional reticular, que permite sua interação com um grande número de timócitos, essas células participam das fases iniciais de desenvolvimento de timócitos, e na seleção positiva (8,13). Seu fenótipo pode ser definido a partir da expressão dos marcadores de superfície citoqueratina 8, molécula de adesão celular epitelial (EpCAM – do inglês *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), Ly51, CD205 (15). Como mencionado anteriormente, no córtex tímico é possível observar a presença de TNC, um complexo linfoepitelial em que uma cTEC pode abrigar centenas de timócitos, criando um nicho microambiental especial (14,16). A maioria dos timócitos associados à TNC apresentam o fenótipo DP, porém é possível observar também células DN e algumas células maduras SP (14). Ademais, a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – do inglês *major*

histocompatibility complex) do tipo I e II e a presença de componentes necessários para processamento e apresentação de antígenos por cTECs, indicam seu papel importante na seleção positiva (16). Por outro lado, mTECs expressam diferentes marcadores de superfície e são morfológicamente diferentes, apresentando uma morfologia mais compactada (16). Podem ser definidas pelo fenótipo $CD45^-$, $EpCam^+$, $Ly51^-$, $UEA1^+$, e junto de DCs participam do processo de seleção negativa (8,15,16). Essa configuração pode ser vista esquematicamente na figura 1.3.

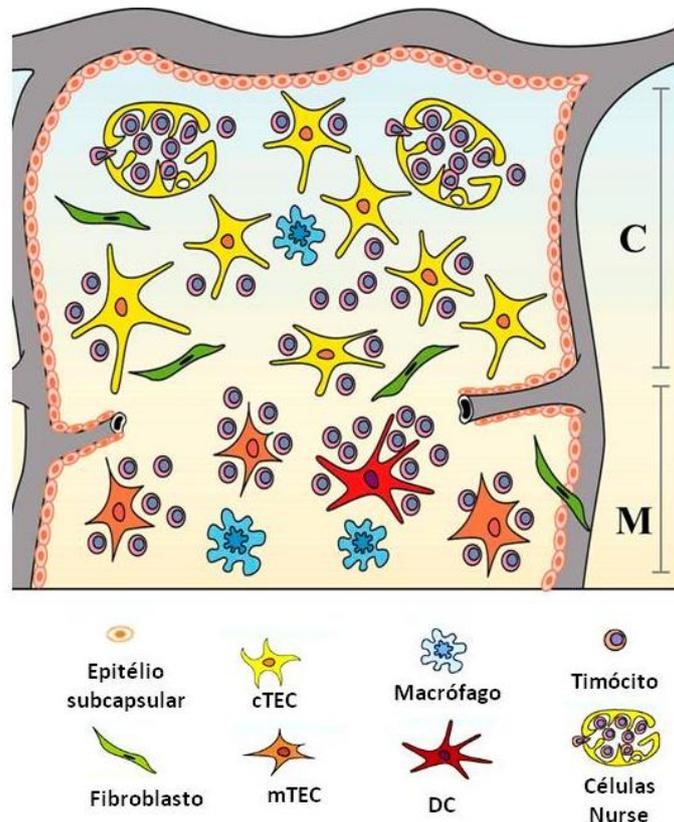


Figura 1.3: Diagrama esquemático do microambiente tímico. A figura mostra uma representação de um lóbulo tímico com timócitos integrados a uma rede celular não-linfóide e heterogênea: o chamado microambiente tímico, composto por células epiteliais (amarelo e laranja), células dendríticas (vermelho), macrófagos (azul) e fibroblastos (verde). O tecido epitelial apresenta heterogeneidade morfológica que pode ser vista nas regiões subseptal / subcapsular, cortical e medular. No córtex, notamos um complexo linfoepitelial específico, o TNC. C: córtex; M: Medula; cTEC: célula epitelial tímica cortical; mTEC: célula epitelial tímica medular. Adaptado de (SAVINO, 2006).

1.1.1. Desenvolvimento de células T

No timo adulto, os progenitores de células T possuem uma capacidade de renovação limitada, mas sua presença é garantida por um influxo contínuo de progenitores hematopoiéticos originados da medula óssea, que chegam ao timo através da corrente sanguínea (8). Essas células chegam ao timo através de vasos presentes na JCM, de onde podem migrar durante os processos de diferenciação (1). Seu recrutamento depende da expressão de receptores que possam responder

às quimiocinas produzidas no microambiente tímico, responsáveis pelo “*homing*” de células progenitoras. Essas quimiocinas incluem CCL25, CCL21 e também o ligante de P-seletina, PSGL-1 (17), fazendo com que seja necessária a expressão dos receptores correspondentes CCR9, CCR7 e P-selectina por possíveis progenitores (18,19).

Após a entrada de células progenitoras no timo, o processo de diferenciação de timócitos é iniciado (8). Caracterizado por processos distintos que podem ser identificados através de alterações na expressão de proteínas de membrana, como CD4 e CD8 e a expressão do complexo CD3:TCR (1). As células recém chegadas ao timo são consideradas DN e constituem cerca de 5% de toda a população de timócitos totais. Em camundongos, o fenótipo DN pode ser ainda subdividido em quatro estágios diferentes (DN1, DN2, DN3, DN4) baseados nas expressões das moléculas CD44 (molécula de adesão – receptor de ácido hialurônico) e CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) (1). As células mais imaturas são chamadas DN1 e apresentam o fenótipo CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD25⁻CD44⁺ e apesar de iniciado o processo de diferenciação essas células ainda apresentam potencial multipotente, podendo se diferenciar em outros tipos celulares (20). O comprometimento com a linhagem de célula T depende da sinalização entre timócitos e o epitélio tímico. Dentre os sinais essenciais para o comprometimento, estão os ligantes do receptor Notch, que uma vez ativado dá início ao estabelecimento do “programa de linhagem” T (18). O epitélio tímico também é responsável pela produção de outros ligantes e citocinas essenciais para o desenvolvimento de células T, como o fator de células-tronco (do inglês *stem cell factor* - SCF) do ligante KIT (cKIT) e a interleucina 7 (IL-7), que são fatores críticos na proliferação de timócitos em diferentes estágios da diferenciação (18). Inicialmente, a sinalização por Notch e IL-7 regula processos de proliferação, sobrevivência e progressão, especialmente para células DN1 induzindo sua progressão para o estágio seguinte, DN2 (21).

Com a progressão da diferenciação, as células migram em direção ao córtex externo (8). O estágio DN2 pode ser observado na parte interna do córtex e é caracterizado por intensa proliferação e expansão de timócitos (8). As células nesse estágio apresentam um fenótipo CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁺ que pode ser ainda subdividido em DN2a e DN2b (20). Células DN2a expressam altos níveis de cKIT que é gradualmente perdido no estágio DN2b, onde timócitos se comprometem com a linhagem T e perdem sua capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares (20). Durante esse estágio de diferenciação, os timócitos começam a expressar as proteínas Rag1 e Rag2 para que ocorra o rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR – do inglês *T Cell Receptor*) (17). O TCR é um heterodímero mais comumente formado por uma cadeia α e uma cadeia β (podendo também ser formado por cadeias $\gamma\delta$) consequente da recombinação V(D)J (1). Com a progressão da diferenciação, a proliferação dos timócitos diminui e as células passam a apresentar o fenótipo CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁻ DN3 (17). O fenótipo DN3 pode ser

ainda subdividido em DN3a e DN3b de acordo com a expressão de CD27 (20). O estágio DN3 marca um ponto importante no processo de diferenciação. É nesse momento que a maioria dos genes de célula T estão ativados e as células perdem o potencial de diferenciação em outras linhagens (20). O rearranjo da cadeia β de TCR ocorre na transição entre os estágios DN3a e DN3b (22). Células que sofreram rearranjo produtivo de genes têm a cadeia β acoplada a uma cadeia invariável pré-T α e moléculas CD3, formando um pré-TCR. Esse complexo é então transportado para a superfície celular, enquanto àquelas células sem uma cadeia TCR β funcional são eliminadas por morte celular (1). A expressão de pré-TCR leva a intensa sinalização, induzindo a proliferação, sobrevivência e diferenciação no chamado processo de seleção β . As células que passaram com êxito por esse processo sofrem expansão proliferativa enquanto progredem em direção ao córtex interno, eventualmente progredindo para o estágio DN4 (CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁺) (17,20).

Apesar do fenótipo de diferenciação DN ser considerado em 4 diferentes estágios, após o estágio DN3 todas as células α/β expressam CD4 ou CD8 (8). O estágio DN4 foi assim nomeado devido a baixa expressão de CD4 e CD8 na superfície de células após o estágio DN3 e, portanto, sua difícil separação de outras células verdadeiramente DN (8). Além disso, células que passaram pela seleção β rapidamente se tornam DP, sendo assim muitos autores preferem chamar o estágio DN4 de pré-DP (8). Nesse momento, é iniciada a recombinação da cadeia α do TCR e também é observada uma alteração na migração das células, que até então estava direcionada ao córtex externo. Nesse estágio, células começam a migrar em direção ao córtex interno, próximo a JCM (8). Semelhante ao observado em células DN3, há uma parada na proliferação de células DP que coincide com o rearranjo de TCR α . Diferente da cadeia β , o rearranjo da cadeia α não inclui o segmento gênico D, apenas VJ (1). A recombinação produtiva da cadeia α leva a expressão do complexo TCR $\alpha\beta$ na superfície celular (20). Até a formação do TCR o desenvolvimento de células T ocorre de maneira independente de antígeno, porém consequente a formação do receptor as células são responsivas a antígenos e passam por processos de seleção positiva e negativa (1).

O TCR $\alpha\beta$ é essencial na defesa do organismo, pois é através da sinalização pelo TCR que células T podem responder a antígenos na forma de peptídeos associados ao MHC de classe I ou de classe II (1). Sendo assim, o funcionamento correto dessa molécula é indispensável e portanto, deve ser testado corretamente (1). O primeiro processo regulatório que visa avaliar a especificidade do TCR é chamado seleção positiva, onde é testada a capacidade de timócitos DP de reconhecerem e se ligarem ao complexo peptídeo/MHC apresentado por cTECs (23). Apenas uma pequena parcela de receptores (10-30%) será capaz de reconhecer o complexo peptídeo próprio/MHC e essa interação levará a intensa sinalização, induzida principalmente pela produção de IL-7 pelo microambiente tímico, para sobrevivência e diferenciação dessas células (1). Células

portando receptores não funcionais são eliminadas por morte celular programada (1,23). Nesse estágio também é iniciado o processo de especificação de linhagem, onde células que interagem com MHC II ou MHC I expressam CD4 ou CD8, respectivamente (17). Essas células migram em direção a medula como timócitos SP onde passam por um segundo processo, a seleção negativa, responsável por impedir que células T potencialmente auto-reativas, ou seja, que apresentem alta afinidade pelo antígeno próprio deixem o timo (17).

A migração dos timócitos em direção à medula é mediada por um aumento na expressão do receptor CCR7, fazendo com que as células migrem em direção as quimiocinas ligantes, CCL19 e CCL21 produzidas por diversas células microambientais, incluindo mTECs (8,23). A interação entre esses timócitos semi-maduros e as mTECs é essencial no processo de seleção negativa, uma vez que mTECs apresentam antígenos de proteínas expressas em diversos tecidos (PTA – do inglês *peripheral tissue antigens*) contribuindo para a indução da tolerância (23,24). Essa propriedade é denominada expressão gênica promíscua e é controlada principalmente por dois fatores: o gene AIRE (do inglês - *Autoimmune Regulator*) e o fator de transcrição *Forebrain Embryonic Zinc Finger-like 2* (Fezf2). Esses reguladores agem de forma independente, mas sinérgica no controle da expressão de PTAs (24). Outro contribuidor importante na apresentação de PTAs são as DCs (8). A forma como DCs contribuem para a seleção negativa depende da interação entre DCs e mTECs, uma vez que a principal teoria envolvendo seu papel na seleção negativa é a transferência de antígenos de mTECs para DCs por apresentação cruzada (Figura 1.4) (8). Interações de alta afinidade entre TCR $\alpha\beta$ e o complexo peptídeo/MHC levam a eliminação das células por apoptose (1). Porém, algumas células SP CD4 que reconhecem antígenos próprios com alta avidéz podem se diferenciar em células T reguladoras (Tregs). Esse processo de diferenciação depende da expressão de CD25, estímulo de citocinas como IL-2 e IL-15, além da sinalização de TCR e por fim da expressão do fator de transcrição FOXP3 (17).

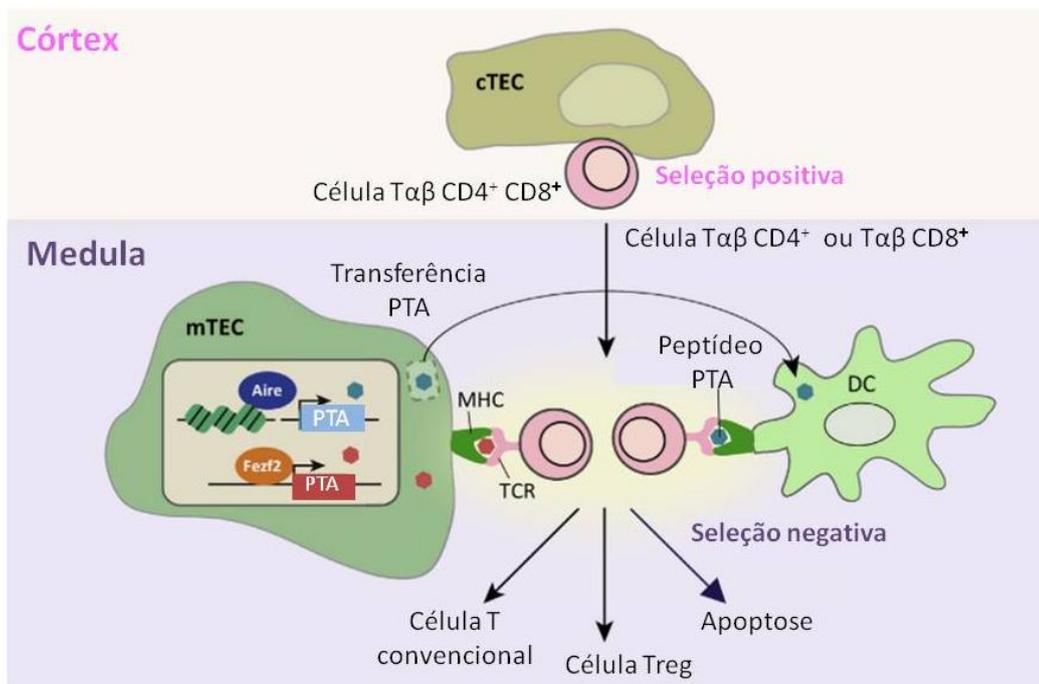


Figura 1.4: Esquema da seleção negativa de células T e expressão de PTA no timo. Durante os estágios iniciais de diferenciação timócitos interagem com cTECs no córtex tímico. Após a seleção positiva timócitos duplo-positivos se diferenciam em células simples positivas e migram em direção a medula onde interagem com mTECs. mTEC expressam peptídeos expressos em diversos tecidos (PTAs). Timócitos interagem com mTECs através do receptor de células T (TCR) e do complexo peptídeo/ peptídeo-complexo principal de histocompatibilidade (MHC), em um processo chamado seleção negativa. A expressão de PTAs é controlada por Aire e Fezf2 em mTEC. PTAs expressos por mTECs são transferidos para células dendríticas, que também auxiliam no processo de seleção negativa. A maioria das células T autorreativas são eliminadas por apoptose, mas algumas se diferenciam em células T reguladoras. Adaptado de (TAKABA; TAKAYANAGI, 2017)

Após a seleção negativa, a maioria dos timócitos ainda não é funcionalmente maduro e deve passar por processos adicionais de maturação na medula antes que estejam aptos a sair do timo (8). Durante esse período, diversas moléculas são reguladas e o processo de maturação pode ser definido a partir da downregulação de CD69 (sinal de retenção tecidual) e aumento na expressão da L-selectina CD62L, integrina β_7 e do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato ($S1P_1$) (25). O principal papel desse receptor na saída das células do timo é mediar a migração de células $S1P_1^+$ em direção a um gradiente da molécula esfingosina-1-fosfato (S1P), uma vez que a concentração de S1P é maior no sangue e na linfa (23,25). A importância de $S1P_1/S1P$ pode ser ainda demonstrada a partir da evidência de que células hematopoiéticas murinas que não expressam $S1P_1$ não são observadas na corrente sanguínea e em órgãos linfoides secundários, uma vez que células maduras SP não conseguem deixar o timo (25,26). A saída do timo pode ainda depender de moléculas de matriz extracelular (ECM) como fibronectina (FN) (14). A relevância dessa molécula pode ser observada no modelo de camundongo diabético não obeso (NOD) que desenvolve diabetes tipo 1, uma doença autoimune dependente de células T (27). É possível

observar que timócitos de camundongos NOD apresentam alteração no receptor de FN VLA5 (do inglês, *Very Late Antigen 5* – receptor de FN) impedindo a migração celular e adesão a FN, que leva ao acúmulo de timócitos SP no timo desses animais (27,28,29).

Ao final do processo de diferenciação, são liberadas células T maduras auto-tolerantes que podem migrar para órgãos linfoides secundários onde terá início a resposta imune celular (Figura 1.5).

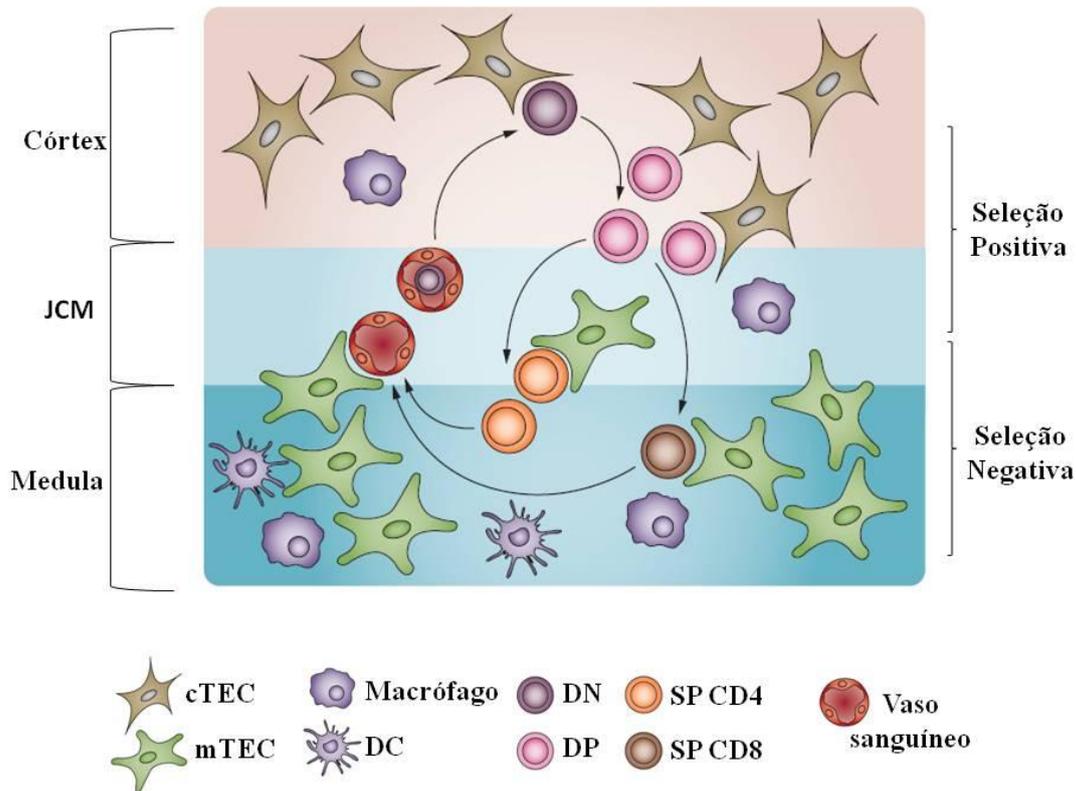


Figura 1.5: Processo de diferenciação intratímica de timócitos no microambiente tímico. Progenitores de células T chegam ao timo através de vasos sanguíneos na região cortico-medular e migram por diferentes regiões tímicas. Após sua entrada, vão em direção ao córtex externo, seguido pelo córtex interno até a medula. Durante esse processo, os timócitos interagem com diversos componentes do microambiente tímico, incluindo células epiteliais corticais, medulares, células dendríticas e macrófagos. Timócitos em desenvolvimento regulam os níveis de expressão de diferentes proteínas membranares, receptores e co-receptores como CD4 e CD8, que podem ser utilizados como marcadores para definir os diferentes estágios de diferenciação (Adaptado de SAVINO et al., 2016).

1.2. Fatores que influenciam o desenvolvimento de células T

O desenvolvimento das células T é um processo altamente controlado e depende de uma grande variedade de moléculas solúveis (30). Hormônios, neurotransmissores e citocinas podem influenciar diversos processos celulares durante o desenvolvimento de células T, incluindo, morte, migração, adesão e seleção de timócitos modulando assim o *pool* de células maduras na periferia

(30). Alterações nesse equilíbrio podem comprometer o desenvolvimento de células T competentes e conseqüentemente prejudicar a formação da resposta imune.

1.2.1. Infecções

O desenvolvimento e saída de células T competentes do timo podem ser alterados em consequência de doenças infecciosas (31). Uma característica comum nesse cenário é a atrofia grave do órgão, que é observada principalmente devido a depleção relacionada a apoptose de timócitos DP, acompanhada de uma diminuição na proliferação de timócitos. Além das alterações observadas nas células linfoides, pode-se observar também alterações no compartimento microambiental tímico, com densificação da rede epitelial e aumento da deposição de matriz extracelular (31).

Diversos agentes infecciosos podem invadir o timo, incluindo vírus, bactérias, parasitas e fungos (31). Numerosos trabalhos descrevem alterações tímicas durante a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Cotta-de-Almeida e colaboradores (2003) observaram alterações na ECM no timo de camundongo infectados, incluindo aumento progressivo de depósitos de LM e FN, alterações nos padrões de migração de timócitos, incluindo frequência aumentada de células DP em órgãos linfoides secundários no pico da parasitemia (32). Além disso, Mendes-da-Cruz e colaboradores (2003) confirmaram variações na frequência de células DP durante a infecção, com diminuição de 200 vezes no timo e aumento de 16 vezes nos linfonodos (LNs) subcutâneos de camundongos infectados. Foi observado também que as células DP que se encontravam em órgãos linfoides periféricos expressavam o TCRV β 5, e normalmente células com esse fenótipo seriam deletadas no timo. Esses dados indicam que a infecção por *T. cruzi* induz alterações no repertório de células T periféricas com potencial autorreativo (33).

A atrofia tímica também faz parte das alterações observadas no modelo murino de *T. cruzi* e está principalmente relacionada com disfunção no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que resulta no aumento nos níveis de glicocorticóides (GCs) (34). Glicocorticóides (GCs) são amplamente descritos como imunossupressores, capazes de induzir a apoptose de timócitos, sendo timócitos DP os mais sensíveis a esse estímulo (31). Pérez e colaboradores (2007) demonstraram que as alterações tímicas relacionadas a infecção são decorrentes do aumento na concentração de GCs. Além disso, animais que sofreram adrenalectomia (retirada cirúrgica da adrenal) combinada com a administração do antagonista de receptor glucocorticóide RU486 não sofreram alteração no peso tímico, mas também não apresentaram perda de timócitos DP mediada por apoptose. Esses dados indicam que o desequilíbrio imuno-endócrino pode levar a efeitos deletérios no timo durante a infecção por *T. cruzi* (31,35).

Outro hormônio envolvido nas alterações tímicas observadas durante a infecção por *T. cruzi* é a prolactina (PRL) (34). Ambos PRL e GCs são hormônios relacionados ao estresse, sofrendo modulação diante de estímulos adversos. Além de sua produção sistêmica, tanto PRL quanto GCs são produzidos no timo, tendo ação local através de interações parácrinas e autócrinas (36). Em condições adversas, o aumento de PRL pode proteger o hospedeiro do efeito imunossupressivo de GCs, desde que o balanço entre esses hormônios seja mantido (37). Durante a infecção murina por *T. cruzi* é possível observar um desequilíbrio entre esses hormônios no timo, com uma diminuição progressiva de PRL e aumento de GCs (37). Portanto, é possível concluir que alterações hormonais intratímicas e sistêmicas podem levar a alterações no processo de desenvolvimento de células T. Sendo assim, a compreensão das interações neuro-imuno-endócrinas se torna essencial no entendimento da formação da resposta imune e no desenvolvimento de timócitos.

1.2.2. Hormônios

A interação entre os sistemas nervoso, endócrino e imune já é bem estabelecida e ocorre através de ligantes solúveis comuns entre os sistemas, mantendo circuitos de comunicação intra e inter-sistemas, contribuindo para a manutenção da homeostase (38). Isso pode ser observado em células imunes que são capazes de sintetizar hormônios e glândulas endócrinas e neurônios que sintetizam citocinas (39). Portanto, pode-se concluir que a base das interações entre os três sistemas está na expressão de receptores recíprocos que reconheçam as moléculas produto dos sistemas nervoso, endócrino e imune, que incluem hormônios, citocinas, neurotransmissores e neuropeptídeos (38,39). Nesse contexto, citocinas são consideradas importantes mediadores na comunicação entre os sistemas imune e nervoso, podendo levar a alterações cerebrais (38,39). Citocinas podem chegar ao sistema nervoso central (SNC) de diversas maneiras, sendo através de capilares fenestrados, modulando a permeabilidade da barreira hematoencefálica ou através de transportadores específicos (40,41). Também são capazes de modular o SNC através do estímulo de neurônios aferentes periféricos (40). Citocinas podem atuar também na modulação do eixo HPA. Diversas citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α são capazes de regular a ativação do eixo HPA (40). O eixo HPA faz parte do sistema neuroendócrino, que constitui a seguinte formação básica: Hipotálamo - Hipófise (pituitária) – Adrenal (42). A hipófise é responsável pela secreção de diversos hormônios essenciais na regulação do organismo, e pode ser dividida em hipófise anterior (adeno-hipófise) e a hipófise posterior (neuro-hipófise) (42). Seis hormônios principais são liberados pela adeno-hipófise, são eles hormônio do crescimento (GH – do inglês *Growth Hormone*), adrenocorticotropina (ACTH), hormônio estimulante da tireoide (TSH), PRL, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Enquanto que na neuro-

hipófise são liberados os hormônios peptídicos vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (42). O controle da secreção hormonal é feito pelo hipotálamo, que recebe sinalização de diversas fontes do SN, funcionando como um centro de informações relacionadas a homeostase (39,42).

Brevemente, a ativação do eixo HPA leva a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (42). O hormônios CRH na adeno-hipófise estimula a produção de ACTH, que uma vez liberado na circulação pode então estimular o córtex da glândula adrenal, induzindo a liberação de GCs na corrente sanguínea (42). Uma vez na corrente sanguínea, GCs agem inibindo o eixo HPA, que funciona em feedback negativo (42,43). Durante uma infecção, são produzidas citocinas pró-inflamatórias, que quando liberadas por células imunes podem ativar o eixo HPA independente de ACTH (Figura 1.6)(43).

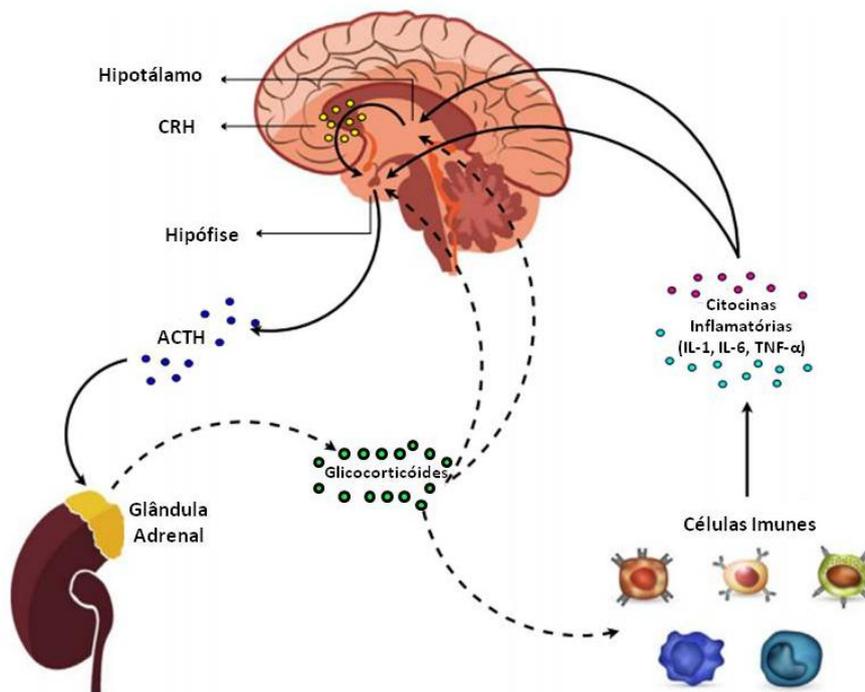


Figura 1.6: Ativação do eixo HPA por citocinas. Diagrama esquemático da interação entre os sistemas imune e neuroendócrino através da modulação do eixo HPA por citocinas. Setas sólidas indicam estimulação e setas tracejadas indicam inibição. Adaptado de (MALEK et al., 2015).

O controle neuroendócrino da função imune inclui diferentes níveis de organização, incluindo órgãos linfóides primários, sendo assim é possível inferir que as interações neuroendócrinas se estendem ao timo (38), uma vez que hormônios também são essenciais para o desenvolvimento de células T e na manutenção do microambiente tímico (38). A interação hormonal inclui vias endócrinas e parácrinas/autócrinas que atuam nas células tímicas através de receptores específicos (34). Um exemplo é a modulação de timulina, um hormônio tímico produzido por TECs, pelos hormônios PRL e GH. Ambos PRL e GH são capazes de induzir a secreção de timulina (38). No caso de GH, esse efeito foi observado até mesmo em camundongos idosos, que naturalmente apresentam baixos níveis de timulina (38,44). Ambos GH e PRL podem

modular diversas funções tímicas, como proliferação e migração de timócitos e a proliferação de TECs sendo moléculas importantes na manutenção da homeostasia do microambiente tímico (45,46). Essa modulação pode ocorrer devido a expressão de receptores específicos para PRL, GH e do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-1 – do inglês *insulin-like growth factor-I*) (45). De Mello-Coelho e colaboradores (1997) demonstraram que o tratamento de TECs murinas com PRL, GH e IGF-1 podem induzir a um aumento na adesão de timócitos à TECs. O estudo aponta também para a possível modulação da ECM por GH, uma vez que ao bloquear os receptores de ECM o fenômeno foi revertido (36). Além do estímulo endócrino, timócitos e TECs podem produzir GH e PRL indicando que a modulação de processos tímicos pode ocorrer também de maneira autócrina/parácrina (34).

Outros hormônios, como os do eixo tireotrófico, podem influenciar o desenvolvimento de timócitos (34). De maneira simplificada, a cascata de ativação do eixo tireotrófico inclui a produção de hormônio liberador do TSH (TRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo, que estimula a produção de TSH na adeno-hipófise (42). Uma vez liberado, TSH pode controlar a secreção tireoidiana dos hormônios tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) (42). Descritos como hormônios essenciais na regulação do metabolismo energético, essas moléculas podem também influenciar na diferenciação de células T (34). Foi demonstrado que T_3 pode modular diversos aspectos da fisiologia tímica, uma vez que camundongos tratados com esse hormônio, apresentaram aumento na celularidade e peso tímico, além de um aumento no número total de TNC e na expressão proteica de componentes da ECM (47). Os autores apontaram ainda, de acordo com o observado *in vivo*, que o tratamento de TECs com T_3 levou a um aumento na expressão do receptor de FN, VLA-5, e de laminina (LM), VLA-6, indicando que T_3 pode modular fenômenos tímicos através de moléculas da ECM (47).

Hormônios sexuais também podem influenciar o desenvolvimento das células T (34). Durante o envelhecimento, o timo sofre um processo fisiológico denominado involução tímica dependente da idade, uma das principais causas para a diminuição da produção de células T *naive* e conseqüentemente redução da imunidade durante o envelhecimento (48). Em humanos, essa atrofia tímica começa a partir do primeiro dia de vida, com rápido declínio durante a puberdade (48). Esse declínio, pode ser associado a um aumento nos níveis de hormônios sexuais, que podem agir inibindo funções imunológicas (9). Foi observado que camundongos castrados apresentam um atraso no processo de atrofia tímica e que a remoção de esteróides sexuais após a puberdade levou a reparação da arquitetura tímica, com aumento da celularidade e timopoiese em humanos e camundongos (49). Embora a produção de esteróides sexuais não tenha sido observada no timo, timócitos e TECs expressam receptores para andrógenos e estrógenos (34,50).

Neuropeptídeos secretados pela neurohipófise, como OT e AVP também podem afetar o desenvolvimento de células T. Em culturas de timo fetal, o tratamento com antagonista do receptor de OT (OTR) induziu a apoptose de células CD8⁺, enquanto que o antagonista do receptor de AVP (V1bR) inibiu a diferenciação de células T, favorecendo o comprometimento com a linhagem CD8 (34,51).

Diferentes hormônios e neuropeptídeos circulantes são importantes na manutenção da homeostase e podem influenciar a diferenciação de células T diretamente ou modulando o microambiente tímico (como resumido na figura 1.7 abaixo). Esse controle apresenta grande complexidade, com possíveis circuitos biológicos intratímicos, envolvendo produção desses mediadores e modulação celular de forma autócrina e/ou parácrina (12,34).

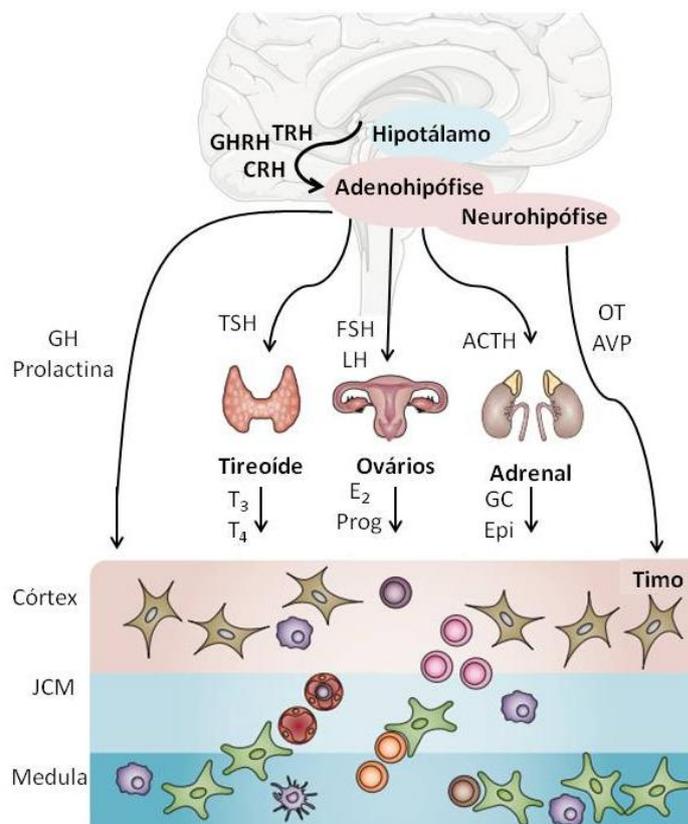


Figura 1.7: Diagrama esquemático de interações imuno-neuro-endócrinas e sua influência no timo. O timo pode ser influenciado por hormônios peptídicos e não peptídicos. Abreviações: ACTH - hormônio adrenocorticotrófico; AVP - arginina vasopressina; CRH - hormônio liberador de corticotropina; E₂ - estradiol; Epi -epinefrina; GC - glicocorticóide; GH - hormônio do crescimento; GHRH - hormônio liberador de GH; LH - hormônio luteinizante; OT - ocitocina; Prog - progesterona; TR -, hormônio liberador de tireotropina. Adaptado de (SAVINO et al., 2016).

1.2.3. Neurotransmissores

Como discutido anteriormente, as interações neuro-imuno-endócrinas dependem de moléculas comuns entre os sistemas. Neurotransmissores e a inervação de órgãos linfoides

constituem mais uma possível via de interação (39). Células imunes podem responder a sinais neuronais, assim como neurônios podem responder ao estímulo por citocinas e neurotransmissores derivados da imunidade (52). Um exemplo pode ser observado na expressão de receptores para neurotransmissores em leucócitos (53). Foi observada a expressão de receptores para glutamato, dopamina (DA), acetilcolina (ACh), receptores adrenérgicos (ARs – do inglês *adrenergic receptors*) e outros, sugerindo que essas moléculas teriam um papel fisiológico na regulação da resposta imune (53,54). Por outro lado, o SNC pode responder a sinalização via citocinas do sistema imune e também pode produzi-las em condições fisiológicas (39). Citocinas como IL-1 e IL-6 são produzidas por células gliais e neurônios, tendo a capacidade de influenciar plasticidade sináptica agindo como mediadores em interações entre astrócitos e neurônios (39).

Interações neuro-imunes podem ocorrer no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), principalmente pelo sistema nervoso autônomo (SNA), mas também por nervos sensoriais e motores (52). O SNA pode ser dividido em sistema nervoso simpático (SNS), sistema nervoso parassimpático (SNPas) e sistema nervoso entérico (SNE) (52).

Com relação as posições anatômicas, as fibras simpáticas se originam na medula espinhal entre os segmentos T1 e L2 projetando-se para a cadeia simpática e depois para tecidos e órgãos (42,55). Os nervos simpáticos são compostos por neurônios pré e pós ganglionares (42). O corpo celular de neurônios pré-ganglionares simpáticos se localiza no corno intermediolateral da medula, enquanto o pós-ganglionar se origina nos gânglios da cadeia simpática ou nos gânglios simpáticos periféricos (42). Os nervos do SNPas deixam o SNC através dos nervos cranianos e pelos nervos espinhais sacrais. A maioria das fibras nervosas parassimpáticas cursam pelo nervo vago (décimo par de nervos cranianos), portanto por muitas vezes o SNPas é tratado como nervo vago (42). Assim como o observado no SNS, o SNPas possui neurônios pré e pós-ganglionares, com a diferença de que as fibras parassimpáticas passam ininterruptamente até o órgão que será inervado, onde na parede do órgão estarão os neurônios pós ganglionares (42,52). O SNE é inerente à parede do trato gastrointestinal e funciona associado ao SNPas e SNS no controle da digestão (52,55).

A neurotransmissão na fenda sináptica entre neurônios pré e pós-ganglionares e entre neurônios pós-gaglionares e órgãos efetores é mediada quimicamente (42). Os neurotransmissores autônomos dominantes são ACh e noradrenalina (NA) (55). As estruturas moleculares de ACh e NA podem ser observadas abaixo (Figura 1.8)

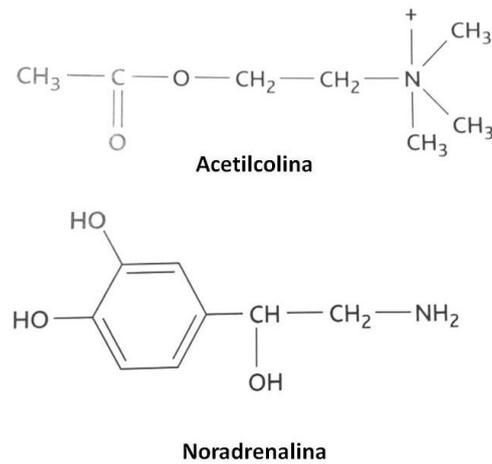


Figura 1.8: estrutura molecular de acetilcolina e noradrenalina. (Obtido de Guyton e Hall 2006).

O SNA participa da regulação homeostática e responde a sinais de estresse agudo ou crônico (42,56). O SNS em especial, tem um papel importante na modulação do sistema imune (56). Fibras simpáticas pós-ganglionares inervam órgãos do sistema imune, por outro lado, ainda faltam evidências que confirmem uma inervação parassimpática direta (54,56). Porém, a sinalização através de nervos aferentes vagais é de extrema importância, uma vez que sinalizam para regiões no SNC que controlam o fluxo de saída simpático para órgãos imunes (57). Para mais, nervos simpáticos pré-ganglionares suprem a medula adrenal, que secreta as catecolaminas NA e adrenalina na circulação, de forma que o SNS possa ter efeito localizado (inervando órgãos imunes) e sistêmico (via circulação) na imunidade (Figura 1.10) (56). Células imunes respondem a sinalização noradrenérgica principalmente via receptores α e β -ARs (42,54,56) (Figura 1.9).

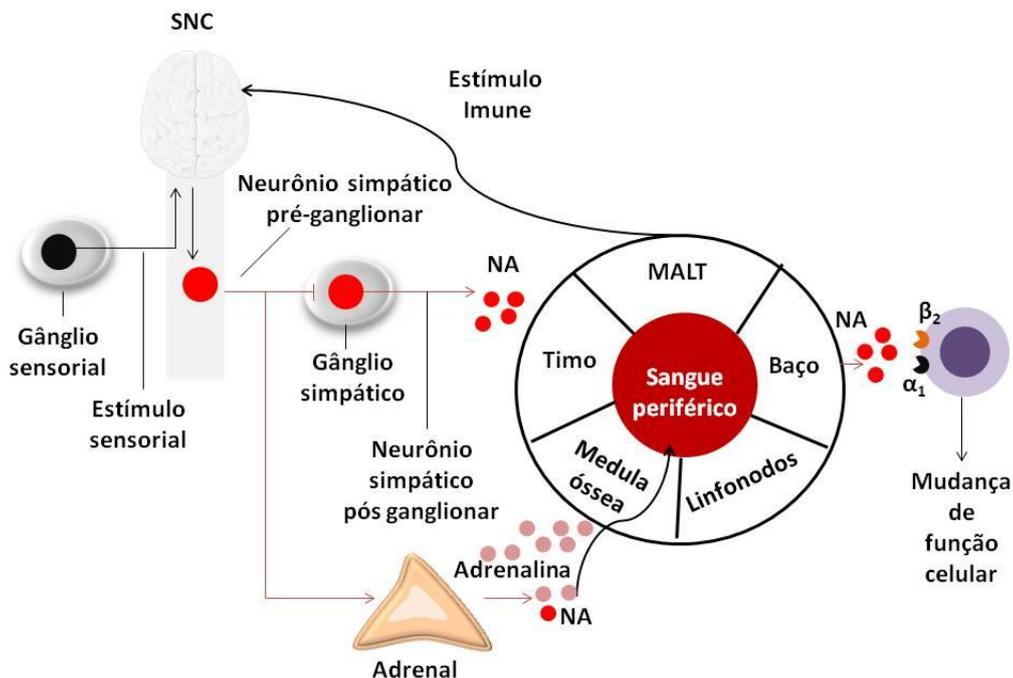


Figura 1.9: Diagrama esquemático do *cross-talk* entre o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema imune. O cérebro responde a informações sensoriais da periferia, incluindo aquelas mediadas por citocinas circulantes e por neurônios sensoriais. Após a chegada das informações por diferentes vias, o sistema vai buscar regulação, alterando o disparo dos neurônios pré-ganglionares regulando o tônus do SNS nos órgãos-alvo, incluindo órgãos linfoides. Os axônios de neurônios simpáticos pré-ganglionares chegam aos neurônios pós-ganglionares e aos células cromafins na medula adrenal. Em seguida, os axônios de neurônios pós-ganglionares chegam aos órgãos e tecidos linfoides liberando noradrenalina (NA). As células cromafins da medula adrenal recebem apenas neurônios simpático pré-ganglionares e liberaram predominantemente adrenalina e em menor grau NA na circulação (liberação hormonal). Essas catecolaminas interagem com receptores adrenérgicos (ARs) expressos em células imunes, conseqüentemente ativando vias de sinalização que podem alterar funções celulares. As células imunes expressam predominantemente β_2 -ARs (laranja) e de α_1 -AR (preto). MALT: tecido linfóide associado a mucosa (do inglês mucosa-associated lymphoid tissue – MALT). Adaptado de (BELLINGER; LORTON, 2014).

A síntese de ACh é classicamente descrita nas terminações nervosas. Brevemente, colina disponível no plasma é transportada do espaço extracelular via transportador de colina dependente de sódio (Na^+) (55). Esta síntese depende de apenas uma reação enzimática, na qual colina acetil transferase (ChAT) cataliza a acetilação de colina com acetil coenzima a (Acetil-CoA) (42,55). A ACh sintetizada é então transportada do citosol para vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de ACh (VChT) e armazenada. Para então, ser liberada na fenda sináptica por exocitose, mediada pelo aumento intracelular de cálcio livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (55). Após sua liberação, ACh pode se ligar aos receptores colinérgicos e será hidrolisada rapidamente pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato (55,58).

ACh liberada pode se ligar aos seus receptores, subdivididos em receptores muscarínicos (mAChRs), e nicotínicos (nAChRs) (42,55). Os mAChRs fazem parte do grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e podem ser subdivididos em 5 subtipos, classificados em M1-M5 (41,58). Apesar de todos serem GPCRs o tipo de proteína G acoplada varia entre os receptores. M1, M3 e M5 são acoplados a proteína Gq, que leva a ativação de fosfolipase C, a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 – trifosfato (IP_3), aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação da proteína cinase C (PKC) (55). Enquanto os receptores M2 e M4 são acoplados a proteína G_i também chamada de inibitória, pois inibe adenilato ciclase e induz redução nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (55). A outra classe de receptores colinérgicos são os nAChRs, que fazem parte do grupo de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ (55). A estrutura de nAChRs é formada por 5 subunidades diferentes de receptores α , β , γ , δ , e ϵ que formam um pentâmero, na qual nessa conformação sempre há uma cópia da subunidade α (55). Dentro do grupo de nAChRs ainda é possível observar outra subdivisão baseada em sua posição anatômica mais comum (55). No músculo esquelético, os receptores contém 4 subunidades distintas no complexo pentamérico ($\alpha 1$) $2\beta 1\gamma\delta$ durante o desenvolvimento embrionário ou ($\alpha 1$) $2\beta 1\epsilon\delta$ na vida adulta, enquanto que no

SNC são observados pentâmeros formados por unidades α e/ou β , que incluem as unidades $\alpha 2-7$ e $\beta 2-4$. Contudo, as subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ podem formar homo-oligômeros formados por apenas um tipo de subunidade (55,59,60).

A literatura aponta que vários componentes do sistema colinérgico (ACh, ChAt, mAChRs e nAChRs) podem ser expressos em tecidos e órgãos não-neuronais, incluindo células T, epitélio de mucosas, células epiteliais do sistema gastrointestinal, respiratório e urogenital, células endoteliais e em células do timo (58,59). Sua ampla distribuição entre diferentes órgãos e tecidos sugere que ACh é uma molécula de sinalização capaz de regular diversas funções celulares (59). Rinner e colaboradores (1998) identificaram a presença de ACh em células T do timo, do baço e do sangue periférico de ratos Sprague-Dawley através de determinação imunorradiométrica (61). Os autores também reportaram que células SP CD4 esplênicas apresentam maiores níveis de ACh quando comparadas à células SP CD8 (61). Esses dados indicam que células imunes podem sintetizar ACh (61). Ademais, foi detectada a presença de ACh em células T humanas de linhagem (62).

Além de ACh, outros componentes colinérgicos foram detectados em células imunes. Kawashima e colaboradores (2007) demonstraram que células mononucleares (MNLs), DCs e macrófagos de camundongos C57BL/6 expressam RNA mensageiro (RNAm) para todos os 5 tipos de mAChRs e para as subunidades de nAChRs $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 10$ e $\beta 2$ (63). Além disso os autores reportaram também a expressão de AChE nos mesmos conjuntos celulares testados anteriormente e a expressão de ChAT em MNLs e DCs após o estímulo com concanavalina A (ConA) e lipopolissacarídeo (LPS) (63). Esses dados indicam que células imunes podem sintetizar ACh e responder ao estímulo colinérgico através de mAChRs e nAChRs (63). Semelhante com o observado para MNLs e DCs, foi observado que a ativação de células T leva ao aumento na expressão de RNAm para ChAT além de aumentar os níveis intracelulares de ACh (64). O mesmo parece ocorrer para células B, uma vez que sua ativação por LPS aumenta a produção de ACh em células B foliculares esplênicas de camundongos (64). Em conjunto, esses dados sugerem que ACh pode modular a resposta imune via ativação celular e síntese de ACh por células imunes (64,65).

Receptores muscarínicos estão envolvidos na regulação da imunidade via influxo de cálcio intracelular (64,65). Agonistas não seletivos de mAChR, como ACh e oxotremorina (Oxo-M) induzem um aumento de cálcio intracelular, seguida de oscilações nos níveis em linhagens humanas de células T e B (CEM e Daudi) e aumento na expressão do fator de transição c-fos (66). Esses efeitos são dependentes de mAChRs, uma vez que foram revertidos após o tratamento com atropina, um agonista não seletivo de mAChRs (66). Esses dados indicam que ativação de mAChRs desencadeia sinalização nuclear, provavelmente levando a alterações celulares (65,66).

Além disso, a apresentação de antígenos entre células TCD4⁺ e células apresentadora de antígeno induz um aumento tanto do RNAm de ChAT quanto da sua atividade, aumentando também a concentração de ACh, AChE e do mAChR M5 (64). Por outro lado, a ativação do receptor nicotínico $\alpha 7$ diminui a síntese e liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α) em macrófagos ativado com LPS, sugerindo que o receptor $\alpha 7$ seria essencial no controle da inflamação (67). De acordo com esses dados, foi observado que em camundongos *knockout* para $\alpha 7$, há um aumento na liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-6) por células esplênicas após a ativação com ovoalbumina (OVA), quando comparadas com os controles *wild type* (WT) (68). Sugerindo que $\alpha 7$ nAChRs estão de fato envolvidos na regulação de citocinas pró-inflamatórias (64,67,68).

A partir dessas informações, é possível concluir que o sistema colinérgico pode modular o sistema imune (64,65,66). Porém, essa regulação parece ocorrer de forma autócrina/parácrina, uma vez que não existem evidências concretas que suportem a hipótese de uma inervação colinérgica direta (56). No começo dos anos 2000, Tracey e colaboradores cunharam o termo “reflexo anti-inflamatório colinérgico”, baseado em trabalhos do grupo e na literatura onde propuseram que o estímulo colinérgico vagal seria capaz de controlar a inflamação via supressão da produção de citocinas inflamatórias. Essa supressão seria modulada pela ativação do nAChR $\alpha 7$ (57,67,69). Esse reflexo anti-inflamatório, seria definido de forma que o braço aferente corresponderia às citocinas inflamatórias secretadas por células ativadas da imunidade inata e em resposta, o braço eferente seria ativação colinérgica que agiria induzindo a supressão de citocinas (57). O baço foi então proposto como órgão alvo da inervação vagal, uma vez que foi demonstrado que a estímulo do nervo vago deixou de ser capaz de inibir a produção de TNF- α em animais que sofreram esplenectomia durante endotoxemia letal (57,70). Contudo, o nervo esplênico compreende fibras simpáticas, sugerindo um *input* adrenérgico ao invés de colinérgico na supressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos esplênicos (52,57). Em decorrência desse fato, uma nova teoria foi proposta, que nervos eferentes vagais inervariam neurônios pós-ganglionares simpáticos que chegam até o baço (56,71) (Figura 1.10).

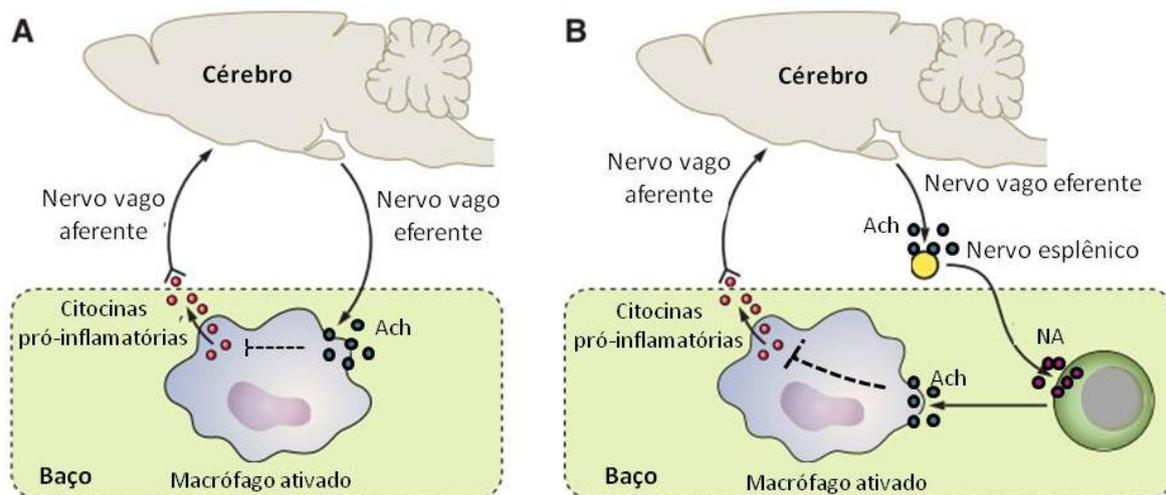


Figura 1.10: Representação esquemática do reflexo anti-inflamatório. A) Modelo inicial do reflexo colinérgico anti-inflamatório proposto por Kevin Tracey. Citocinas pró-inflamatórias (círculos vermelhos) liberadas por células da imunidade inata ativam nervos vagos aferentes. Essa ativação é feita de maneira reflexa nos corpos celulares de nervos vagos eferentes, que uma vez ativados suprimem a inflamação através do estímulo colinérgico por acetilcolina (Ach) (círculos azuis). B) Modelo revisado após falta de evidências anatômicas para comprovar o modelo proposto inicialmente. O ramo parassimpático (vagal) ativa os nervos simpáticos esplênicos, induzindo a liberação de noradrenalina (NA) (círculos roxos). Essa ativação resulta no recrutamento de células T produtoras de ACh modulando a inflamação. Adaptado de (DANTZER, 2018).

Bratton e colaboradores (2012) investigaram a possibilidade de interação entre nervo vago pré-ganglionar e nervos simpáticos pós-ganglionares através de métodos de rastreamento em ratos Sprague-Dawley, porém não foi observada uma conexão anatômica (72). Além disso, os experimentos eletrofisiológicos não apresentaram efeito da estimulação vagal sobre a atividade do nervo esplênico, possibilitando a conclusão de que neurônios eferentes vagais do rato não fazem sinapse com os neurônios simpáticos esplênicos (56,72). Vida e colaboradores (2011a) demonstraram que o estímulo do nervo esplênico era capaz de induzir a diminuição plasmática nos níveis de TNF- α induzido por LPS em animais *knockout* para a subunidade $\alpha 7$, mimetizando o efeito observado em animais WT após o estímulo do nervo vago (73). Sugerindo que a presença de $\alpha 7$ e o estímulo do nervo vago não são um requerimento para o potencial anti-inflamatório (56,73). Além disso, o grupo descreveu também que os efeitos anti-inflamatórios mediados por NA os efeitos anti-inflamatórios mediados por NA seriam dependentes de $\beta 2$ -AR, uma vez que não foi possível observar uma diminuição de TNF após o estímulo com LPS em células de animais *knockout* para $\beta 2$ (74). Esses dados, demonstram a importância de aferentes vagais e eferentes simpáticos esplênicos na regulação da imunidade (73,74). Entretanto não existem evidências anatômicas que comprovem um link direto entre efeitos anti-inflamatórios resultantes do estímulo vagal, o SNS e o baço (56).

O principal neurotransmissor liberado por nervos simpático é a NA (54,56). A síntese de NA é classicamente descrita no SNC e é impossível descrever sua síntese isolando-a das outras catecolaminas, adrenalina e DA (55). Tirosina é transportada para o citoplasma por transportadores específicos e uma vez no citoplasma, sofre hidroxilação pela enzima tirosina hidroxilase (TH), sendo convertida para 3,4-di-hidroxi-l-fenilalanina (DOPA), esse processo é considerado uma etapa limitante na síntese de catecolaminas (42,55). DOPA é então convertida à DA por um processo de descarboxilação (42,55). DA é então transportada para vesículas sinápticas onde é então convertida em NA pela enzima dopamina β -hidroxilase (DBH) (42,55). Células cromafins na medula adrenal e neurônios no tronco cerebral contém a enzima citoplasmática feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), que converte NA em adrenalina (Figura 1.11) (55).

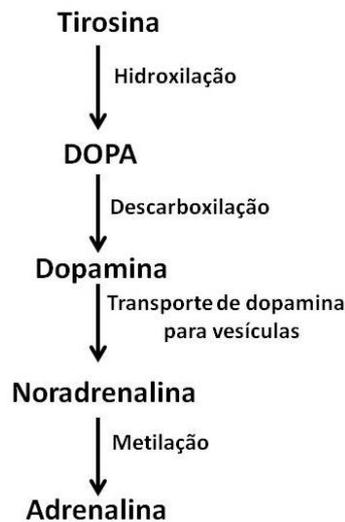


Figura 1.11: Esquema mostrando a biossíntese de noradrenalina e adrenalina. (Adaptado de Guyton e Hall 2006).

Em resposta ao potencial de ação que chega à terminações nervosas, há um influxo de Ca^{2+} que induz a fusão de vesículas a membrana e conseqüentemente a liberação de NA e outras catecolaminas, juntamente de ATP, neuropeptídeo Y e outros peptídeos (55,57,75). Uma vez liberada, NA pode interagir com seus receptores, classificados em α e β - AR (adrenoceptores), que são GPCRs (55). Esse receptores podem ainda ser subdivididos em 9 subtipos: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e β_1 , β_2 , β_3 que podem variar em termos do tipo da proteína G ativada após a ligação de um agonista, como por exemplo receptores α_1 são acoplado a proteína Gq enquanto α_2 a proteína G_i inibitória (55). Os receptores β são acoplados a proteína Gs que leva a ativação da adenilato ciclase e aumento dos níveis intracelulares de AMPc (55).

Fibras nervosas noradrenérgicas inervam a vasculatura e o parênquima de órgãos linfoides primários e secundários, incluindo medula óssea, timo, baço, linfonodos (LNs) e tecidos linfóides associados à mucosas (MALT) (56). Apesar de NA ser o principal neurotransmissor

envolvido na regulação da imunidade, fibras noradrenérgicas contêm diversos neuropeptídeos, incluindo peptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y, substância P, Met-enkefalina e neurotensina, que podem não apresentar co-localização com a NA (56,57). Fibras nervosas simpáticas estão posicionadas em proximidade com diversas células imunes, incluindo células T e B, DCs, eosinófilos, mastócitos (MCs), tímócitos, TECs, células tronco hematopoiéticas, entre outras, formando as chamadas “junções neuroefetoras” (56,57). Junções neuroefetoras são caracterizadas por nervos varicosos que liberam neurotransmissores. Esses terminais são chamados de “*boutons en passage*” ou “*boutons*” passantes, liberando neurotransmissores e neuropeptídeos que se ligam a receptores específicos expressos em células alvos (56) (Figura 1.12).

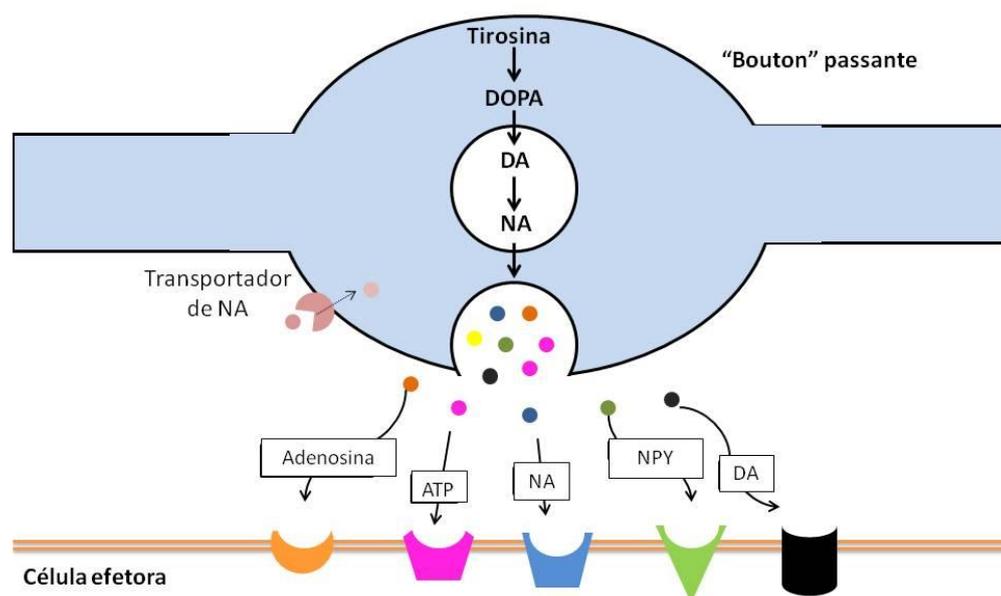


Figura 1.12: Diagrama esquemático de “bouton” passante simpático e sua interação com uma célula alvo efetora. NA é sintetizada a partir do precursor tirosina. A tirosina é convertida em L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). L-DOPA é descarboxilado por L-DOPA descarboxilase para formar dopamina (DA). A DA entra na vesícula sináptica onde é hidroxilado pela dopamina-hidroxilase (DBH) para formar NA. O NA colocaliza-se com muitos outros neuromediadores / neuromoduladores, incluindo DA (círculos pretos), neuropeptídeo Y (NPY, círculos verdes), ADP e ATP (círculos cor de rosa) e adenosina (círculos laranja). Na junção neuroefetora esses mediadores, em conjunto com NA, são liberados dos boutons estimulados. Eles são difundidos através do espaço extracelular e se ligam a receptores específicos (codificados por cores para combinar com o neurotransmissor) expressos na superfície celular das células alvo. A ligação do receptor afeta os canais iônicos e/ou ativa cascatas de sinalização intracelular para alterar as funções celulares nas células alvo. Adaptado de Bellinger, Nance & Lorton 2014.

Devido às características da transmissão, não existem barreiras físicas, portanto a NA liberada é difundida pelo parênquima estabelecendo um gradiente de concentração a partir do local de liberação (54,56). Essa liberação parácrina sugere a possibilidade de padrões geograficamente específicos de ativação que pode ser relevante em termos funcionais, uma vez que os efeitos das

catecolaminas podem ser determinados pela concentração de NA disponível no local, por exemplo, excitatório em baixas concentrações e inibitório em concentrações elevadas (56,76).

Como discutido anteriormente, β_2 -ARs são os receptores adrenérgicos mais comumente expressos em células imunes (76). A ativação de β_2 -ARs pode modular diversos efeitos dependendo da célula imune ativada. Foi descrito que o estímulo do receptor β_2 induz a secreção de IFN- γ e a diferenciação de células T CD4 *naive* em células T efetoras com perfil Th1 (do inglês - *T cell helper 1*) (56,77). Por outro lado, adicionar agonistas de β_2 -AR às células que já apresentam um perfil Th1, induz a supressão de IFN- γ (56). Células da imunidade inata também expressam α e β -ARs e apresentam padrões de resposta geralmente opostos, ou seja, a ativação de α_1 é oposta aquela de β_2 (56,57). De maneira geral, a ativação de β_2 leva a supressão de citocinas pró-inflamatórias enquanto a ativação de α_1 ou α_2 leva a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (56,57). Portanto, um equilíbrio na ativação entre receptores adrenérgicos pode explicar os efeitos diferenciais da ativação simpática em funções imunes (57).

1.3. Inervação de órgãos linfoides

Como descrito anteriormente, a inervação de órgãos linfoides por fibras do SNA pode modular a resposta imune. Todos os órgãos e estruturas linfoides secundários (baço, linfonodos, tecidos linfoides associados às mucosas) e primários (medula óssea e timo) recebem inervação simpática (56). Geralmente, as fibras nervosas chegam até os órgãos imunes alvos através da vasculatura e se associam ao tecido conectivo (52,55).

1.3.1. Inervação do timo

A presença de catecolaminas no timo de mamíferos foi descrita pela primeira vez em 1974. Foram localizadas catecolaminas no timo de gatos e camundongos, majoritariamente em fibras nervosas acompanhando vasos sanguíneos e inervando diretamente o parênquima (52,56). As fibras noradrenérgicas penetram o timo pela cápsula e por septos interlobulares na forma de plexos nervosos densos (54). As fibras noradrenérgicas são predominantemente encontradas no córtex, com uma densidade um pouco maior perto da junção corticomedular, uma região essencial tanto para a entrada de células progenitoras como para a saída de células T maduras (54). Fibras simpáticas também são encontradas adjacentes à TEC no córtex e mais raramente na medula (54,56). A posição das fibras nervosas sugere um importante papel na modulação de diversos processos chave na diferenciação de timócitos, como entrada de células progenitoras, proliferação e maturação de timócitos, rearranjo de TCR e seleção positiva e negativa (56). Apesar desses dados, foi demonstrado que camundongos deficientes de DBH, a enzima que converte DA em NA, não apresentam defeitos intrínsecos no desenvolvimento da imunidade (78), por outro lado, esses camundongos *knockout* para DBH (DBH^{-/-}) mantidos em condições normais de biotério

apresentaram altos índices de mortalidade, sugerindo que a neurotransmissão simpática prejudicada pode levar a uma resposta imune ineficaz (78).

A liberação de NA no timo é modulada por receptores pré-sinápticos. Os terminais axonais noradrenérgicos do timo expressam os receptores pré-sinápticos adrenérgicos α_2 , mAChRs e nAChRs, receptores purinérgicos e receptores para prostoglandina (79). Através desses receptores, NA oriunda do SNC pode ser modulada por ligantes endógenos. Como demonstrado por Haskó e colaboradores (1995), o uso de um antagonista específico para α_2 -AR, induziu um aumento na liberação de NA no timo da ratos, sugerindo que sua liberação no timo está sob controle inibitório tônico exercido pela NA liberada endogenamente (79).

Como discutido em outras seções, células T maduras podem sintetizar catecolaminas. Lepasavić e colaboradores (2007) demonstraram que timócitos também parecem ter essa capacidade, uma vez que expressam a enzima TH. Além disso, foram detectados níveis de NA em timócitos, cerca de $15 \text{ pg}/10^6$ células de ratos machos adultos e níveis tímicos de NA, cerca de $20 \text{ ng}/\text{por grama de tecido tímico}$ (80). Ademais, os níveis de catecolaminas em timócitos são diferentes entre ratos machos e fêmeas. Foi observado que a densidade de células sintetizadoras de catecolaminas foi maior nos ratos machos do que nas fêmeas, isso pode ser observado nos níveis de NA e DA e também na expressão de TH, sugerindo que hormônios sexuais podem influenciar na concentração de NA em timócitos (81). Consistente com esses dados, Lepasavić e colaboradores (2007) também demonstraram que a castração no período pós-natal inicial diminui os níveis de NA derivada do *input* neuronal e sintetizada por timócitos em ratos adultos, diminuindo ainda o ajuste fino mediado por β -AR na diferenciação/maturação das células T (80). Ademais, níveis detectáveis de NA foram observados em outros modelos, como células de linhagens e hibridomas, apesar de menores do que os observados em células isoladas de animais, sugerindo que de fato pode haver síntese de catecolaminas (82). Além disso, foi observada co-localização na marcação de TH e citoqueratina, sugerindo que TECs também podem expressar essa enzima (82). Um fenômeno semelhante foi observado em células CD68^+ , macrófagos, no córtex e na JCM tímica, sugerindo que catecolaminas também podem ser sintetizadas por macrófagos tímicos (82) (figura 1.13).

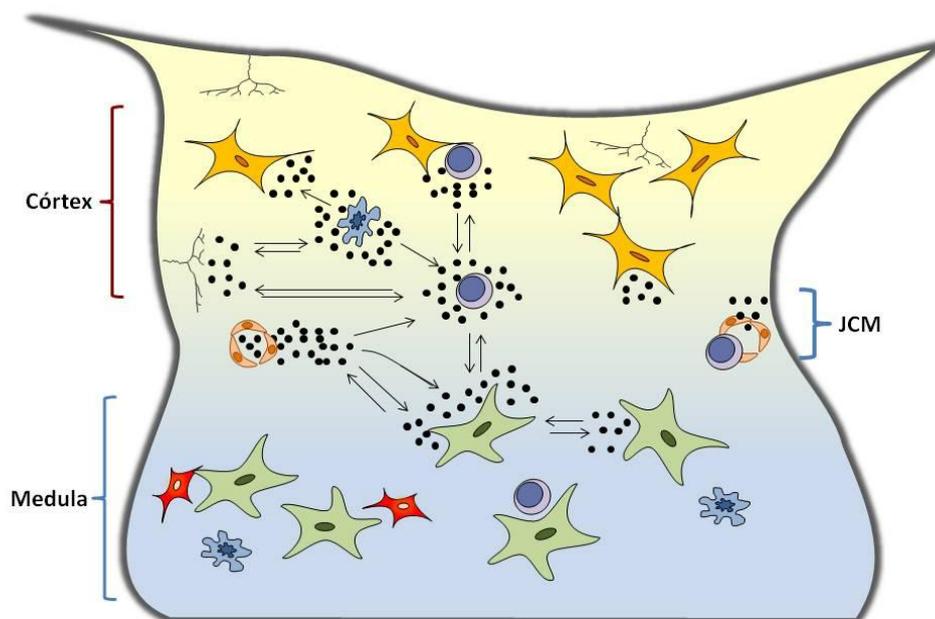


Figura 1.13: Vias catecolaminérgicas no timo. Diagrama esquemático mostrando as duas vias catecolaminérgicas presentes no timo, que constituem a liberação de NA (círculos pretos) por fibras nervosas simpáticas e a produção de catecolaminas por células linfóides e não linfóides. As fibras noradrenérgicas pós-ganglionares entram no timo juntamente com os vasos sanguíneos na JCM ou penetram diretamente na cápsula. Essas fibras formam plexos ricos em varicosidades, na cápsula e nos septos, bem como nos subcompartimentos subcapsular e na região cortico-medular. Fibras individuais raras dos plexos subcapsular e cortico-medular ramificam-se e se estendem para o parênquima cortical e medular, terminando nas proximidades das células linfóides e não-linfóides do timo e formando uma rede nervosa catecolaminérgica tímica. As catecolaminas influenciam a timopoiese, podendo atuar diretamente sobre os timócitos ou indiretamente sobre outras células do microambiente tímico, como TECs e macrófagos que expressem receptores α e β adrenérgicos. Células amarelas: TECs corticais; Células verdes: TECs medulares; Células roxas: timócitos; Células azuis: macrófagos; Células vermelhas: DCs. Adaptado de (LEPOSAVIĆ et al., 2008; SAVINO et al., 2015).

Uma vez liberada, NA vai interagir com receptores adrenérgicos expressos em células no timo (52). Singh e Owen (1976) demonstraram através do método de radioimunoensaio a presença de sítios de ligação de β -AR em timócitos de camundongos adultos e no timo fetal (83). Ademais, observaram também uma diferença nos níveis de AMPc de timócitos fetais e adultos após a estimulação com isoproterenol (agonista de β -AR), onde timócitos fetais apresentaram um aumento de AMPc de maior magnitude do que o observado em células de camundongos adultos, indicando que receptores β -AR podem estar relacionados com a maturação celular (83). Além disso, foi detectada a presença majoritária de β_2 em células tímicas de ratos e uma presença menor de β_1 (84). É importante ressaltar que a expressão de β -AR parece variar conforme a maturação celular, foi demonstrado que em camundongos, timócitos imaturos expressam um número menor de β -AR do que timócitos maduros (85). Além disso, Marchetti e colaboradores (1994) demonstraram que a expressão de β_2 no timo é controlada também por hormônios sexuais (84). Foi

observado um aumento de β_2 durante o proestro (fase que antecede o estro, caracterizada pela presença de células epiteliais no esfregaço vaginal), durante a gravidez e uma diminuição em animais que sofreram ovariectomia, indicando que hormônios sexuais modulam a expressão de β_2 no timo (84). Foi relatada a presença majoritária de β_2 na medula tímica de ratos (84) mas também uma presença de células imunorreativas para β_2 -AR, principalmente no córtex tímico de rato, nas regiões subcapsular/subtrabecular e na junção cortico-medular (82), sendo necessária maior investigação e aplicação de diferentes técnicas para que seja confirmada sua localização no timo. Com relação à expressão de β -AR em TECs, Kurz e colaboradores (1997) demonstraram que TECs de ratos Wistar em cultura expressam β -AR funcionais, mais especificamente, β_1 e β_2 -AR (86). Consistente com esses dados, foi demonstrado também por imunocitoquímica a presença de β_2 em TECs de ratos, mais especificamente localizadas na JCM (82).

Receptores α -AR também são expressos no timo (54,82). Os três subtipos de α_1 -AR, α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , foram observados no timo humano (87), porém não é observada a expressão de α_1 -AR em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), sugerindo que a expressão desses receptores é regulada durante o desenvolvimento de células T (54,82,87). Pešić e colaboradores (2009) demonstraram a presença de α_1 -AR no córtex tímico timo de ratos Wistar machos (88). Os autores descrevem ainda, que a maioria das células apresentavam um fenótipo de célula não linfóide, confirmado como TEC pela dupla marcação com pan-citoqueratina, presentes principalmente no córtex subcapsular/subtrabecular e na JCM (88). Através da análise citofluorométrica, foi detectada a expressão de α_1 -AR em timócitos de diferentes subpopulações principalmente em timócitos com o fenótipo $CD3^-$ e em células maduras, $CD3^{low}$ e $CD3^{high}$ (88). Por fim, evidências farmacológicas indicam a presença de α_2 -AR em timócitos de ratos (54).

Com relação aos efeitos do estímulo de ARs em timócitos, pode-se observar que timócitos obtidos de ratos tratados com bloqueador de β_2 apresentaram aumento na sensibilidade à apoptose em cultura quando comparadas ao controle (89). Além disso, estudos mostraram que adrenalina e NA inibem a proliferação induzida por ConA de timócitos murinos *in vivo* (82). Ademais, Del Rey e colaboradores (2003) demonstraram que NA induz a apoptose de timócitos de camundongo *in vitro* e esse efeito é mediado por β_2 (90). O estímulo do receptor β_2 parece influenciar negativamente a seleção positiva e negativa (56,82). A ativação da via β_2 -AR-AMPC-PKA induz a supressão da expressão de CD90 (Thy-1) (56). Consistente com esses resultados, o bloqueio de longo prazo do receptor β_2 pela administração de propranolol induz aumento na expressão de Thy-1 e alterações nos subsets de timócitos (52,89). A molécula Thy-1 é expressa na superfície de timócitos imaturos (DP) e parece exercer um papel importante na regulação do TCR, uma vez que timócitos de camundongos *knockout* para Thy-1 ($Thy-1^{-/-}$) demonstraram alterações

nos processos de maturação, especialmente de células de DP para SP, devido a seleção negativa prejudicada, indicando que Thy-1 regula TCR negativamente (91).

Os efeitos observados pelo estímulo de β_2 podem ser também efeitos indiretos, uma vez que TECs também expressam esses receptores (54,56). A ativação de TECs com LPS somada ao estímulo com agonistas do receptor β -AR induziu um aumento na liberação de TNF- α e IL-6, sugerindo um efeito sinérgico na liberação de citocinas (92) (figura 1.14). Os efeitos mediados por α -AR afetam principalmente o rearranjo do TCR β , aumentando a frequência de células DP TCR $\alpha\beta$ sem afetar a frequência de células DN TCR $\bar{}$. Na medula, estímulo de α -AR aumenta a porcentagem de timócitos SP CD8, diminui SP CD4 e Treg (56). Leposavić e colaboradores (2010) demonstraram que a administração do bloqueador de α_1 por longo prazo em ratos induz alterações nas subpopulações de timócitos. O tratamento com urapidil (antagonista de α_1) aumentou a frequência de células DP e SP CD4 e diminui a porcentagem de células CD8 (93). Além disso, a ativação de α -AR suprime a proliferação de timócitos (56).

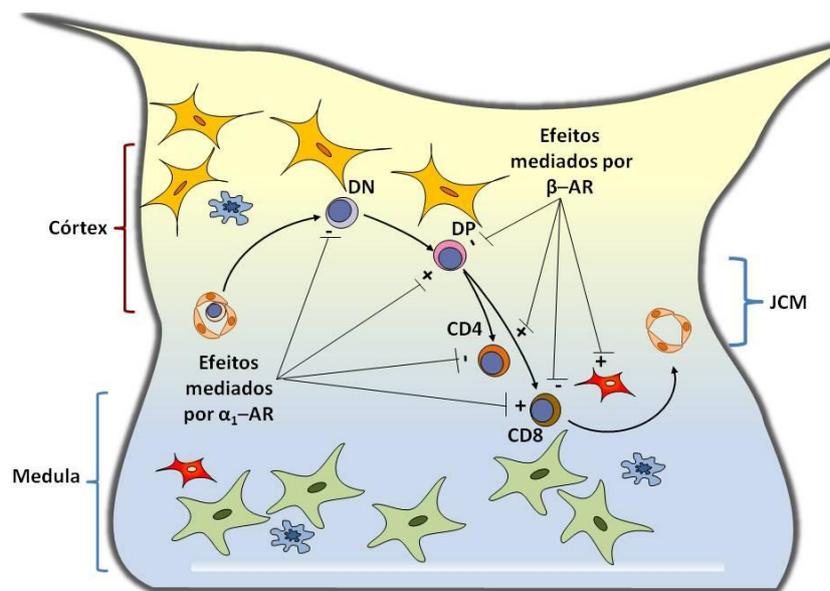


Figura 1.14: Influência de receptores α e β -AR nos estágios de diferenciação de timócitos de ratos. A ativação de α_1 -AR reduz o número de células DN e aumentam o de células DP. É possível que a sinalização via β -AR possa modular os processos de seleção, reduzindo a seleção positiva e/ou aumentando a negativa, e detenha a diferenciação de timócitos DP em SP. Células amarelas: TECs corticais; Células verdes: TECs medulares; Células roxas: timócitos; Células azuis: macrófagos; Células vermelhas: DCs. Redução = - e aumento = + Adaptado de (LEPOSAVIĆ et al., 2008; SAVINO et al., 2015)

Com relação ao SNPs, dados que confirmem uma inervação colinérgica são um ponto de controvérsia na literatura. Inicialmente, a inervação parassimpática foi descrita como fibras nervosas que chegavam até o timo através da vasculatura, como o descrito para as fibras simpáticas. Essas fibras foram marcadas como AChE $^+$ e ChAT $^+$ determinando a presença da inervação colinérgica (94). Trabalhos posteriores identificaram que a presença de fibras AChE $^+$

eram, na verdade, associadas a fibras simpáticas, uma vez que o corte do nervo vago cervical não alterou a presença de fibras AChE⁺ no timo (95,96). A transmissão neuronal no timo não acontece por meio de sinapses, mas sim pela liberação de neurotransmissores por fibras nervosas que chegam pela vasculatura (76, 96). ACh é uma molécula altamente instável e suscetível a hidrólise por AChE, portanto parece pouco provável que ACh liberada por terminações nervosas colinérgicas consiga interagir com receptores colinérgicos expressos em células tímicas (58). Mais estudos sobre a inervação colinérgica tímica precisam ser realizados, porém mesmo sem uma inervação direta células tímicas são capazes de sintetizar ACh e expressam diversos componentes do sistema colinérgico, sugerindo a presença de um sistema colinérgico não-neuronal (58,59).

ACh é sintetizada por células no timo (97). Panneck e colaboradores (2014) observaram que a expressão de ChAT parece ser exclusiva em TECs, uma vez que não houve co-localização de marcação para células CD3⁺ no timo de camundongos (98). Essas TECs são majoritariamente localizadas na medula e apresentam características específicas, denominadas células quimiosensoriais, que expressam, além de marcadores epiteliais, proteínas tipicamente encontradas em células gustativas (98).

Timócitos e células não-linfoides expressam diversos receptores muscarínicos e nicotínicos (58). Mihovilovic e colaboradores (2001) descreveram que TECs da linhagem humana TE750 expressam genes para as subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 4$ e que o estímulo dessas células por agonistas de receptores nicotínicos leva a diminuição da aderência celular e diminuição de expansão da cultura (99). Todos os timócitos humanos expressam as subunidades de receptores nicotínicos chamados neuronais $\alpha 2$ – $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$. Além disso, as subunidades consideradas musculares $\alpha 1$, $\beta 1$ e ϵ foram observadas em TECs (100). Com relação aos mAChRs, diversos estudos realizados através do método de radioimunoensaio apontaram para a capacidade de radioligantes específicos para mAChRs se ligarem a timócitos, sugerindo que esses receptores seriam essenciais na saída de timócitos do timo (59). Rinner e colaboradores (1999) demonstraram que a administração de atropina em ratos Sprague-Dawley por 7 dias induziu um aumento na porcentagem de células apoptóticas no timo (97). Os autores relataram também que o estímulo de timócitos com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) levou a um aumento na secreção de ACh no sobrenadante de cultura primárias de timócitos (97). Além disso, foi observado que o tratamento de timócitos com ACh não induziu a morte celular, porém quando essas células foram co-cultivas com linhagens murinas de TECs, pôde-se observar um efeito pró-apoptótico e esse efeito parece ser mediado por receptores nicotínicos em TECs (97).

Apesar dos dados sobre os possíveis papéis desempenhados por neurotransmissores na modulação da resposta imune e desenvolvimento das células T, ainda há muito a ser discutido. Tendo em vista a influência da estimulação de receptores adrenérgicos na diferenciação de células

T, nos parece possível que NA e seus receptores possam influenciar em outros aspectos da diferenciação. Foi demonstrado que NA pode exercer uma atividade quimiotática e quimiocinética em DC imaturas através do receptor α_1 , influenciando a saída dessas células para a linfa (101). Timócitos imaturos também expressam α_1 -AR e sua estimulação promove alterações na diferenciação celular, portanto é possível hipotetizar que NA também poderia modular a migração de timócitos no timo (82). Além da migração, dados avaliando o efeito de NA na adesão de timócitos à TECs são altamente escassos e tendo em vista os diferentes efeitos de NA no timo, o fato de que TECs e timócitos podem sintetizar NA e expressam os mesmos receptores (82) é possível hipotetizar também que NA poderia influenciar na interação célula-célula intratímica.

Com relação aos efeitos de ACh, muitos trabalhos descrevem o efeito colinérgico no sistema imune, principalmente pela ativação de α_7 -nAChR e seu papel na modulação da inflamação (64,65). Porém os efeitos de ACh no timo ainda são pouco discutidos, apesar da descrição da presença de mAChRs e nAChRs. Rinner e colaboradores (1999) descrevem que ACh pode ser uma molécula chave na interação entre TECs e timócitos (97), além disso outros trabalhos apontam para o papel de ACh na saída de timócitos do timo (99). Portanto, é possível que ACh possa modular a diferenciação de células T no timo, porém mais dados avaliando parâmetros de morte, proliferação, migração e adesão de timócitos à TECs precisam ser gerados para responder a essa hipótese. Assim, o desenvolvimento de um projeto que avalie a ação de neurotransmissores sobre o timo pode fornecer novos dados relevantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o papel funcional de análogos à ACh e NA sobre os componentes linfóide e microambiental do timo, além de as interações entre células epiteliais e timócitos.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão intratímica dos receptores dos neurotransmissores noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh) em diferentes populações celulares, incluindo subpopulações de timócitos e diferentes linhagens de células epiteliais tímicas;
- Determinar possíveis modificações de células epiteliais tímicas (TECs) e timócitos após o tratamento com NA e ACh no que diz respeito à proliferação, morte e migração celular;
- Determinar os efeitos de NA e ACh sobre as interações Timócitos/TECs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas 7-12 semanas, provenientes do ICTB (Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos) da Fiocruz. Os procedimentos com camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz, licença número L-46/15.

3.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas nesse estudo as linhagens de células epiteliais tímicas de camundongos 2BH4, 1.4C18 e 310 que correspondem a células epiteliais tímicas mistas, corticais e medulares, respectivamente, obtidas de células primárias de camundongos C57BL/6 (102,103,104). Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), pH7-7,5, suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. As culturas foram mantidas por um período máximo de um mês.

3.3. Drogas Análogas à acetilcolina e à noradrenalina

Para esse estudo escolhemos utilizar drogas análogas aos neurotransmissores NA e a ACh. São elas arterenol ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt, Sigma-Aldrich) e carbacol (Carbamoylcholine chloride, Sigma-Aldrich), respectivamente. Ambas as drogas foram diluídas em água destilada em uma concentração inicial de 25 mM (Carbacol) e 20 mM (Arterenol). Carbacol foi gentilmente cedido pela professora Doutora Elizabeth Giestal do Departamento de Neurobiologia, Universidade Federal Fluminense (UFF).

3.4. Isolamento de subpopulações de tímócitos

Para separação de tímócitos totais em subpopulações de células DN, DP, SP CD4 e SP CD8 foi realizado um *pool* de tímócitos de 4 timos. Os timos foram extraídos e macerados em RPMI/10% SFB com o auxílio de um *potter*. As células foram separadas através da utilização de um *voil* de tecido; sendo então marcadas com anticorpos específicos para as moléculas CD4 (eBioscience; diluição 1:100) e CD8 (BD; diluição 1:50) por 30 minutos a 4 °C, seguido de separação celular em um citômetro FACS Aria (BD). Foram separados 1x10⁶ células para os controles de citometria. Após a separação, foram realizados os experimentos de extração de RNA e RT-PCR como descrito abaixo.

3.5. RT-PCR quantitativa

Para avaliar a presença de RNA mensageiro dos receptores adrenérgicos β_2 (Adrb2), α_{1A} (Adra1a), α_{1D} (Adra1d), α_{2C} (Adra2c) e colinérgicos M1 (Chrm1), M3 (Chrm3), M5 (Chrm5) e α_7 (Chrna7), nós realizamos RT-PCR quantitativa. Primeiramente foi feita a extração de RNA mensageiro de amostras de cultivos de TEC (linhagens 2BH4, 1.4C18 e 3.10). Para tal, as células foram mantidas como previamente descrito, cultivadas em frascos de 75 cm² (Corning) até atingir alta confluência (90-100% de toda a garrafa) ou baixa confluência (<60%). Após esse período os frascos foram retirados da estufa, colocados no gelo, o meio de cultura retirado e foram adicionados 2 mL de trizol. As células foram então retiradas através de um *Cell Scraper* e adicionadas a um tubo eppendorf *RNAse-Free* (1mL por eppendorf).

Para as amostras de timócitos totais, os timos foram retirados e macerados em PBS [1x] com o auxílio de um *potter*. Em seguida, as células foram dispostas em uma placa de petri e colocados na estufa por 1 hora. Após esse período as células não aderentes foram retiradas com o auxílio de um pipetador automático e contadas em câmara de Neubauer, sendo então centrifugadas (1200 rpm/5 minutos), ressuspensas em 1 mL de trizol e transferidas para eppendorfs *RNAse Free*. As amostras de subpopulações de timócitos foram sorteadas como descrito anteriormente, centrifugadas (266 g/5 minutos) ressuspensas em 1 mL de trizol e transferidas para eppendorfs *RNAse Free*.

A partir de então se procedeu o protocolo como previamente estabelecido em nosso Laboratório (105); as células em solução de trizol foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguida da adição de 200 μ L de clorofórmio e agitação vigorosa dos eppendorfs por 15 segundos. Após a agitação, os eppendorfs foram deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e as amostras foram centrifugadas a 12000 g e 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa superior foi recolhida e transferida para outro eppendorf *RNAse free* ao qual foi adicionado isopropanol no mesmo volume obtido. As amostras foram então movidas para o freezer -20°C onde foram deixadas por cerca de 18 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante dispensado e adicionado a cada tubo 1 mL de etanol 70% gelado, seguido de outra centrifugação (7500 g, 5 minutos, 4°C). Esse passo foi repetido por duas vezes e, ao final, os tubos foram invertidos, possibilitando a secagem das amostras, por aproximadamente 20 minutos. Após esse período, as amostras foram ressuspensas em 20 μ L de água DEPC. Foi então retirada uma alíquota para a quantificação e avaliação da pureza do RNA obtido, determinado por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000, Thermo Fisher Scientific). Os RNAs extraídos foram mantidos a -80 °C.

Posteriormente, foi feita a síntese do DNA complementar (cDNA) através do *kit* SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando o protocolo sugerido pelo fabricante.

Resumidamente, foi feita a preparação do mix contendo volume suficiente para 2 µg de RNA (ou 400 ng para as amostras de subpopulação de timócitos), 1 µL de dNTP a 10 nM, 1 µL de oligo-dT a 0,5 µg/µl e H₂O DEPC em volume suficiente para se obter um volume final de 12 µL e, em seguida, sua incubação a 65 °C por 5 minutos. Ao final da incubação, as amostras foram colocadas diretamente no gelo e foram adicionados 4 µL 5X First-Strand Buffer e 2 µL de 0,1 M DTT 2, seguida de uma nova incubação a 42°C por 2 minutos. Por último, foi adicionado ao mix 1 µL da enzima SuperScript II e as amostras foram incubadas em termociclador com as seguintes condições: 42 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos e resfriado a 4 °C. As amostras foram mantidas a -20°C.

Após a obtenção das amostras de cDNA foi realizado o RT-PCR quantitativo, que foram realizados no Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE) na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em colaboração com Alexandre Keller e Michelangelo Gonzatti, que gentilmente nos cederam as sondas moleculares para os receptores adrenérgicos. As sequências das sondas para identificação de genes dos receptores colinérgicos foram obtidos de trabalhos previamente publicados na literatura (106,107). Resumidamente, foi feita a preparação de um mix contendo 5 µL do Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de cada primer, 0,5 µL de amostra de cDNA e 2,5 µL de H₂O nuclease *free*, completando 10 µL. O cálculo da expressão gênica foi realizado através do método comparativo ΔCt. Como gene de referência, utilizamos o gene GAPDH. Os primers utilizados podem ser encontrados na tabela número 3.1.

Tabela 3.1: Primers utilizados na avaliação da expressão de receptores Adrenérgicos e Colinérgicos

Gene alvo		Sequências
Chrm1	Forward	GACCCTACAGACCCCTCTCC
	Reverse	CCCTTCCTCCAGTCACAAGA
Chrm3	Forward	GTACAACCTCGCCTTTGTTTCC
	Reverse	GACAAGGATGTTGCCGATGATG
Chrm5	Forward	GTCTCCGTCATGACCATACTCTA
	Reverse	CCCGTTGTTGAGGTGCTTCTAC
Chrna7	Forward	GGTCATTTGCCCACTCTG
	Reverse	GACAGCCTATCGGGTGAG
Adrb2	Forward	GGGAACGACAGCGACTTCTT
	Reverse	GCCAGGACGATAACCGACAT
Adra1a	Forward	CTGCCATTCTTCCTCGTGAT
	Reverse	TTTCTTGAACCTCTGGCTGG
Adra1d	Forward	TCCGTAAGGCTGCTCAAGTT
	Reverse	GATGGTTTCAGCTGAGGGAA
Adra2a	Forward	GTGACACTGACGGCTGGTTTG
	Reverse	CCAGTAACCCATAACCTCGTTG

3.6. Ensaio de morte celular

Para a análise da influência direta das drogas sobre os timócitos, foram realizados ensaios para determinação de morte celular, com cinética de tratamento 3, 4, 6, 24 e 48 horas. Foram estabelecidas diferentes doses para o tratamento de timócitos e avaliação da indução da morte por carbacol (100 e 1000 nM) (98) e arterenol (10, 100, 1000 nM e 1 mM) (90,108). Timos foram extraídos e macerados em PBS [1x] com a ajuda de um *potter*. Foram adicionadas 1×10^6 /células por poço em 600 μ L de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) mais 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas), onde foram diluídas diferentes concentrações de carbacol ou arterenol. Após cada ponto de cinética, foram recolhidos 300 μ L de solução que foram então centrifugadas (266 g/5 minutos) e ressuspensas em 100 μ L de tampão anexina [1x] (Becton-Dickinson – Pharmigen). Em seguida, foram incubadas por 10 minutos com Anexina V (APC- Immunotools) na diluição 1:100 em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado iodeto de propídeo (PE - Sigma-Aldrich) na concentração final de 5 μ g/mL, seguido da leitura imediata das amostras no citometro FACS Canto II (Becton-Dickinson).

3.7. Ensaio de proliferação celular

Para a análise dos efeitos de arterenol ou carbacol sobre a proliferação de timócitos, os mesmos foram incubados com CFDA-SE (diacetato de carboxifluoresceína-succinimidil éster) (Invitrogen). Resumidamente, os timos foram extraídos, macerados e as células contadas. Quatrocentas mil células foram incubadas com 500 μ L de CFDA-SE 500 nM, por cinco minutos à temperatura ambiente. Após cinco minutos, foram adicionados 500 μ L de PBS/10% SFB gelado, as células foram centrifugadas em 1200 rpm/5 minutos e ressuspensas em 1 mL ou 1,5 mL de meio RPMI-1640 mais 10% de soro bovino fetal (Cultilab) onde foram diluídas diferentes concentrações de carbacol ou arterenol (10, 100 e 1000 nM). Fizemos pontos de cinética de 24 e 48 horas, porém como controle de CFDA-SE retiramos os pontos de controle de citometria uma hora após a incubação da placa da estufa. Esse ponto foi denominado de “hora zero”. A cada ponto eram coletados 500 μ L de solução e, após sua centrifugação (266 g/5 minutos), foram ressuspensas em 200 μ L de PBS, transferidas para tubos de citometria e analisadas no citometro FACSCanto II (Becton & Dickinson), utilizando-se o *software* BD FACSDiva versão 8.1.3.

3.8. Ensaio de migração

Para avaliar a capacidade migratória de timócitos frente a estímulos como carbacol ou arterenol (10, 100 e 1000 nM), foram utilizadas câmaras de Transwell® (Corning Costar) em placas de 24 poços. Nos poços da placa, insertos com poro de 5 micrômetros foram colocados e, em seguida, foram adicionados 70 μ L de PBS/BSA 1% tanto na câmara superior quanto na

inferior. Como controle positivo de migração através das câmaras, usamos membrana recoberta com fibronectina (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL. As placas foram então colocadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 45 minutos. As soluções foram então recolhidas e os insertos movidos para novos poços. Foram então adicionados 600 µL de cada estímulo diluídos no meio de migração (RPMI-1640 BSA 0,5%) na câmara inferior.

Timos foram extraídos e macerados em PBS [1x] com a ajuda de um *potter*. Após a contagem das células na câmara de Neubauer, foi separado o volume para a proporção de 2,5 x10⁶ células por poço enquanto o volume restante foi mantido em gelo. As células foram diluídas em 100 µL de meio de migração e colocadas na câmara superior do inserto, na estufa, por 3 horas. Ao final da incubação, o volume em cada câmara inferior foi recolhido e centrifugado a 266 g por 5 minutos. Após esta etapa, as células migrantes foram contadas em câmara de Neubauer (Adaptado de MENDES-DA-CRUZ et al., 2008) seguida de citometria de fluxo para avaliação das subpopulações de timócitos (Figura 3.1).

Além de avaliar possíveis efeitos quimioatraentes, avaliamos também se a exposição prévia das células aos análogos de noradrenalina e acetilcolina poderia influenciar na migração. Para isso, 5x10⁶ timócitos foram tratados com carbacol ou arterenol (10, 100 e 1000 nM) diluído em meio de migração por uma hora e meia em uma placa de 96 poços, mantidas na estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram centrifugadas (1200 rpm/5 minutos) e ressuspendidas em 200 µL meio de migração sem carbacol. Nos poços das placas de 24 poços, novamente foram adicionados 70 µL de PBS ou de fibronectina, em ambas as câmaras do inserto e a placa foi incubada a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 45 minutos. Após o período de incubação, os volumes dos insertos foram recolhidos, os insertos movidos para novos poços e, a esses, adicionados 70µL de PBS-BSA/1% em ambas as câmaras de todos os insertos durante 30 minutos na estufa, fazendo assim o bloqueio da membrana. Após o bloqueio da membrana, os insertos foram novamente movidos para novos poços, onde foram adicionados 600µL do meio de migração na câmara inferior do inserto, e 100 µL de células pré-tratadas, agora diluídas apenas em meio de migração, na câmara superior. A placa foi então mantida na estufa por 3 horas. Ao final da incubação, o volume em cada câmara inferior foi recolhido e centrifugado a 266 g por 5 minutos. Após esta etapa, as células migrantes foram contadas em câmara de Neubauer, marcadas com anticorpos específicos ligados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo para avaliação das subpopulações de timócitos, conforme protocolos anteriormente publicados (28,108) (Figura 3.1).

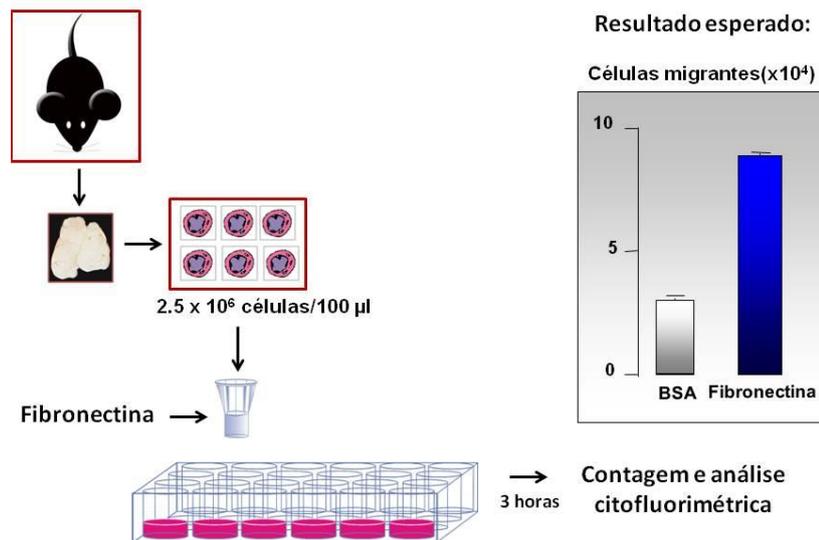


Figura 3.1: Diagrama esquemático do experimento de migração. O timo dos animais é extraído e macerado em PBS. São separadas $2,5 \times 10^6$ células por 100 μ L de meio de migração (RPMI + 0,5% BSA). Essas células são então colocadas na câmara superior do inserto Transwell. Como controle positivo a membrana do inserto é coberta por fibronectina (FN). Essa membrana é então incubada por 1 hora e lavada com PBS. Após 3 horas de migração, espera-se que as células colocadas em contato com o poço que foi coberto por FN migrem mais, cerca de o dobro, do número de células que não entraram em contato com a FN.

No que diz respeito à análise por citometria de fluxo, timócitos foram adicionados a placas de 96 poços com fundo “U”, centrifugados (266 g/5 minutos) e incubados com 10 μ L do mix de anticorpos anti-CD4 (eBioscience, diluição 1:100) e anti-CD8 (Becton-Dickinson, diluição 1:50). A incubação durou 30 minutos, protegido da luz à 10°C. Após esse período, as células foram “lavadas” com 50 μ L de PBS [1x] gelado, centrifugadas (266 g/5 minutos/ 4°C), ressuspensas em 150 μ L de PBS/formaldeído 2% e transferidas para tubos de citometria. Em seguida, as amostras foram lidas no citômetro FACSCanto II (Becton & Dickinson) através do software BD FACSDiva versão 8.1.3.

Para análise dos resultados obtidos nos experimentos de migração, utilizamos o número de células migrantes, o número absoluto das subpopulações e o percentual de *input*. O cálculo do número absoluto foi feito levando-se em consideração o número total de células migrantes, bem como os números das subpopulações de timócitos definidas pelos marcadores CD4 e CD8 (DN, DP, SPCD4 e SPCD8). O percentual de *input* leva em consideração a quantidade de células de cada subpopulação da amostra original, calculado a partir da razão entre o número absoluto de cada subpopulação migrante e o número absoluto de cada subpopulação antes de migrar (28).

3.9. Ensaio de adesão timócitos/células epiteliais tímicas

Para avaliarmos se carbacol ou arterenol poderiam modular a adesão de timócitos às TECs, realizamos ensaio de adesão heterocelular como anteriormente padronizado em nosso

laboratório (35). Para realização desse experimento, foram adicionadas 5×10^3 TEC da linhagem 2BH4 por poço, em placas de 6 poços, mantidas em cultura por 48 horas em 3mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após este período, as TEC foram contadas em cada poço. Timócitos foram obtidos através da extração e maceração do timo de camundongos fêmeas em PBS [1x]. Os timócitos foram então contados, centrifugados e ressuspensos em RPMI aquecido (deixado na estufa por 24 horas antes do experimento). Foi então feito co-cultivo de timócitos e TECs mantendo uma relação de 20 Timócitos/TEC (20:1). Ambas as células foram mantidas em meio RPMI aquecido na presença de carbacol ou arterenol (10, 100 e 1000 nM) por 1 hora. Após esse período, as placas foram inclinadas para a retirada de timócitos não-aderentes. Com a retirada das células não-aderentes, células aderidas foram fixadas em 1 mL de metanol por poço durante 5-7 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e as células foram coradas com 2 mL de corante Giemsa por 30 minutos. Em seguida, os poços foram “lavados” com água destilada. Com as células coradas, foi possível realizar a contagem em microscópio óptico invertido em objetiva de 40x com auxílio de Opticam acoplada. Foram contados 50 campos e em seguida realizado o cálculo do índice de associação (IA).

A fórmula correspondente ao IA foi validada previamente em nosso laboratório, baseada na contagem de TECs totais, TECs com timócito aderidos e timócitos aderidos às TEC (35,50). Sendo assim, a fórmula do IA é dada a seguir:

$$IA = \left(\frac{\text{Número de TECs com timócitos}}{\text{TECs totais}} \right) \times \left(\frac{\text{Número de timócitos ligados à TECs}}{\text{TECs totais}} \right) \times 100$$

3.10. Citometria de Fluxo de TECs

Para avaliarmos se carbacol poderia modular receptores de fibronectina e laminina em TECs, cinco mil células da linhagem 2BH4 foram plaqueadas em placas de 6 poços, mantidas em cultivo por 48 horas em 3mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após 48 horas de cultura, o meio suplementado foi removido e as TECs foram “lavadas” com RPMI aquecido (mantido na estufa por 24 horas) e, em seguida, foi adicionado carbacol nas concentrações 10 e 100 nM diluído em RPMI aquecido. As células foram transferidas para estufa onde ficaram por uma hora. Após esse período, o meio foi removido e as células foram tripsinizadas e recolhidas em tubos falcon de 15 mL (Corning). As células foram novamente transferidas para a estufa por um período de 30 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 400g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de meio de citometria (PBS, 1%BSA e EDTA) e adicionadas à poço

em placas de 96 poços com fundo “U” e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 3µL de soro normal de camundongo por 20 minutos para o bloqueio de receptores Fc, sempre mantidas no gelo e ao abrigo da luz. Em seguida as células foram incubadas com 10µL dos anticorpos anti-VLA-4, anti-VLA-5 e anti-VLA-6 (BD Bioscience) por 30 minutos. Como controles de marcação inespecíficas foram utilizadas imunoglobulinas não específicas de rato. Após esse período, as células foram lavadas com 50µL de meio de citometria, centrifugadas a 400g por 5 minutos a 10°C e logo após ressuspensas em 150µL de meio de citometria. Em seguida, foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e adquiridas em citômetro de fluxo (FACS Canto II, Becton&Dickinson). Os dados obtidos foram analisados no programa FACS DIVA (Becton-Dickinson).

3.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através dos testes One-Way ANOVA ou Two-Way Anova seguido do post-test de Bonferroni ou Tuckey para múltiplas comparações através do software GraphPadPrism 6.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p \leq 0,0001$.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em timócitos e células epiteliais tímicas

Conforme descrito anteriormente, a detecção de receptores adrenérgicos e colinérgicos foi feita por RT-PCT, tanto em timócitos quanto em células epiteliais tímicas. Avaliamos a expressão dos receptores α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 , M1, M3, M5 e da subunidade α_7 em amostras de timócitos totais utilizando cérebro total como controle positivo (Figura 4.1A e B). Além disso, avaliamos também a expressão dos receptores β_2 , α_{1D} , M1 e α_7 nas subpopulações de timócitos (DN, DP, CD4 e CD8) (Figura 4.1C).

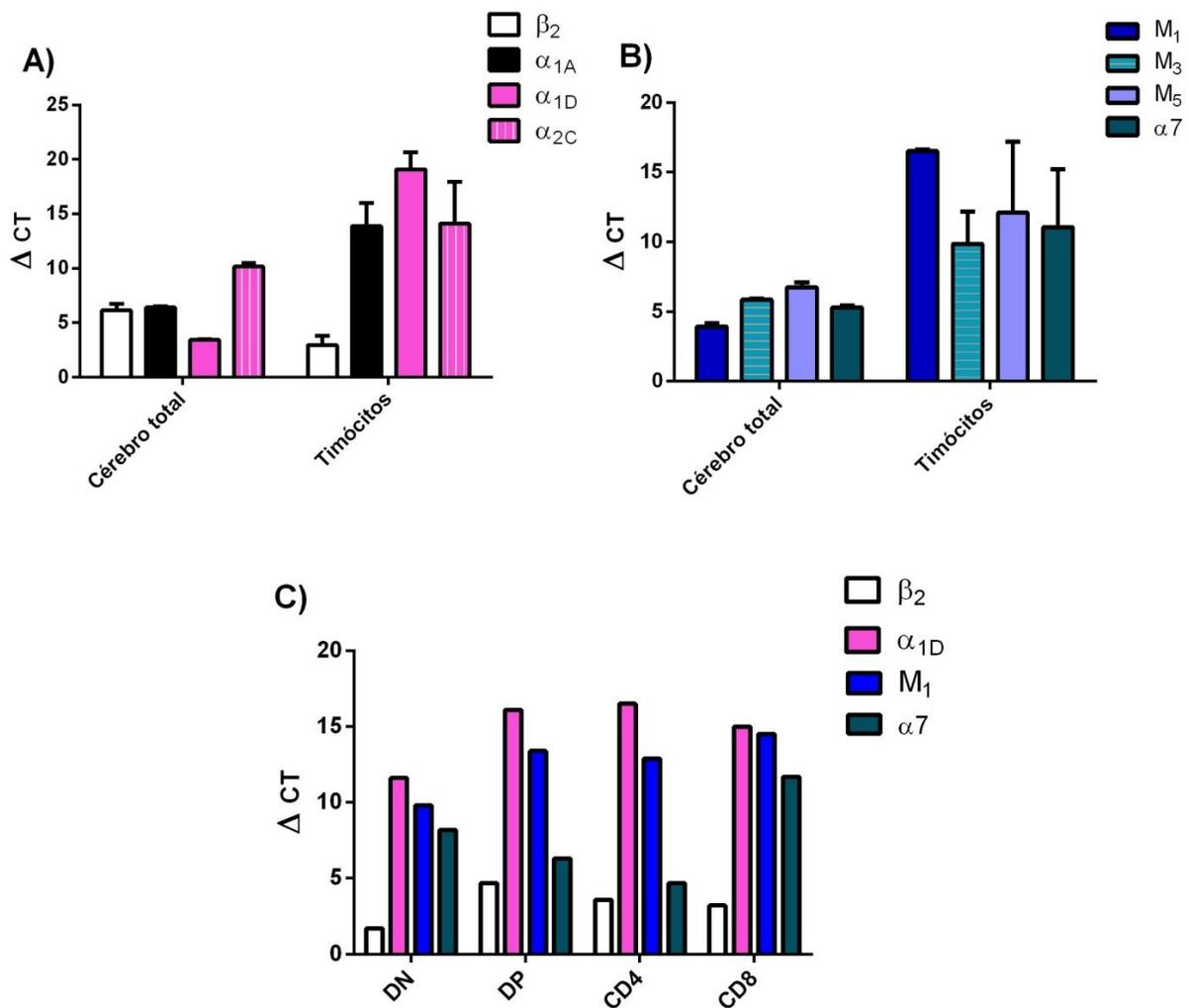


Figura 4.1: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em amostras de timócitos totais e nas subpopulações de timócitos. A) Valores em ΔCT (derivados de RT-PCR) de receptores adrenérgicos em amostras de timo total e cérebro total como controle positivo. B) Valores em ΔCT de receptores colinérgicos em amostras de timo total e cérebro total como controle positivo C) Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em subpopulações de timócitos. O cálculo da expressão gênica foi realizado através do método comparativo ΔCt . N=2 para amostras de cérebro total; entre 2 e 3 para timócitos totais e 1 para subpopulações de timócitos.

É possível observar que ambos timócitos totais e as subpopulações expressam todos os receptores testados. Além disso, pode-se observar que o receptor β_2 parece ser o menos expresso entre as amostras de timócitos totais e nas subpopulações, enquanto o α -AR, principalmente α_{1D} , parece ser mais expresso. Com relação aos receptores colinérgicos, M_1 é o mais expresso quando comparado as amostras de cérebro total e entre os colinérgicos nas subpopulações de timócitos.

Buscamos também avaliar se nossas linhagens de TECs expressam os receptores α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 , M_1 , M_3 , M_5 e α_7 . Para essa avaliação escolhemos as TECs 2BH4 (TEC de fenótipo misto), 1.4C18 (TEC de fenótipo cortical) e 3.10 (TEC de fenótipo medular) que foram mantidas em cultivo, como previamente descrito, até a obtenção de alta confluência. Pode-se observar um

padrão de expressão semelhantes entre as diferentes amostras de TECs e ao observado anteriormente nas amostras de timócitos totais. A expressão dos receptores adrenérgicos e do receptor colinérgico M_1 parece maior nas amostras de TECs que no controle positivo (Figura 4.2).

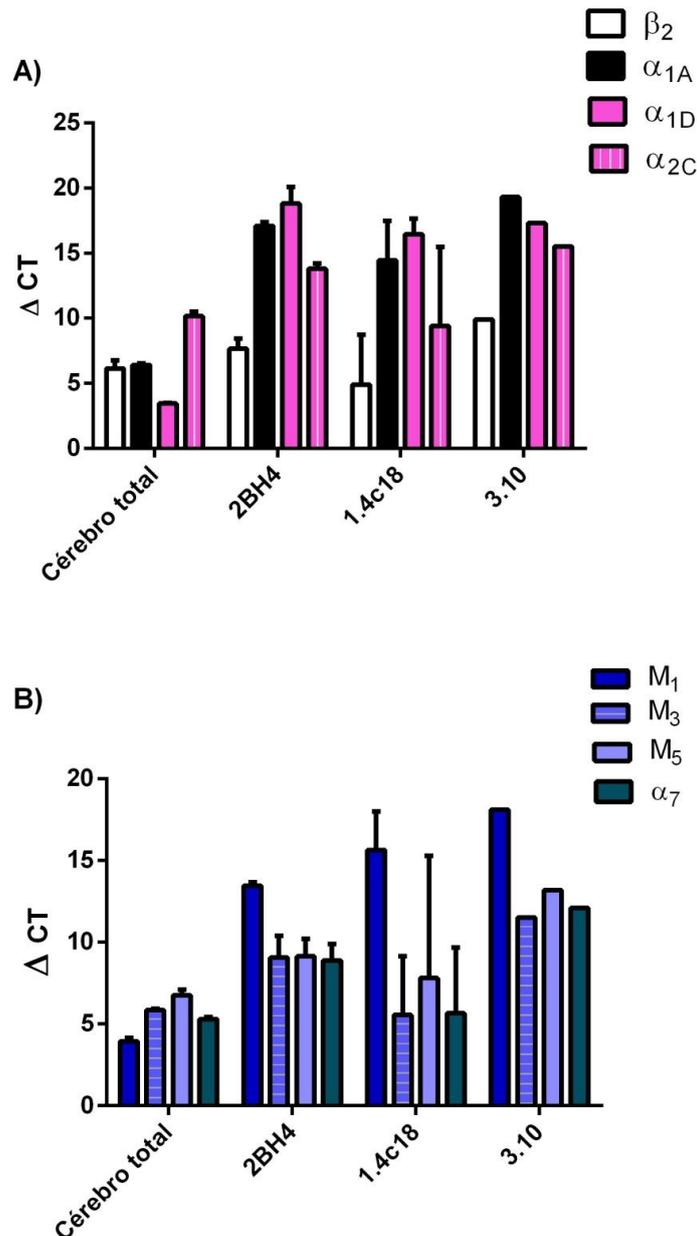


Figura 4.2: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em amostras de TECs. A) Valores em ΔCT de receptores adrenérgicos em amostras de linhagens de TEC e cérebro total como controle positivo. B) Valores (derivados de RT-PCR) em ΔCT de receptores colinérgicos em amostras de linhagens de TEC e cérebro total como controle positivo. N= 1 em duplicata para as amostras de TECs e N=2 para amostras de cérebro total.

Por último, buscamos avaliar se a confluência das células em cultura poderia afetar a expressão dos receptores adrenérgicos e colinérgicos α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 , M_1 , M_3 , M_5 e α_7 . A confluência foi avaliada a partir de observações feitas na cultura celular. As células foram mantidas em em garrafas de cultivo de 75 cm² até atingir alta confluência (90-100% de toda a garrafa) ou baixa confluência (<60%). Utilizando a linhagem 1.4C18, uma linhagem de TECs

corticais, pode-se observar um padrão semelhante entre alta e baixa confluência não indicando modulação dependente da confluência celular. Além disso, novamente, o β_2 -AR parece ser o menos expresso entre os grupos de TEC tanto em alta quanto baixa confluência (Figura 4.3A). Entre os receptores colinérgicos, novamente M_1 parece ser o mais expresso sem diferença entre os grupos de alta e baixa confluência (Figura 4.3B).

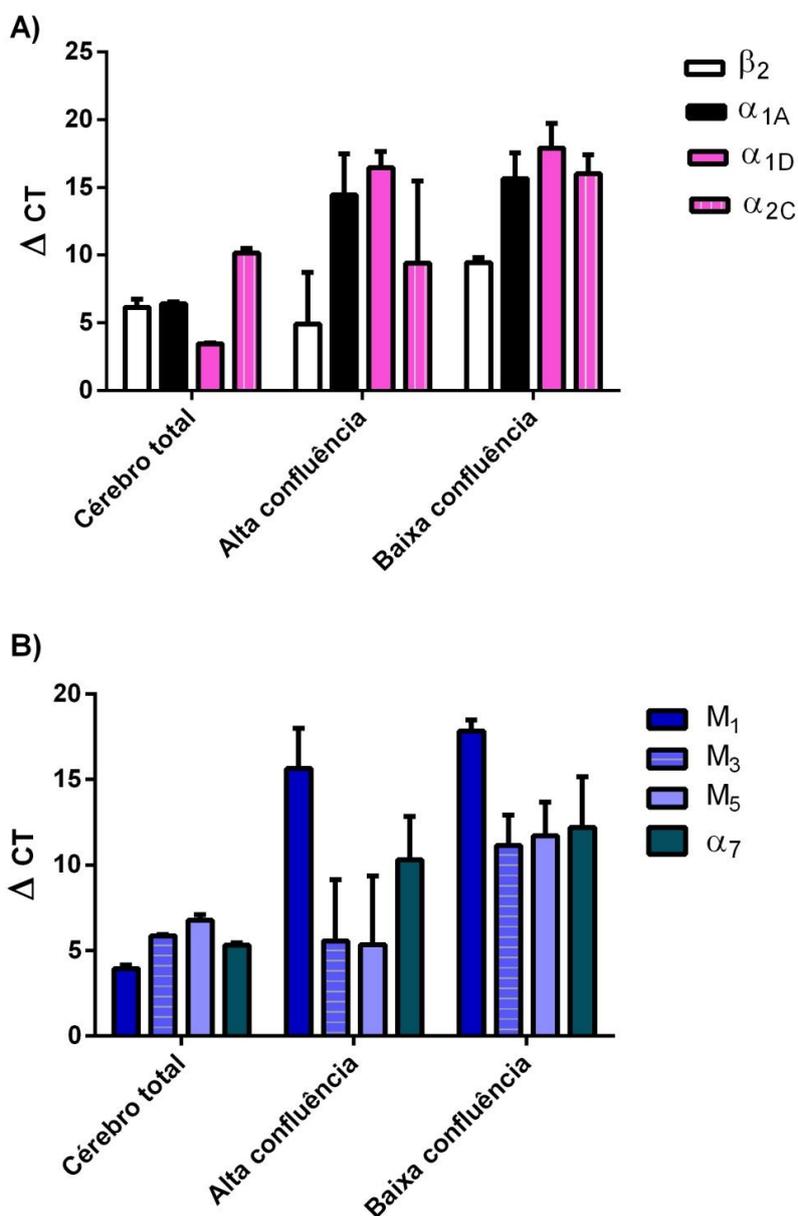


Figura 4.3: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em células 1.4C18 em alta e baixa confluência. A) Valores (derivados de RT-PCR) em ΔCT de receptores adrenérgicos em amostras de células 1.4C18 e cérebro total como controle positivo. B) Valores em ΔCT de receptores colinérgicos em amostras de células 1.4C18 e cérebro total como controle positivo. N= 1 em duplicata para as amostras de TECs e N=2 para amostras de cérebro total.

A análise da expressão dos receptores α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 , M_1 , M_3 , M_5 e α_7 em amostras de TEC em alta e baixa confluência também foi realizada na linhagem celular 3.10, de fenótipo TEC

medular. Observamos um padrão semelhante entre os grupos de alta e baixa confluência, não indicando portanto, modulação na expressão dos receptores dependente da confluência celular. Além disso, os padrões de expressão descritos anteriormente se mantêm, β_2 - AR parece ser o menos expresso entre os grupos tanto em alta quanto baixa confluência (Figura 4.4A) e entre os receptores colinérgicos, M1 parece ser o mais expresso sem diferença entre os grupos de alta e baixa confluência (Figura 4.4B).

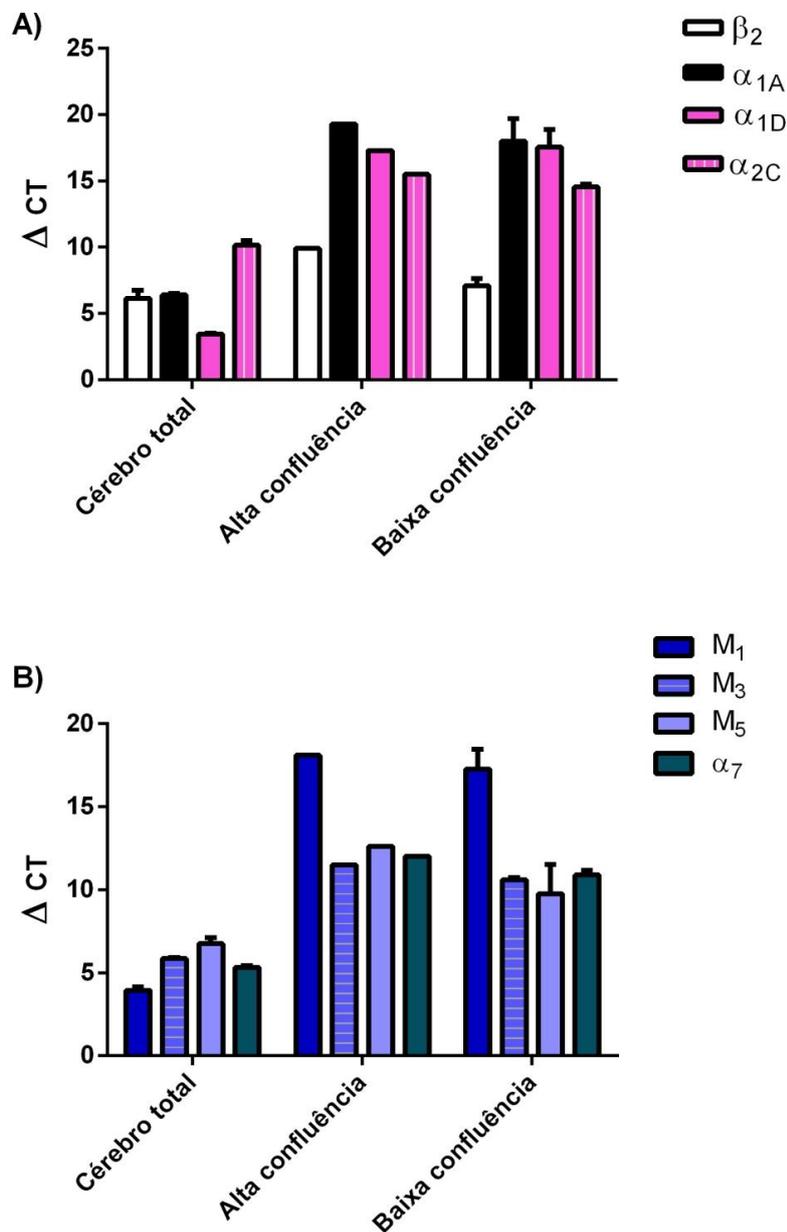


Figura 4.4: Expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em células 3.10 em alta e baixa confluência. A) Valores (derivados de RT-PCR) em Δ CT de receptores adrenérgicos em amostras de células 3.10 e cérebro total como controle positivo. B) Valores em Δ CT de receptores colinérgicos em amostras de células 3.10 e cérebro total como controle positivo. N= 1 em duplicata para as amostras de baixa confluência e N=1 sem duplicata para alta confluência. N=2 para amostras de cérebro total.

Após a confirmação sobre a expressão dos receptores adrenérgicos e colinérgicos nos timócitos TECs, realizamos uma série de ensaios funcionais, utilizando as drogas análogas aos neurotransmissores NA e ACh, isto é, arterenol e carbacol, respectivamente.

4.2. Ensaios funcionais

4.2.1. Morte celular de timócitos

O primeiro ensaio funcional avaliado foi a morte celular. De acordo com dados da literatura (90, 108) escolhemos doses de arterenol de 10 nM, 100 nM, 1000 nM e 1 mM nos períodos de 4, 24 e 48 horas. Após cada ponto determinado, foram retirados 300 µL da solução e feitas marcações para Anexina V e iodeto de propídeo (PI). Após cada marcação as amostras foram lidas no citômetro FACS Canto II (Becton-Dickinson). As análises citofluorométricas e os marcadores utilizados podem ser observados na figura 4.5.

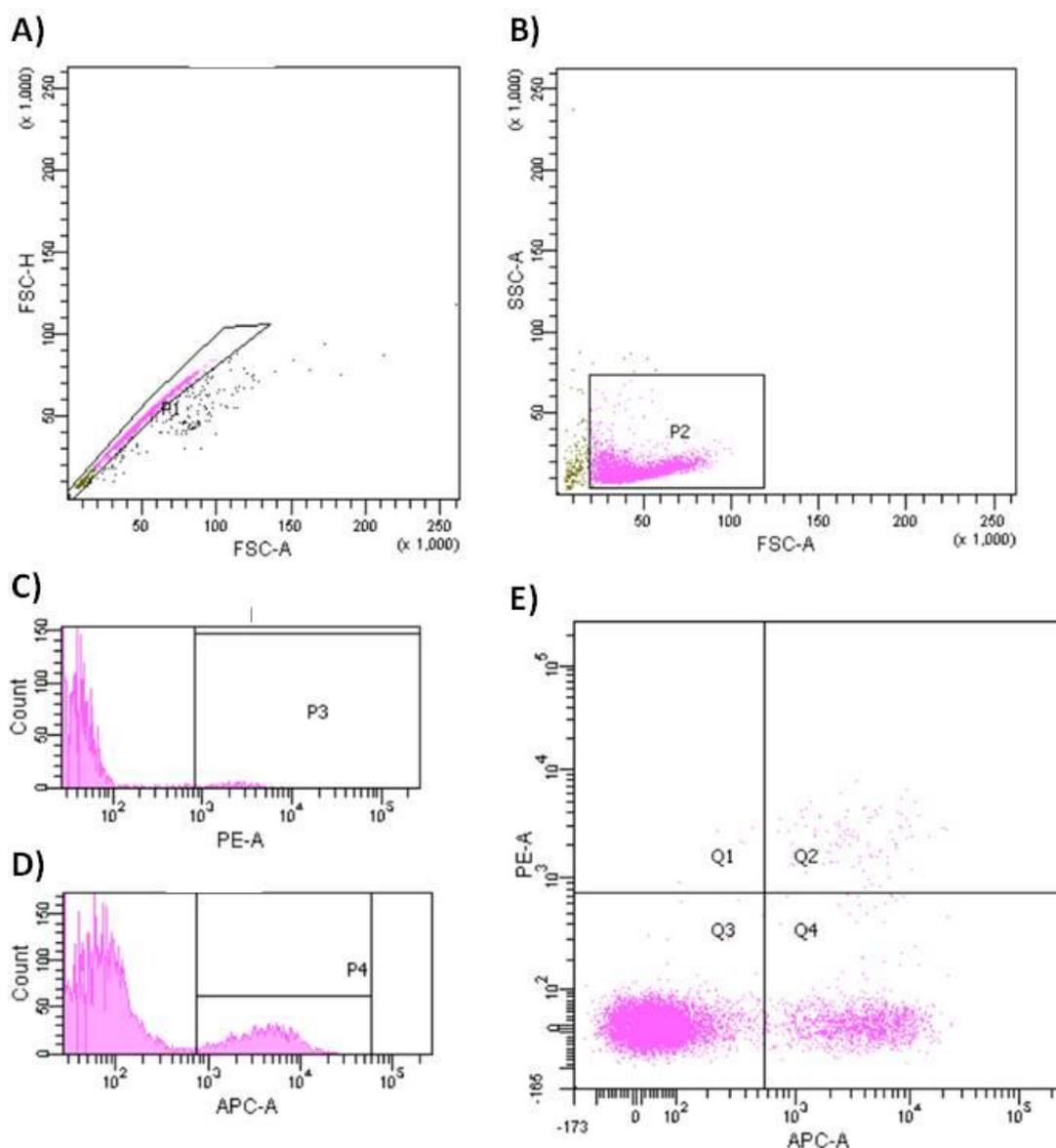


Figura 4.5: Esquema representativo de estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo após o tratamento com arterenol ou carbacol após 3 horas de incubação. A-E) Plots representativos da análise citofluorimétrica das amostras. A) R1: Em verde, região de células únicas (singlets) para eliminação de aglomerados celulares (doublets) levando em consideração os parâmetros FCS-A x FCS H. B) Delimitação da população de timócitos no dotplot tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) – região P2 (Rosa). C) Histograma da expressão PI (PE); e D) de Anexina V (APC) na região de timócitos P2 (Rosa) em células controle (NT). E) Delimitação da população de timócitos no dotplot PI x Anexina V.

Não foram observadas diferenças nas doses 10, 100 e 1000 nM, em nenhum ponto da cinética, em relação aos controles. Porém, como esperado, a concentração de 1 mM foi capaz de induzir um aumento no percentual de células mortas, que corresponde a soma das populações de células apoptóticas (Anexina V⁺) e necróticas (Anexina V⁺ + PI⁺) (Figura 4.6A). Ao isolarmos a população em apoptóticas e necróticas, só é possível observar uma diferença significativa a partir de 24 horas (4.6B), enquanto que não é observada a modulação em células necróticas. Esses resultados indicam que arterenol na concentração 1 mM induz a apoptose de timócitos.

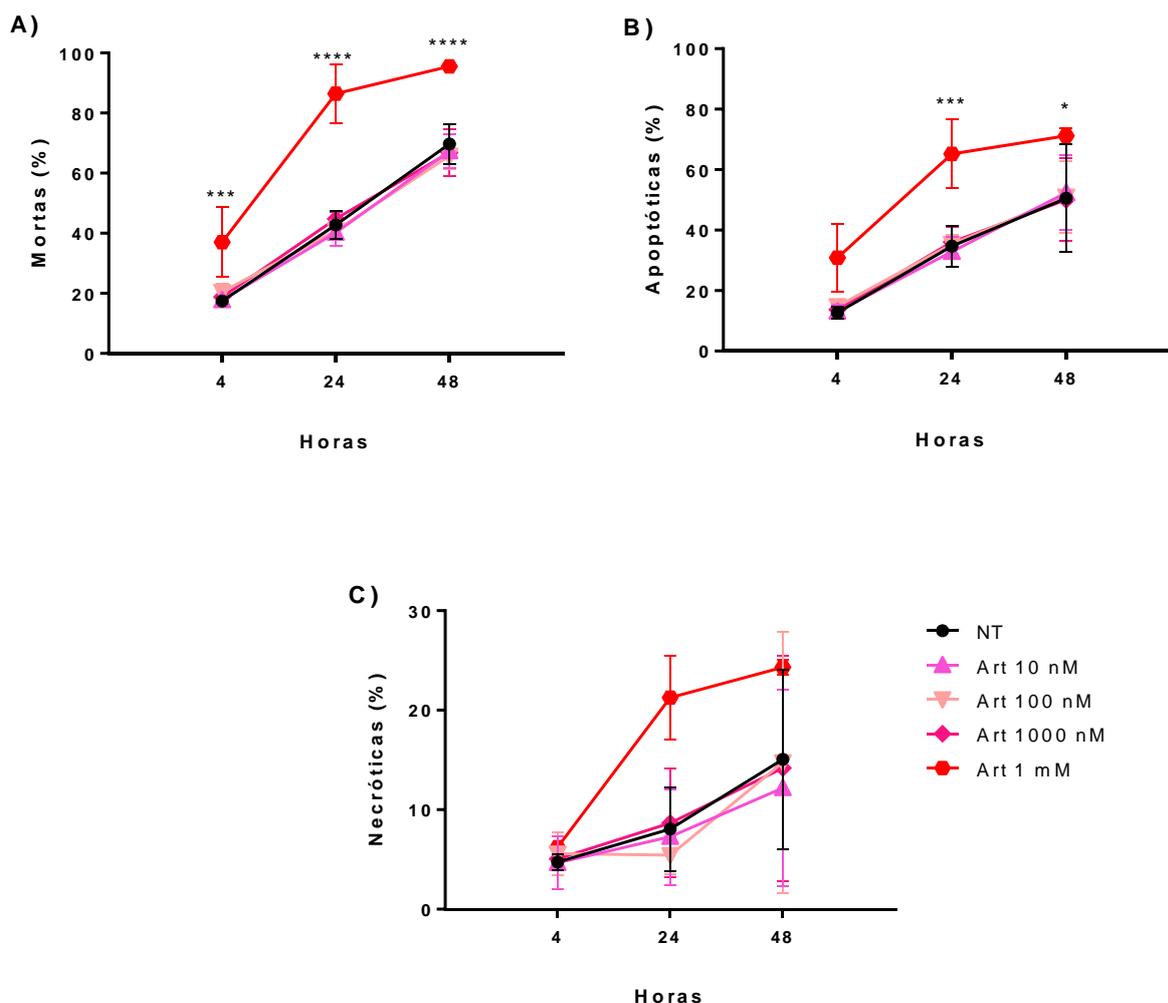


Figura 4.6: Arterenol 1 mM induz a apoptose de timócitos. **A)** Número relativo de células mortas em diferentes pontos (horas) na cinética após o tratamento com arterenol (ART). **B)** Número relativo de células apoptóticas (Anexina V⁺) em diferentes pontos (horas) após o tratamento com arterenol (ART). **C)** Número relativo de células necróticas (Anexina V⁺+ PI⁺) em diferentes pontos (horas) após o tratamento com arterenol (ART). Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001 ou **** p≤0,0001. N= entre 3 e 4 animais por grupo.

Os dados na literatura sobre a indução de morte de timócitos frente a carbacol são escassos, e, em nosso trabalho, avaliamos os possíveis efeitos diretos de carbacol sobre os timócitos. As células foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações do análogo de ACh, em cinética de 3, 6, 24 e 48 horas. Após cada ponto determinado, foram feitas marcações com Anexina V/PI. Não foram observadas alterações no percentual de células mortas (Figura 4.7A) e portanto não houve alteração no percentual de células apoptóticas e necróticas (Figura 4.7B e C) em nenhuma concentração de carbacol utilizada nos diferentes pontos de cinética determinados.

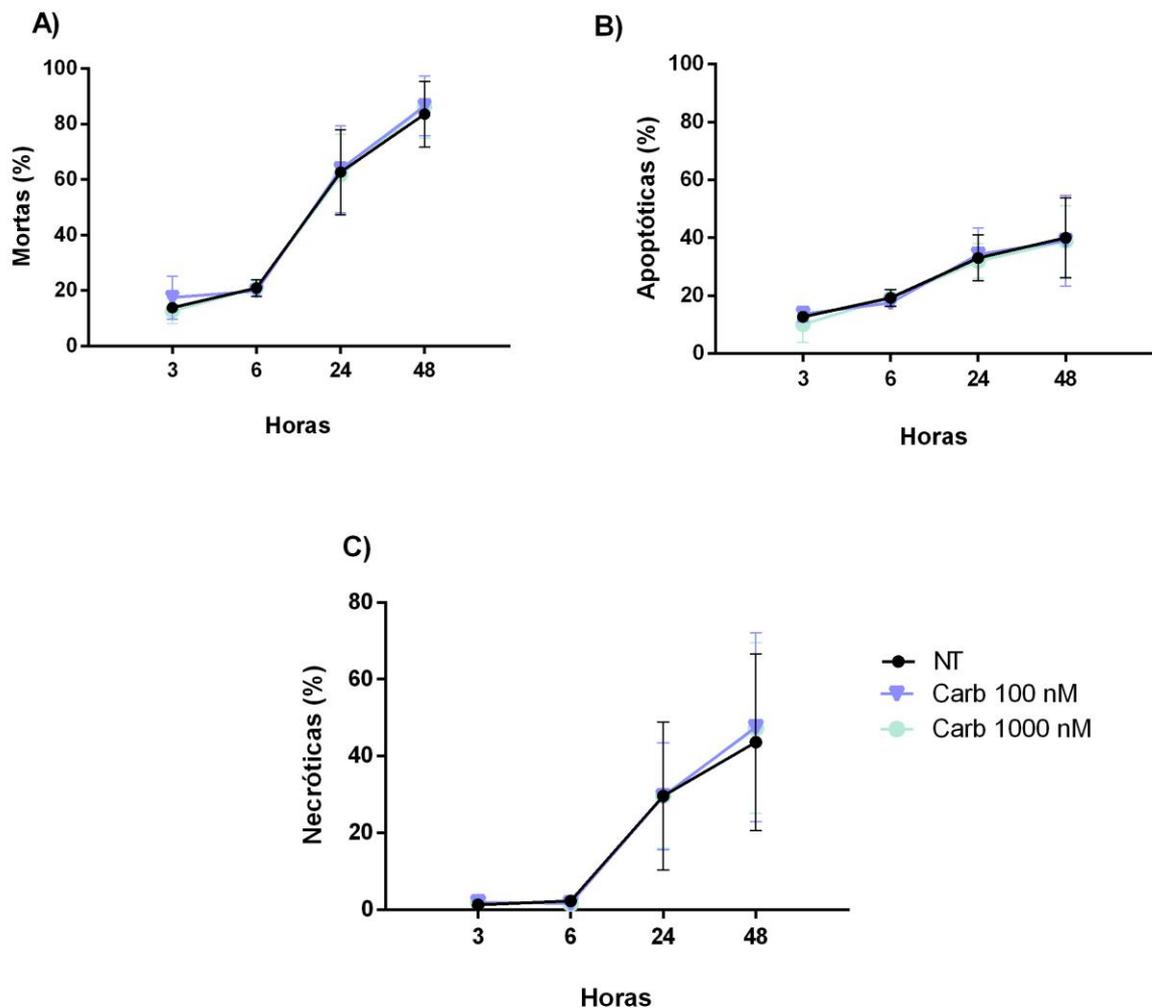


Figura 4.7: Carbacol não induz morte celular em timócitos. A análise do percentual de células mortas marcadas com Anexina V/PI. **A)** Número relativo de células mortas em diferentes pontos (horas) após tratamento com carbacol (CARB). **B)** Número relativo de células apoptóticas (Anexina V⁺) em diferentes pontos (horas) após o tratamento com carbacol (CARB). **C)** Número relativo de células necróticas (Anexina V⁺+ PI⁺) em diferentes pontos (horas) após o tratamento com carbacol (CARB). Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Não houve diferenças significativas. N= 3 a 6 por grupo.

4.2.2. Proliferação celular

Avaliamos em seguida se o tratamento com arterenol ou carbacol poderia influenciar na proliferação de timócitos, outro parâmetro essencial para o desenvolvimento dessas células. Inicialmente procuramos verificar se arterenol ou carbacol poderiam influenciar a proliferação celular, usando timócitos marcados com CFSE, sem estímulo de mitógenos. Para isso, as células foram marcadas por CFSE por 5 minutos e em seguida encubadas com diferentes concentrações de arterenol ou carbacol por 24 e 48 horas. Após cada marcação as amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os plots resultantes podem ser observados na figura 4.8.

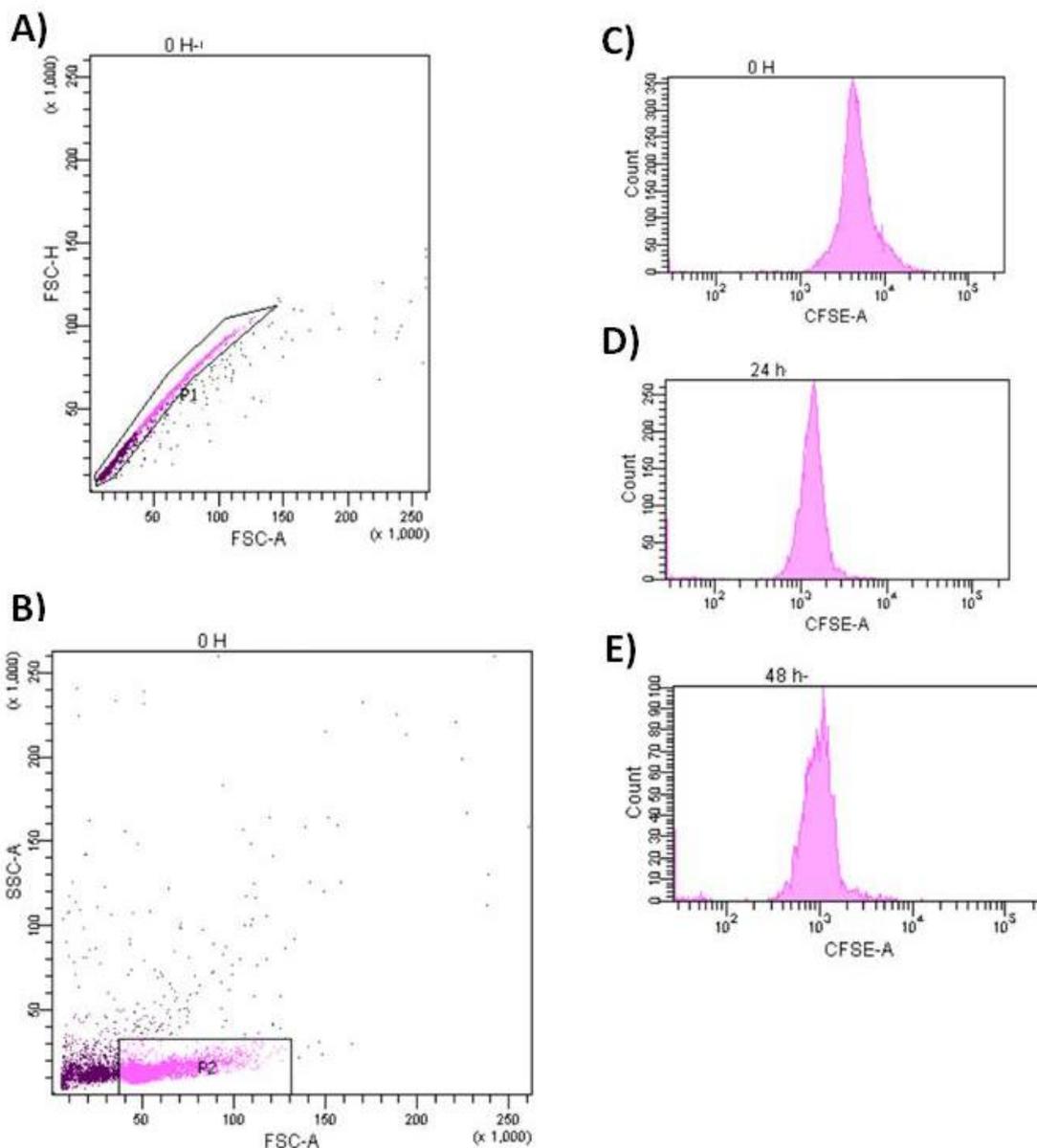


Figura 4.8: Análise citofluorométrica de timócitos marcados com CFSE. A-E) Plots representativos da análise citofluorimétrica das amostras. **A)** P1: Em roxo escuro, região de células únicas (singlets) para eliminação de aglomerados celulares (doublets) levando em consideração os parâmetros FCS-A x FCS-H. **B)** Delimitação da população de timócitos no dotplot tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) dentro de P1, sendo separada em região P2 (Rosa). **C)** Histograma da expressão de CFSE no tempo zero, dentro da região P2. **D)** Histograma da expressão de CFSE em 24 horas e **E)** em 48 horas.

A partir das análises citofluorométricas foi possível obter a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) e não observamos diferença significativa entre os tratamentos, tanto no que diz respeito ao arterenol quanto ao carbacol (4.9 A e B).

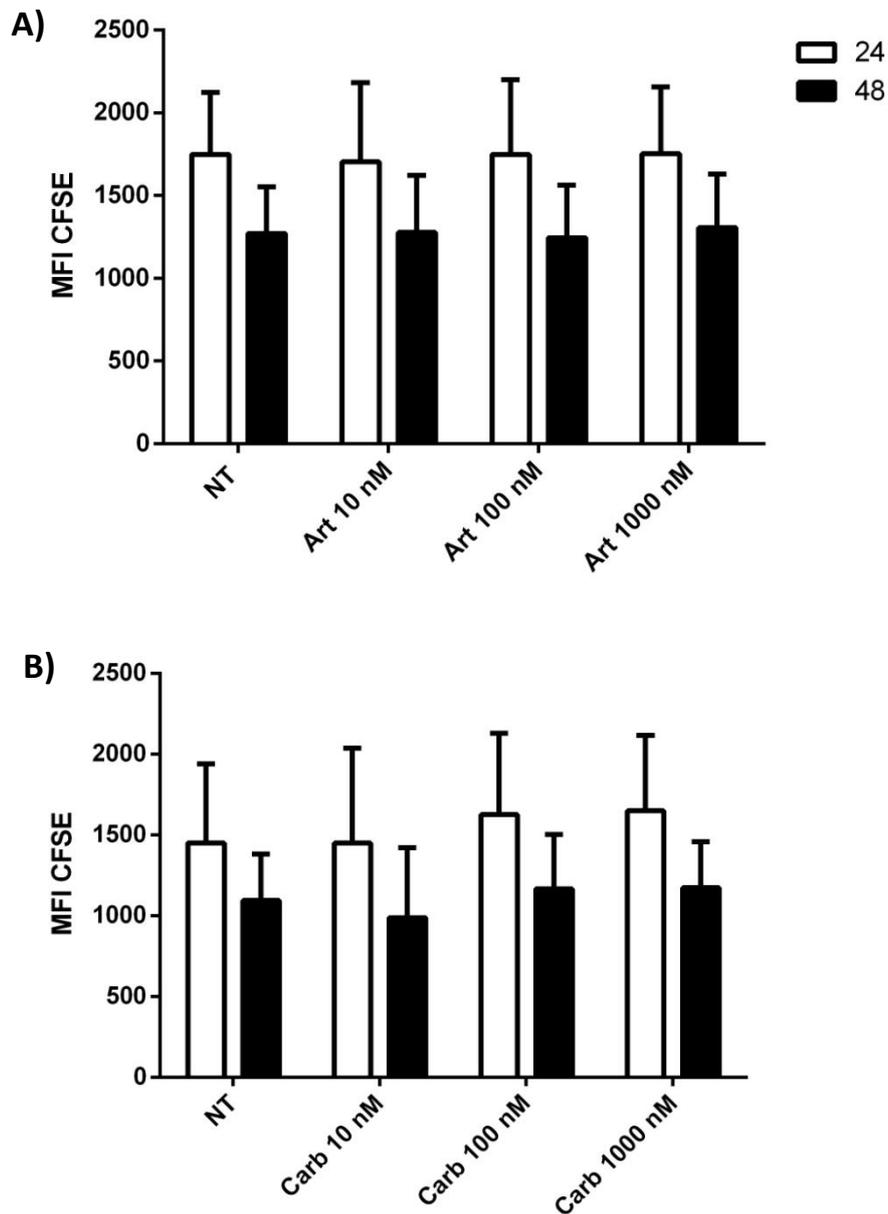


Figura 4.9: Arterenol e carbacol não influenciam a proliferação basal de timócitos. **A)** Mediana da intensidade de fluorescência de CFSE nas amostras, após 24 e 48 horas de incubação com arterenol. **B)** Mediana da intensidade de fluorescência de CFSE nas amostras, após 24 e 48 horas de incubação com carbacol (Carb). Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tuckey. Não houve diferenças significativas em relação ao seu respectivo controle. N= 3.

4.2.3. Ensaios de migração celular

A migração é um processo essencial na diferenciação de timócitos e diversos fatores estão envolvidos na migração, como ligantes da ECM, citocinas e quimiocinas, dentre outros. Como timócitos expressam receptores adrenérgicos e colinérgicos, hipotetizamos que a ativação destes receptores poderia influenciar na migração *ex-vivo* de timócitos. Inicialmente analisamos se arterenol poderia funcionar como quimioatraente. Para tal, arterenol em diferentes concentrações foi colocado no compartimento inferior das câmaras de Transwell. Para esse experimento e

experimentos funcionais posteriores optamos por não utilizar a concentração de arterenol 1 mM, uma vez que foi observada a indução de morte celular nessa concentração.

Após 3 horas de incubação, as células migrantes foram recolhidas, centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados são apresentados após a normalização em relação ao controle (Figura 4.8). Como esperado, observamos diferença significativa entre o controle não tratado (NT) e o controle positivo de indução de migração por fibronectina (FN). Vimos que timócitos expostos somente ao arterenol migraram de maneira semelhante ao controle não-tratado (NT), indicando que arterenol não age como quimioatraente (Figura 4.10).

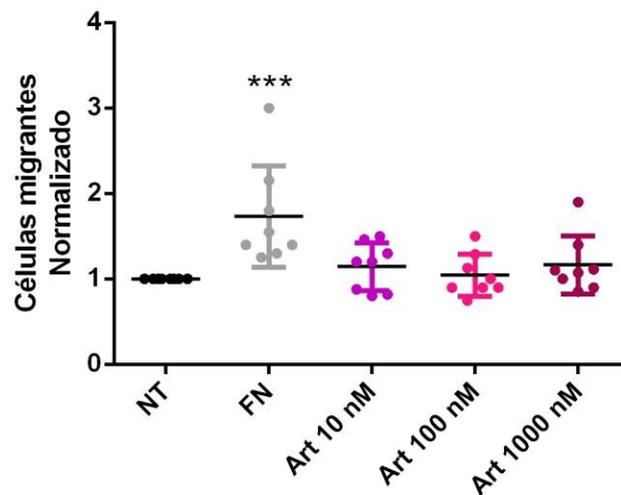


Figura 4.10: Arterenol não age como quimioatraente para timócitos. Migração de timócitos frente a arterenol como quimioatraente. Os dados foram normalizados considerando número de células no controle NT=1. Fibronectina foi utilizada como controle positivo de indução de migração. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. *** $p \leq 0,001$. N=8.

Em todos os experimentos de migração, os timócitos que migraram foram marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, possibilitando a análise, por citometria de fluxo, das subpopulações definidas por estes marcadores: DN, DP, SPCD4 e SPCD8. Um esquema representativo das análises citofluorométricas pode ser observado na figura 4.11.

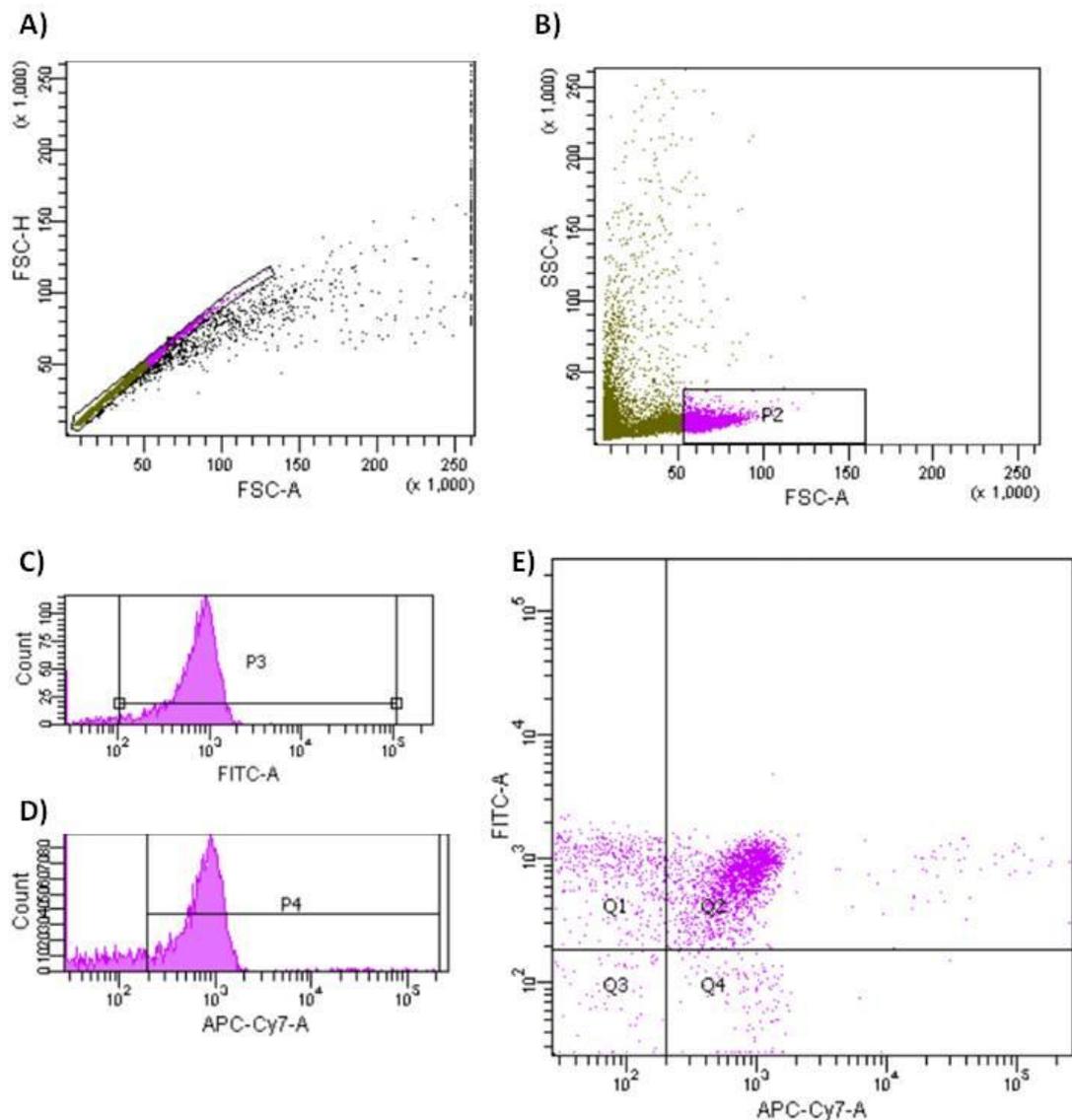


Figura 4.11: Esquema representativo de estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo após a migração. A) R1: Em verde, região de células únicas (singlets) para eliminação de aglomerados celulares (doublets) levando em consideração os parâmetros FCS-A x FCS H. **B)** Delimitação da população de timócitos no dotplot tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) – região P2 (Rosa). **C)** Histograma da expressão CD4 (FITC); e **D)** CD8 (APC-Cy-7) na região de timócitos P2 (Rosa). **E)** Delimitação da população de timócitos no dotplot CD4 x CD8.

Calculamos o número absoluto de células e conseqüentemente o percentual do *input*, que é a razão entre o número absoluto de células e o número de células totais antes da migração. Observamos que as subpopulações de células DP e SP CD4 são as que migram de maneira significativa frente à FN quando comparadas ao controle (Tabela 4.1). No entanto, não observamos mudanças de percentuais dessas subpopulações após migração frente ao arterenol.

Tabela 4.1: Número absoluto de subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de arterenol, testado como potencial quimioatraente

Tratamento	NT	FN	Art 10 nM	Art 100 nM	Art 1000 nM
Número absoluto ($\times 10^4$)					
DN	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,5	0,4 \pm 0,6	0,2 \pm 0,2
DP	2,1 \pm 1,1	3,3 \pm 0,8*	2,3 \pm 1,1	1,9 \pm 0,9	2,4 \pm 0,9
CD4	0,7 \pm 0,6	1,8 \pm 0,6*	1,1 \pm 0,8	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,5
CD8	0,2 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2

Valores expressos em média \pm desvio. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando * $p \leq 0,05$ ou # $p \leq 0,05$. N = 5.

Com relação aos dados de percentual de input, observamos aumento na migração de células SPCD4 frente à FN. Tal alteração não foi observada nas demais subpopulações de timócitos (ver Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Percentual do input nas subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de arterenol, testado como potencial quimioatraente

Tratamento	NT	FN	Art 10 nM	Art 100 nM	Art 1000 nM
Percentual do input					
DN	2,6 \pm 1,9	3,5 \pm 1,8	2,6 \pm 1,3	2,6 \pm 2,5	2,4 \pm 2,0
DP	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,4	1,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4
CD4	1,6 \pm 0,5	5,3 \pm 1,5**	2,3 \pm 0,7	2,7 \pm 1,4	2,5 \pm 0,5
CD8	1,3 \pm 1,0	2,8 \pm 1,9	1,4 \pm 0,9	2,0 \pm 1,7	2,0 \pm 1,2

Valores expressos em média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando * $p \leq 0,05$ ou ** $p \leq 0,01$. N=5.

Em outro grupo de experimentos, procuramos avaliar se carbacol teria efeito quimioatraente. Neste caso, diferentes concentrações de carbacol foram colocadas na câmara inferior do Transwell. Após 3 horas de incubação, as células migrantes foram recolhidas, centrifugadas, ressuspendidas e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados são apresentados após a normalização pelo controle (Figura 4.12). Conforme esperado, observamos que timócitos migram mais frente a FN quando comparados ao controle, mas não migram frente ao carbacol, mostrando que o carbacol não é quimioatratente para timócitos.

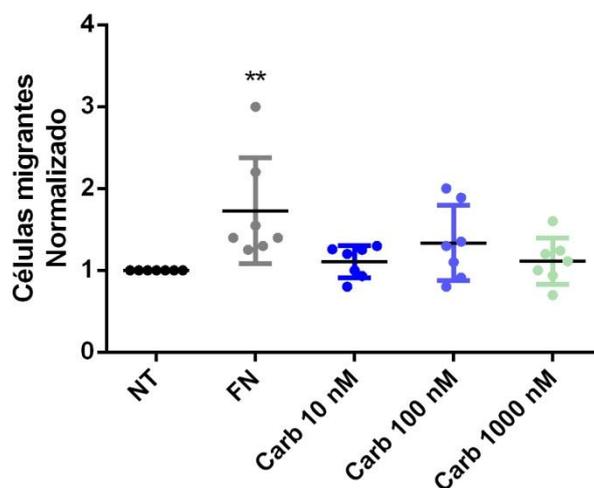


Figura 4.12: Carbacol não age como quimioatraente para timócitos. Os dados foram normalizados considerando número de células no controle NT=1. Fibronectina foi utilizada como controle positivo de indução de migração. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando * $p \leq 0,05$ ou ** $p \leq 0,01$. N=7.

Nestes experimentos, as células migrantes também foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Não observamos alterações no padrão de migração de nenhuma das subpopulações analisadas.

Tabela 4.3: Número absoluto de subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de carbacol, testado como potencial quimioatraente

Tratamento	NT	FN	Carb 10 nM	Carb 100 nM	Carb1000 nM
Número absoluto ($\times 10^4$)					
DN	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
DP	2,0 ± 1,2	3,2 ± 0,9	2 ± 1,5	2,5 ± 1,2	2,0 ± 1,1
CD4	0,9 ± 0,6	1,9 ± 0,6	0,9 ± 0,4	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,6
CD8	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1

Valores expressos em média ± desvio padrão. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e definição de diferenças consideradas significativas. Nenhum grupo mostrou diferenças estatisticamente significativas frente ao controle. N = 4.

Com relação aos dados de percentual de input, observamos aumento da migração de células SP CD4 frente a FN, conforme mostrado na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Percentual do input nas subpopulações de timócitos após ensaio de migração celular em presença de carbacol, testado como potencial quimioatraente

Tratamento	NT	FN	Carb 10 nM	Carb 100 nM	Carb1000 nM
Percentual do input					
DN	2,4 ± 2,2	3,7 ± 3,3	2,2 ± 1,2	2,4 ± 1,8	1,7 ± 1,1
DP	0,9 ± 0,6	1,6 ± 0,5	1,1 ± 0,8	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,6
CD4	1,8 ± 0,3	5,4 ± 1,9 *	2,2 ± 0,1	3,2 ± 2,2	2,7 ± 1,4
CD8	1,6 ± 1,0	3,2 ± 2,1	1,6 ± 0,7	2,6 ± 1,9	2,2 ± 1,3

Valores expressos em média ± desvio padrão. Os dados foram analisados quanto a uma potencial diferença estatística, através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações. Diferenças foram consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando * $p \leq 0,05$. N = 3.

Tendo em vista os resultados anteriores, nos perguntamos se o pré-tratamento com arterenol seria capaz de modular a migração de timócitos frente a FN. Para isso, células foram tratadas com arterenol durante 1 hora e 30 minutos em placas de 96 poços de fundo “U” e, em seguida, tiveram sua capacidade migratória avaliada em poços com e sem FN. As análises foram realizadas após a normalização pelo controle. Conforme o esperado, há um aumento no número de células migrantes nos poços expostos à FN, sendo possível observar uma diferença em relação ao controle NT, exceto para a concentração de 10 nM (Figura 4.13). Entretanto, não houve diferença entre os poços pré-tratados com arterenol e expostos à FN, levando a conclusão de que o tratamento com arterenol não é capaz de modulação à migração induzida por FN.

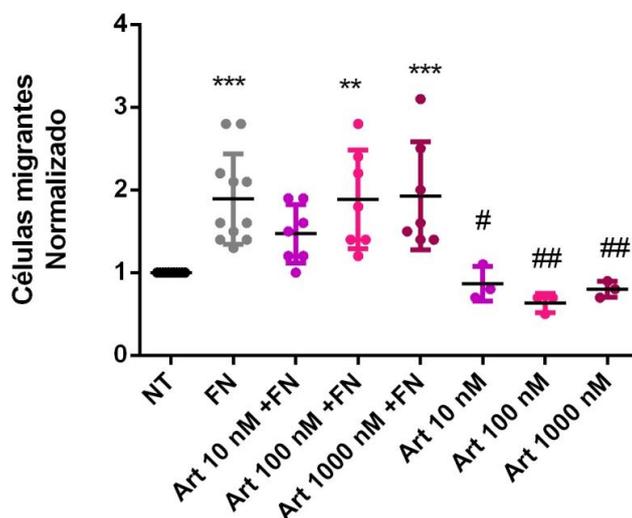


Figura 4.13: O pré-tratamento com arterenol não modula a migração de timócitos induzida por fibronectina (FN). Número de células migrantes pré-tratamento com arterenol por 1:30 e 3 horas de migração com e sem fibronectina. Normalização baseada no controle não-tratado (NT). *= amostras comparadas ao controle NT e # = amostras comparadas ao controle FN. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações. $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ ou # $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ ou ## $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ou ### $p \leq 0,001$; N = 11 para os controles; 7 para os poços expostos a FN e pré-tratados; 3 para pré-tratamento sem FN.

À semelhança do que nos referimos anteriormente, as células migrantes foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Observamos que apenas a subpopulação DP mantém um padrão semelhante ao descrito para células migrantes, onde foi possível observar aumento no número absoluto de células DP após migração induzida por FN (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Número absoluto de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com arterenol.

Tratamento	NT	FN	Art 10 nM + FN	Art 100 nM + FN	Art 1000 nM + FN	Art 10 nM	Art 100 nM	Art 1000 nM
Número absoluto (x10⁴)								
DN	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
DP	2,6 ± 0,8	5,2 ± 1,7****	3,9 ± 1,4	5,1 ± 2,1****	5,4 ± 2,8****	2,7 ± 0,6##	2,0 ± 0,4####	2,5 ± 0,2###
CD4	0,8 ± 0,4	1,7 ± 0,8	1,4 ± 0,5	1,8 ± 0,7	1,9 ± 1,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1
CD8	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1

Valores expressos em média ± desvio padrão *= amostras comparadas ao controle não-tratado (NT); # = amostras comparadas ao controle FN dentro das respectivas subpopulações. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando p ≤ 0,001 ou ### p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001 ou #### p ≤ 0,0001. N = 11 para controle NT e FN; 7 para pré-tratados com arterenol e expostos a FN e 3 para células pré-tratadas com arterenol e não expostas a FN.

Quando observado o percentual do input para células pré-tratadas com arterenol é possível observar um perfil semelhante na subpopulação SP CD4 (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Percentual de input de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com arterenol

Tratamento	NT	FN	Art 10 nM + FN	Art 100 nM + FN	Art 1000 nM + FN	Art 10 nM	Art 100 nM	Art 1000 nM
Percentual do input								
DN	2,4 ± 2,4	2,0 ± 0,8	1,8 ± 1,0	1,9 ± 1,1	2,2 ± 1,0	0,9 ± 0,7	1,0 ± 0,8	1,3 ± 0,9
DP	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,9	2,0 ± 0,7	2,6 ± 1,1	2,8 ± 1,4	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,1
CD4	2,7 ± 1,3	5,8 ± 1,8***	4,5 ± 1,4	5,9 ± 2,0**	6 ± 3,5**	1,8 ± 0,5##	1,4 ± 0,6##	1,7 ± 0,3##
CD8	3,7 ± 3,0	3,6 ± 1,9	2,9 ± 1,5	3,4 ± 1,9	3,8 ± 2,8	1,2 ± 1,1	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,5

Valores expressos em média ± desvio padrão. *= amostras comparadas ao controle NT e # = amostras comparadas ao controle FN dentro das respectivas subpopulações. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando **p ≤ 0,01 ou ## p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 ou ### p ≤ 0,001. N = 11 para control NT e FN; 7 para pré-tratados com arterenol e expostos à FN e 3 para células pré-tratadas com arterenol e não expostas à FN.

Avaliamos ainda se o pré-tratamento com carbacol poderia modular a migração frente à FN. Para isso, células foram tratadas com carbacol durante 1 hora e 30 minutos em placas de 96 poços e em seguida tiveram sua resposta migratória avaliada em poços na presença ou ausência de FN na membrana porada das câmaras de Transwell. As análises foram realizadas após normalização do experimento pelo controle. Como esperado, as células expostas à FN migraram mais. Contudo, não foi possível observar diferenças estatística entre as células pré-tratadas com

carbacol e expostas a FN, indicando que semelhante ao observado para arterenol, carbacol não foi capaz de modular a migração induzida por FN (Figura 4.14)

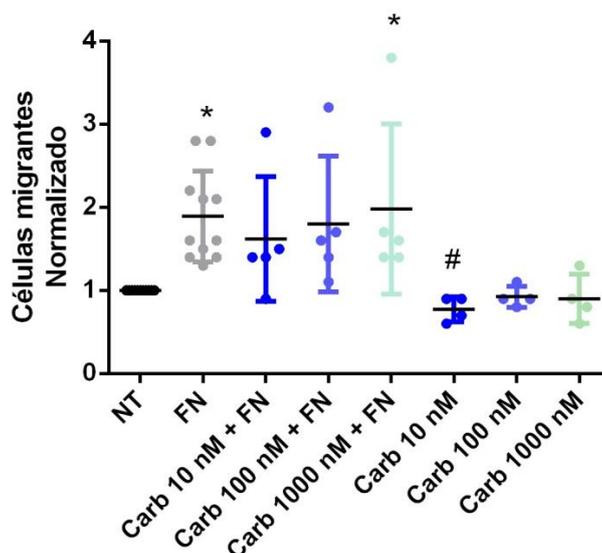


Figura 4.14: O pré-tratamento com carbacol não modula a migração induzida por fibronectina (FN). Número de células migrantes pré-tratamento com carbacol por 1:30 e 3 horas de migração na presença ou ausência de FN. Normalização baseada no controle não-tratado (NT). *= amostras comparadas ao controle NT e #= amostras comparadas ao controle FN. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando * $p \leq 0,05$ ou # $p \leq 0,05$. N = 11 para os controles; 7 para os poços expostos a FN e pré-tratados; 4 para pré-tratamento sem FN.

Com relação aos dados obtidos após o cálculo do número absoluto, foi possível observar diferença estatística na população de células DP, que apresenta um perfil semelhante ao descrito anteriormente, com aumento no número de células expostas à FN (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Número absoluto de timócitos, após ensaio de migração celular induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com carbacol.

Tratamento	NT	FN	Carb 10 nM + FN	Carb 100 nM + FN	Carb 1000 nM + FN	Carb 10 nM	Carb 100 nM	Carb1000 nM
Número absoluto ($\times 10^4$)								
DN	0,4 \pm 0,4	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
DP	2,6 \pm 0,7	5,2 \pm 1,7****	4,9 \pm 1,7****	5,7 \pm 2,3 ****	5,6 \pm 2,0****	2,6 \pm 0,7####	3 \pm 1,0 ####	2,8 \pm 1,1 ####
CD4	0,8 \pm 0,4	1,7 \pm 0,8	1,3 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	1,8 \pm 0,7	0,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
CD8	0,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0

Valores expressos em média \pm desvio padrão. *= amostras comparadas ao controle NT e #= amostras comparadas ao controle FN dentro das respectivas subpopulações. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações. **** $p \leq 0,0001$ ou #### $p \leq 0,0001$. N = 11 para control NT e FN; 5 para pré-tratados com carbacol e expostos a FN e 4 para células pré-tratadas com arterenol e não expostas à FN.

Com relação ao percentual do input, foi possível observar diferenças significativas na população SP CD4, onde novamente não é possível observar diferenças significativas entre os poços pré-tratados com carbacol e expostos à FN (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Percentual de input de timócitos após ensaio de migração celular, induzido ou não por fibronectina (FN), pré-tratando timócitos com carbacol.

Tratamento	NT	FN	Carb 10 nM + FN	Carb 100 nM + FN	Carb 1000 nM + FN	Carb 10 nM	Carb 100 nM	Carb1000 nM
Percentual do input								
DN	2,4 ± 2,4	2 ± 0,8	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,5	1,8 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,5	0,6 ± 0,5
DP	1,4 ± 0,3	2,7 ± 0,9	2,5 ± 0,9	2,9 ± 1,2	2,8 ± 1,1	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,6
CD4	2,7 ± 1,3	5,8 ± 1,8****	4,7 ± 1,4	4,4 ± 0,9	6,8 ± 2,5****	1,6 ± 0,3####	2,2 ± 0,3###	2,1 ± 0,3 ###
CD8	3,7 ± 2,9	3,6 ± 1,9	2,5 ± 0,7	2,7 ± 1,4	3,1 ± 1,0	0,9 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,2

Valores expressos em média ± desvio padrão. *= amostras comparadas ao controle NT e #= amostras comparadas ao controle FN dentro das respectivas subpopulações. Os dados foram analisados através do teste TWO-way ANOVA, seguido do teste de Tuckey para múltiplas comparações e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando **** $p \leq 0,0001$ ou #### $p \leq 0,0001$. N = 11 para control NT e FN; 5 para pré-tratados com carbacol e expostos à FN e 4 para células pré-tratadas com arterenol e não expostas a FN.

4.2.4. Ensaio de Adesão de timócitos a TECs

Como vimos anteriormente, diversos fatores podem modular a adesão de timócitos a TEC, portanto hipotetizamos que arterenol ou carbacol também seriam capazes de modular essa interação. As drogas em diferentes concentrações foram diluídas em RPMI e adicionadas a co-cultivos de timócitos e TECs (linhagem 2BH4). Após 1 hora, as células foram fixadas, coradas e contadas com o auxílio de microscópio óptico invertido. Foram contados 50 campos, com auxílio da câmera Opticam (20x) acoplada ao microscópio na objetiva de (40x). Sendo 50 campos o equivalente a uma contagem de, aproximadamente, 300-400 TECs associadas ou não a timócitos. Exemplos de tais perfis microscópicos são mostrados na figura 4.15.

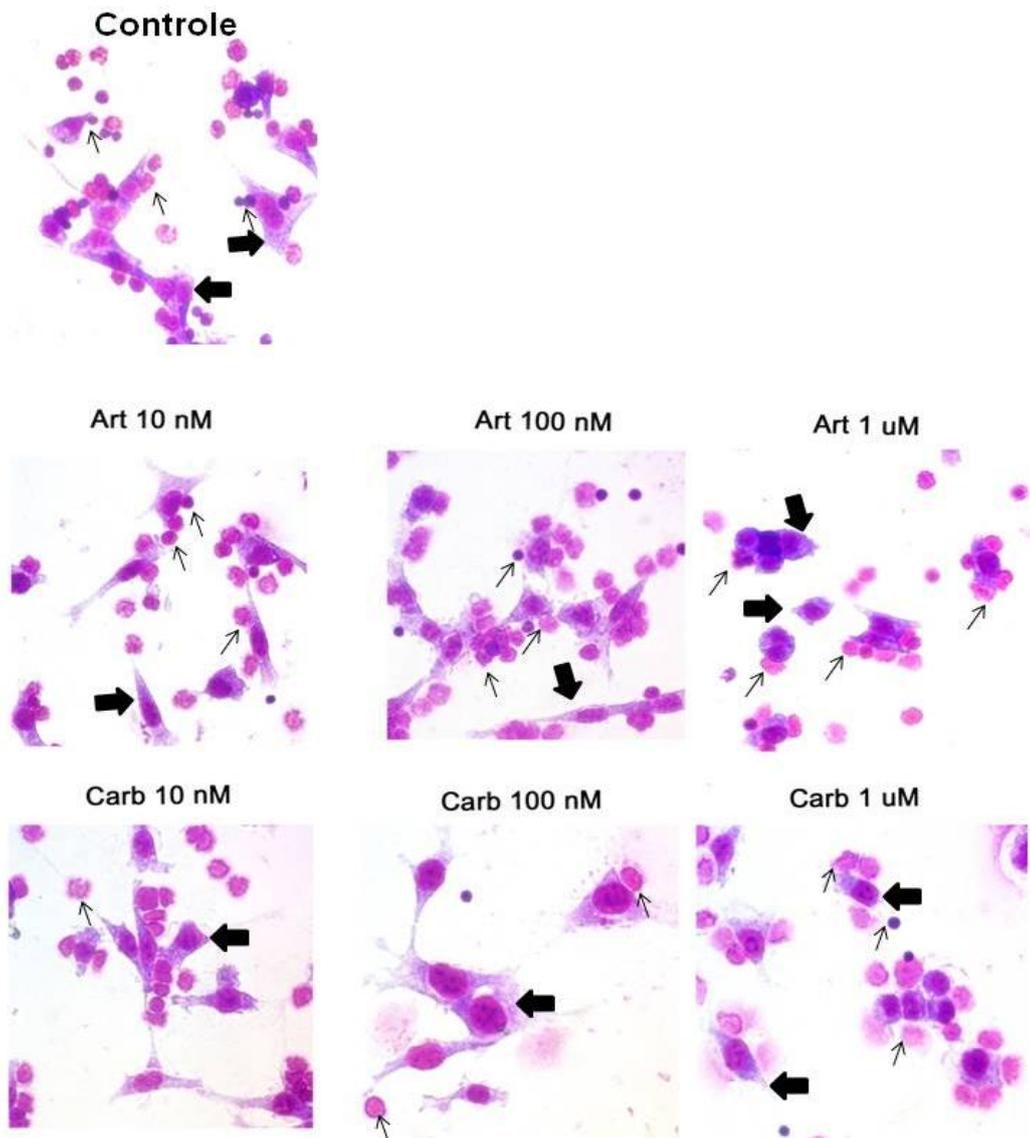


Figura 4.15: Figuras representativas da adesão timócitos às células epiteliais tímicas da linhagem 2BH4. A adesão timócitos-TEC foi realizada em meio de cultivo, na ausência ou presença de arterenol ou carbacol nas concentrações de 10, 100 nM e 1 uM. Após o ensaio de adesão as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. As fotos foram capturadas em microscópio óptico em objetiva de 40x com auxílio de câmera Opticam acoplada. Setas grossas identificam TEC e setas finas identificam timócitos.

Após contagem, foi calculado o índice de adesão (AI) de acordo com a fórmula descrita anteriormente. Observamos diminuição no AI apenas no tratamento com carbacol na concentração 10 nM ($p= 0,05$) (Figura 4.16B).

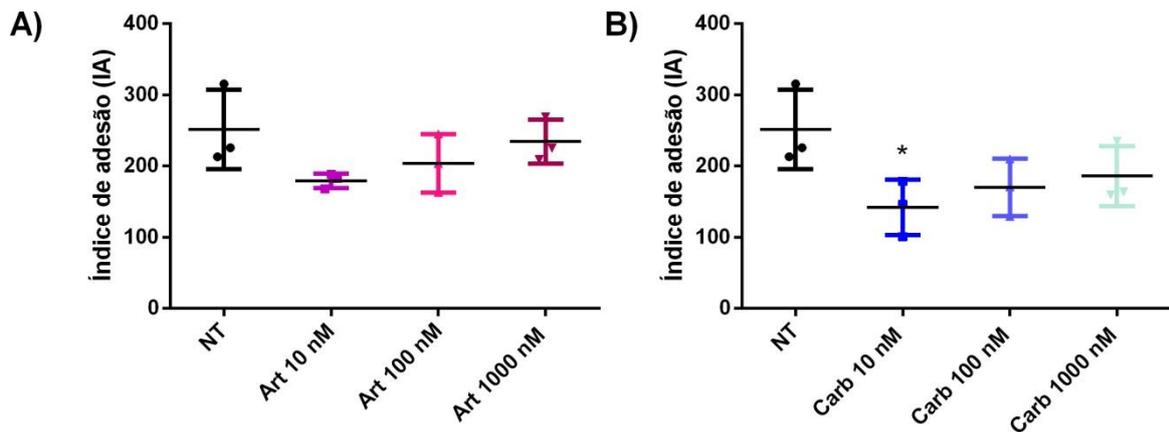


Figura 4.16: Índice de associação timócitos às células 2BH4. A) A adesão de timócitos às células 2BH4 em meio com ou sem arterenol nas concentrações 10, 100 nM e 1000 nM. B) A adesão de timócitos às células 2BH4 em meio com ou sem carbacol nas concentrações 10, 100 nM e 1000 nM. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando $*p \leq 0,05$. N=3.

Baseado em trabalhos anteriores (109), optamos por normalizar os dados. Portanto, substituímos o valor do controle NT de cada experimento do IA por 100% e partir desse valor calculamos o percentual de cada tratamento. Vimos que o tratamento com carbacol induziu uma diminuição significativa no grau de adesão entre timócitos/TECs em todas as concentrações utilizadas. O mesmo não foi observado para o tratamento com arterenol (Figura 4.14).

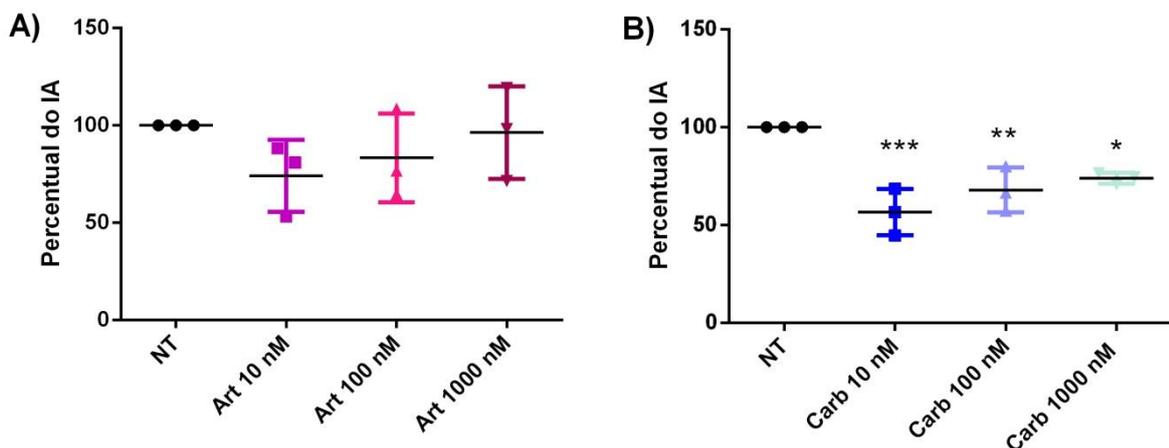


Figura 4.17: Cálculo do percentual do índice de associação (IA) TEC-timócitos após tratamento com arterenol (A) ou carbacol (B). Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle sem tratamento quando $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$. N=3.

Uma vez que carbacol pareceu induzir diminuição no grau de adesão, perguntamo-nos em qual célula, timócitos ou TECs ou ambas, esse efeito seria observado. Uma vez que a fórmula do IA leva em consideração, o número de TECs totais, TECs associadas e o número de timócitos, foi

possível montar um gráfico com o número total de células contadas ao microscópio e avaliar se carbacol teria algum efeito direto sobre as populações de timócitos e TEC. Não foi possível observar nenhuma diferença estatística no número de TECs totais, ou número de TECs associadas a timócitos. Entretanto, observamos diminuição do número de timócitos (Figura 4.17 C).

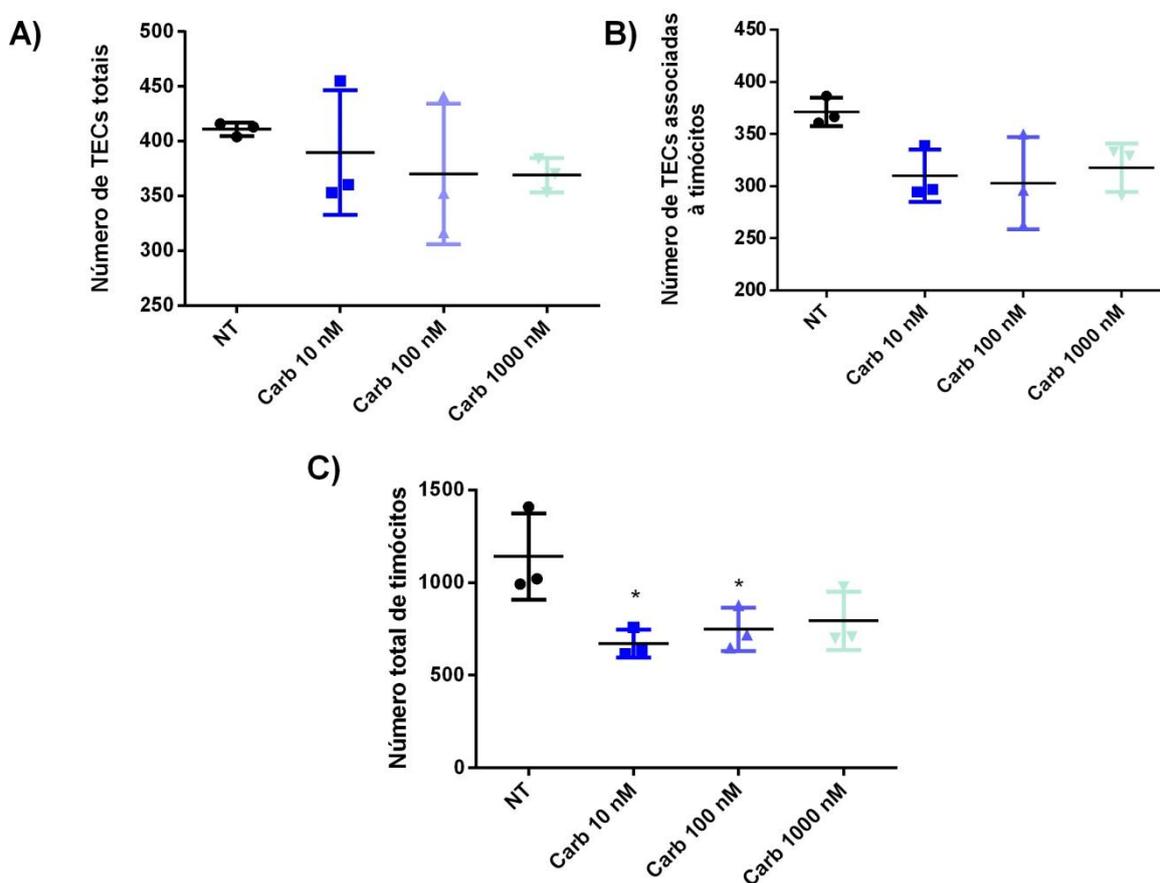


Figura 4.18: Carbacol diminui o número de timócitos aderidos a TECs. A) Número de TECs expostas a diferentes concentrações de carbacol no ensaio de adesão TECs/ timócitos. B) Número de TECs associadas a timócitos, expostas a diferentes concentrações de carbacol no ensaio de adesão TEC/timócitos. C) Número de timócitos associados a TECs, expostos a diferentes concentrações de carbacol no ensaio de adesão timócitos/TECs. Os dados foram analisados através do teste ONE-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni e as diferenças consideradas significativas em relação ao seu respectivo controle quando $*p \leq 0,05$. N=3.

Considerando o envolvimento previamente demonstrado da influência de interações mediadas por receptores de matriz extracelular na adesão TEC-timócitos, é plausível pensarmos que carbacol possa modular moléculas de adesão, diminuindo a adesão de timócitos às TECs. Procuramos então avaliar se essa modulação poderia ser observada nas TECs. Nesse sentido, TECs foram cultivadas e, após 48 horas de cultivo, foram expostas a diferentes concentrações de carbacol durante uma hora, sem adição de timócitos. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e mantidas na estufa por meia hora. Realizamos então imunomarcagem para detecção

de receptores de ECM, VLA-4 e VLA-5 (receptores de FN) e VLA-6 (receptor de LM) (Figura 4.18 A-E).

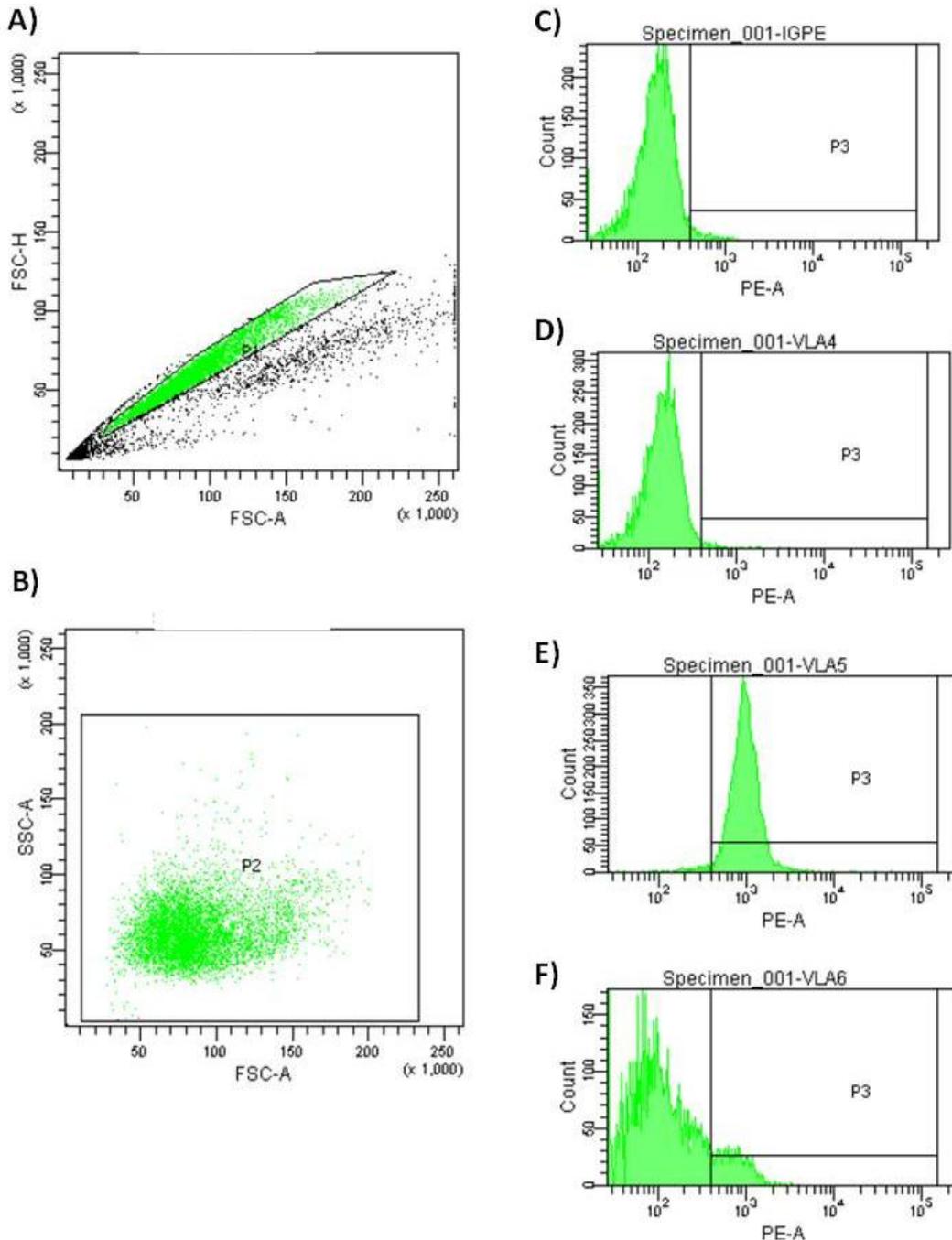


Figura 4.19: Análise citofluorimétrica da expressão dos receptores VLA-4, VLA-5 e VLA-6 em células epiteliais tímicas (TECs) da linhagem 2BH4. A análise do percentual do número relativo de células marcadas com receptores de moléculas de matriz extracelular (ECM). **A-F)** Plots representativos da análise citofluorimétrica das amostras. **A)** R1: Em verde, região de células únicas (singlets) para eliminação de aglomerados celulares (doublets) levando em consideração os parâmetros FCS-A x FCS H. **B)** Delimitação da população de TECs no dotplot tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) – região P2. **C)** Histograma da expressão no isotipo (controle negativo - IgPE). **D)** Histograma da expressão de VLA-4, **E)** VLA-5 e **F)** VLA-6 em TECs não tratadas da linhagem 2BH4.

Nossos resultados, ainda muito preliminares (N=1), sugerem que o receptor VLA-5 é o mais amplamente expresso, seguido de VLA-6 e VLA-4. Além disso, foi possível notar diminuição no percentual de células VLA-6 positivas após o tratamento com carbacol nas concentrações testadas, chegando a cair cerca de 40% no tratamento com carbacol 100 nM (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Números relativos de células epiteliais tímicas que expressam receptores de ECM, na ausência ou presença de carbacol.

Tratamentos	NT	Carb 10 nM	Carb 100 nM
Receptores	% Células positivas		
VLA 4	1,1	1,7	1,3
VLA 5	97,1	98,9	98,7
VLA 6	12,9	9,5	8

Valores expressam o número relativo de células epiteliais tímicas (TECs) positivas para os receptores de fibronectina (VLA-4 e VLA-5) e laminina (VLA-6) após o tratamento com carbacol nas concentrações 10 e 100 nM.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, estudamos o possível papel dos neurotransmissores, NA e ACh, sobre os componentes linfóide e epitelial do timo. Trabalhos anteriores mostraram que timócitos e TECs expressam receptores adrenérgicos. Foi demonstrada a presença de α e β -AR em timócitos e TECs, através da utilização de diversos métodos, porém apenas evidências farmacológicas implicam na expressão de α_2 em timócitos de ratos (54). Com relação à expressão de receptores colinérgicos, foi demonstrada a presença de nAChRs em timócitos e em linhagens de TEC humanas (99) e a presença de mAChRs em timócitos de ratos através de radioimunoensaio (110). Visando alcançar o objetivo geral proposto no presente trabalho, pareceu-nos relevante avaliar inicialmente a expressão gênica de receptores adrenérgicos e colinérgicos em células tímicas de camundongos, e para tal utilizamos a técnica de RT-PCR. Detectamos transcritos para os genes dos receptores α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} , β_2 , M1, M3, M5 e α_7 em timócitos e em diferentes linhagens de TECs.

Com relação à expressão dos receptores adrenérgicos, β_2 -AR é o mais amplamente expresso entre as células imunes (76) e majoritariamente expresso no timo de ratos (84). Em nossos resultados, timócitos DN parecem constituir a subpopulação que menos expressa β_2 -AR. Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que foi previamente descrito o possível papel desse receptor na maturação celular, sendo demonstrado que timócitos imaturos expressam quantidades menores de β -AR em comparação a células maduras ou menos sensíveis à cortisona (85).

Como mencionado anteriormente, a presença de β_2 -AR foi descrita em TECs de ratos, porém não foi feita a separação entre as populações de TECs dificultando maiores comparações. Em nosso trabalho, observamos que todas as linhagens de TECs testadas, de fenótipo misto, cortical ou medular, parecem expressar β_2 -AR. Foi possível observar também que células de fenótipo cortical (linhagem 1.4C18) apresentaram menor valor de ΔCT em comparação às TECs de fenótipo misto (linhagem 2BH4) e a TEC de fenótipo medular (linhagem 3.10). Esses dados corroboram relato anterior sobre a maior expressão de β_2 -AR na medula tímica, sendo que naquele estudo não foi relatada se essa expressão corresponderia a timócitos ou TECs (84).

A expressão de α -AR em timócitos e células T maduras apresenta dados conflitantes na literatura, sendo postulado que em condições normais PBMCs não expressariam α -ARs, tendo sua expressão restrita a órgãos linfoides, sendo expressos apenas em condições patológicas (76,87). Além disso, Kaveelars (2002) sugere que majoritariamente timócitos imaturos expressariam α_1 -AR, cuja expressão desapareceria durante a maturação celular (87). Consistente com esses dados, foi demonstrado que de fato a população majoritária de timócitos expressando α_1 -AR seriam células CD3⁺, apesar de uma pequena porcentagem de células maduras CD3^{low} e CD3^{high} também expressarem esse receptor (88). Entretanto, Bao e colaboradores (2007) demonstraram que células T maduras de linfonodos de ratos expressam RNAm para α_1 e α_2 -AR e que essa expressão pode ser modulada após a ativação dessas células pelo mitógeno ConA (111). Nossos dados apontam para a expressão de α -ARs em timócitos e nas populações maduras SP, sendo α_{1D} o mais expresso entre α -ARs, um resultado que diante da maior parte das evidências descritas não era o esperado, porém pode ser explicado por diferenças entre modelos e consistentes com trabalhos como Bao e colaboradores (2007) que mostram que células maduras podem expressar α -ARs (111). Sobre a expressão de α -ARs em TECs, foi demonstrado que a população majoritária de células que expressam α_1 -AR no timo apresentam fenótipo de células não-linfoides, do subtipo α_{1B} presentes no córtex tímico (88). Nossos resultados diferem do proposto, uma vez que todas as TECs testadas parecem expressar α_1 -AR, inclusive a linhagem de TEC de fenótipo medular. Essa discrepância pode ocorrer devido a diferença de modelos experimentais, uma vez que o estudo citado foi realizado em ratos Wistar (88), além de variações relacionadas à metodologia, já que o trabalho mencionado relata a expressão do receptor na superfície celular (marcação por imunohistoquímica) (88) e neste trabalho avaliamos a presença de RNAm nas células testadas.

Estendemos nosso estudo a subtipos de α_1 -AR. Nesse sentido é importante frisar que as investigações sobre receptores α_1 -AR precisam incluir seus diferentes subtipos, uma vez que não é claro quais subtipos são os mais expressos no timo murino, além de possíveis diferenças na localização intratímica desses subtipos, especialmente o α_2 -AR, já que as evidências do seu papel no timo são majoritariamente farmacológicas (54).

É importante ressaltar que os níveis de NA e a expressão de seus receptores podem ser modulados por hormônios sexuais (84). Marchetti e colaboradores (1994) demonstraram que tanto a densidade de β_2 -AR quanto seu RNAm estavam aumentados durante o proestro e durante a gravidez de ratos Sprague-Dawley (84). Além disso, é possível observar a diminuição de β_2 -AR em animais que sofreram ovariectomia (84). Consistente com esses dados, Pilipović e colaboradores (2016) demonstraram que ovariectomia diminuiu a concentração intratímica de NA, a densidade de β_2 -ARs e aumentou a densidade de α_1 -ARs em timócitos de ratos Albino-Oxford (AO) de dois meses de idade, indicando que hormônios sexuais podem modular a expressão de receptores adrenérgicos e a concentração intratímica de NA (112). Ademais, ainda é possível observar dimorfismo sexual entre os níveis de catecolaminas nos timos de ratos AO, onde foi observado níveis mais altos de NA e maior expressão de TH em animais machos quando comparados à fêmeas, sendo essas diferenças abolidas após a gonadectomia nos animais (81). Esses dados reforçam a importância da modulação neuro-imune-endócrina na modulação do desenvolvimento de células T, além de reforçarem a importância da utilização de modelos animais que incluam fêmeas e machos.

A expressão de nAChRs é bem descrita na literatura. Kuo e colaboradores (2002) descreveram a expressão de diversas subunidades de nAChRs em timo fetal e neonatal de camundongos C57BL/6 utilizando a metodologia RT-PCR (113). Em seu trabalho, os autores demonstram que tanto no timo pré-natal quanto no timo de animais recém nascidos é possível observar a expressão dos receptores α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_7 , β_2 e β_4 em padrão semelhante ao observado em neurônios autonômicos pós-ganglionares e das células cromafins adrenais, alvos da inervação colinérgica pré-ganglionar, sugerindo que células T possam responder de maneira semelhante ao estímulo colinérgico (113). Em nosso trabalho, vimos que todas as linhagens de TECs murinas expressam a subunidade α_7 , com alguma variação nos valores de Δ CT entre as linhagens, uma vez que pareceu mais expresso na linhagem de TEC medular (Δ CT=12,1), seguida na linhagem mista e sendo menos expressa na linhagem cortical (Δ CT=5,6 \pm 4), sugerindo que células com fenótipo medular apresentem mais transcritos que codificam a subunidade α_7 de nAChRs. Com relação à expressão de α_7 em células T, foi demonstrado que células T imaturas podem expressar esta subunidade (113), o que também observamos em nossos experimentos. Entretanto, é possível perceber que há uma diminuição na expressão de α_7 nas populações DP e SPCD4 quando comparadas às DN e às SPCD8, sugerindo que modulação da subunidade α_7 possa estar relacionada a processos de maturação celular e diferenciação no perfil CD4 e CD8. Dados na literatura apontam que α_7 pode estar relacionado à diferenciação de células T, mais especificamente da diferenciação em células CD4 Treg (64). Contudo, dados na literatura apontam que o papel da subunidade α_7 na diferenciação em Treg seria dependente da ativação prévia de

células SPCD4 via complexo TCR/CD3 (64). Além disso, outros trabalhos apontam que só foi possível observar RNAm de $\alpha 7$ em esplenócitos murinos SP CD4 e SP CD8⁺ após sua ativação (114).

Os cinco subtipos de mAChRs foram detectados em células T maduras, macrófagos e células dendríticas em humanos, camundongos e ratos (64,65). Além disso, foi detectada a expressão de mAChRs em células T esplênicas (114). Em nosso trabalho, vimos que tanto timócitos quanto TECs expressam todos os mAChRs testados. Dados relacionados à função e a expressão de mAChRs em células imunes apontam para a modulação de diversas funções, incluindo aumento de citotoxicidade, formação de IP₃ e indução de proliferação celular (64). Entretanto, dados relacionados à expressão e à função de mAChRs em células epiteliais tímicas são escassos (64,65). Contudo, o fato de ambos timócitos e TECs expressarem mAChRs, especialmente M1, pode indicar um papel importante desses receptores na comunicação entre células e conseqüentemente na modulação do desenvolvimento de células T.

O timo recebe densa inervação simpática. Fibras simpáticas chegam à cápsula e aos septos interlobulares do timo como plexos nervosos em conjunto com vasos sanguíneos, da onde divergem no córtex e penetram no parênquima (54). Além disso, células tímicas podem sintetizar catecolaminas, uma vez que expressam TH, indicando que a modulação de NA em células tímicas pode ocorrer através do estímulo nervoso ou intratímico (54,82), como o descrito anteriormente para moléculas de ação sistêmica e produção intratímica, como por exemplo, diversos hormônios. Arterenol, assim como a NA, pode interagir com α e β -ARs, tendo maior afinidade por α -AR (108). Assim, este análogo é capaz de modular processos de morte, proliferação e diferenciação de células T (82). Radojević e colaboradores (2014) demonstraram que arterenol foi capaz de diminuir a apoptose de maneira dose-dependente, sendo mais efetivo na menor concentração (10nM) (108). Diferentemente de tais autores, não observamos nesse trabalho alteração no percentual de células apoptóticas tratadas com arterenol nas concentrações 10, 100 e 1000 nM. Contudo, Del Rey e colaboradores (2003) observaram um aumento na apoptose celular de timócitos de camundongos C57BL/6 após o tratamento com NA na concentração de 1 mM por 4 horas (90). Nós observamos um fenômeno semelhante após o tratamento com arterenol, entretanto uma diferença significativa na apoptose celular foi observada apenas após 24 e 48. Essa diferença pode ser conseqüência dos valores de dispersão entre os experimentos.

Quanto à proliferação celular, dados sugerem que o efeito de arterenol depende da ativação prévia das células com um mitógeno (85,108), uma vez que o estímulo com mitógenos leva à um aumento na expressão de receptores adrenérgicos (85,111). Além disso, foi demonstrado que arterenol não modula proliferação de timócitos de rato sem estímulo por mitógenos (108).

Diferente do descrito para inervação adrenérgica, não existem evidências concretas sobre a inervação colinérgica no timo (96). Entretanto, ACh parece ser endogenamente produzida no órgão, uma vez que tanto timócitos quanto TECs expressam receptores colinérgicos e ChAT, constituindo um sistema colinérgico não-neuronal (58,59,97). Como discutido anteriormente, timócitos e TECs expressam receptores colinérgicos (58,59,64) e, portanto, ACh poderia modular interações celulares e influenciar o desenvolvimento de células T. Carbacol é um análogo não hidrolisável de ACh e age como agonista para os receptores colinérgicos, estimulando mAChRs e nAChRs, tendo maior especificidade por nAChRs (115, 116). Foi mostrado que o tratamento de ratos Sprague-Dawley com atropina induziu aumento no percentual de células apoptóticas no timo, indicando que ACh endógena inibe a apoptose de timócitos *in vivo* (97). Os autores buscaram avaliar se o tratamento de timócitos murinos com drogas colinérgicas poderia modular a apoptose *in vitro* e observaram que células submetidas a doses de carbacol de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M não apresentaram diferença no percentual de células apoptóticas (97). Consistente com esse dado, não observamos alteração na morte de timócitos após tratamento *ex-vivo* com carbacol nas concentrações 100 e 1000 nM. Entretanto, aqueles autores observaram modulação da apoptose apenas após a co-cultura de timócitos com linhagens de TECs e demonstraram que o efeito pró-apoptótico era inibido na presença de carbacol 10^{-7} , indicando que os efeitos de carbacol e consequentemente de ACh podem ser dependentes do microambiente tímico e da interação celular entre timócitos e TECs (97).

Como mencionado anteriormente, o estímulo de nAChRs e mAChRs levam a alterações bioquímicas em células T (59). O estímulo de timócitos de ratos com concentrações variadas de ACh levaram à síntese de DNA e consequente proliferação celular (117). Estes autores mostraram ainda que baixas concentrações de ACh (5×10^{-9} a 10^{-7} M) induziram estímulo independente de cálcio, enquanto que doses elevadas (5×10^{-5} M) também induziram proliferação, porém através de uma via de sinalização dependente de cálcio, indicando que o estímulo por ACh pode ocorrer segundo uma curva ampla de concentrações e através de diferentes receptores (117). Por outro lado, Rossi e colaboradores (1989) demonstraram que timócitos totais expostos à ConA não foram responsivos ao estímulo proliferativo de drogas colinérgicas (Carbacol, nicotina e Oxo-M). Ao separarem as populações em timócitos totais, PNA⁺ (timócitos imaturos) e PNA⁻ (timócitos maduros), apenas os timócitos PNA⁻ foram responsivos ao carbacol em concentração de 10^{-12} M (118). Os autores atribuíram a falta de resposta de timócitos totais principalmente à baixa porcentagem de timócitos PNA⁻ indicando uma ativação seletiva de diferentes populações de células T a drogas colinérgicas (118). Além disso, é importante ressaltar que, semelhante ao relatado para arterenol, células estimuladas com mitógenos apresentam aumento no conteúdo de ACh intracelular, aumento na expressão de ChAT e de alguns receptores colinérgicos, sugerindo

dificuldades de observar fenômenos de modulação colinérgicas em células não estimuladas (64). Consistente com essa hipótese, não observamos nenhuma modulação na proliferação celular frente ao tratamento com carbacol e sem adição de estímulos mitogênicos.

Durante o desenvolvimento de células T, os timócitos migram interagindo com diferentes componentes do microambiente tímico (1,8). Diversas moléculas podem influenciar a migração dos timócito, incluindo moléculas de ECM, citocinas e quimiocinas em diferentes concentrações e regiões dos lóbulos tímicos (1,8). Mendes-da-Cruz e colaboradores (2008) desenvolveram o conceito de migração celular multivetorial, uma vez que a migração de timócitos em uma determinada velocidade e direção é o resultado de diversos estímulos, bem como da capacidade de resposta dessas células por meio desses estímulos (28).

Dados apontam para a presença de diversas moléculas expressas no SNC e no sistema imune e sua modulação na diferenciação de células T. Lepelletier e colaboradores (2007) demonstraram que células tímicas linfoides e não-linfoides expressam o receptor Neuropilina-1 (NP1) e seu ligante semaforina-3A (119). Foi demonstrado também que o estímulo de timócitos através do TCR leva a um aumento na expressão de semaforina-3A, que induz uma diminuição na adesão de timócitos à TECs e induz a migração por um efeito repulsivo (119). É possível traçar paralelos entre o descrito para neuropilinas e semaforinas e possíveis modulações celulares induzidas por NA e ACh, uma vez que todas são moléculas descritas no SNC e que a ativação do TCR induz a um aumento na expressão de seus ligantes e receptores. Ademais, NA e ACh foram descritas como capazes de modular eventos migratórios em diversas células imunes (56,120). Por exemplo, em modelo *in vitro*, verificou-se que NA foi capaz de exercer atividade quimiotática e quimiocinética em células dendríticas imaturas, via α_1 -AR (101). Em outros modelos, viu-se que a ativação de β_2 -AR pode suprimir migração de neutrófilos a fatores sabidamente quimiotáticos (56). Foi demonstrado também que NA, na concentração 10^{-5} M, pode inibir a capacidade de movimento direcionado ao longo de um gradiente quimiotático em células T e esse efeito parece ser mediado por receptores α e β (120).

A migração de células imunes sob estímulo de ACh ocorre principalmente através da modulação do endotélio, uma vez que a ativação de M3 mAChR em células endoteliais leva à indução da produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez, atua induzindo vasodilatação nas células do músculo liso vascular (121). A vasodilatação é essencial durante processos inflamatórios, facilitando a migração de células imunes para locais de infecção (1). A ACh que estimula esse processo é produzida por células T maduras SP CD4 e SP CD8 que, após ativação, seja por estímulo do complexo CD3/TCR, citocinas ou até mesmo pelo estímulo de β_2 -AR induz aumento na expressão de ChAT e aumento na produção de ACh, que poderá mediar processos migratórios (121,122).

Sabendo das informações sobre as ações de NA e ACh na migração de células imunes e após a detecção dos receptores adrenérgicos e colinérgicos detectados nas populações celulares testadas, nos perguntamos se arterenol ou carbacol poderiam modular a migração de timócitos murinos. Avaliamos inicialmente se estes análogos teriam efeitos quimioatraentes quando adicionados no poço inferior de câmaras de Transwell. Não observamos efeitos quimioatraentes em nenhuma das concentrações testadas para arterenol ou carbacol. Em seguida, avaliamos se o pré-tratamento com as mesmas drogas seria capaz de modular a migração induzida por FN. O tratamento com arterenol ou carbacol não foi capaz de modular a migração de timócitos frente à FN.

Após a avaliação da expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos e possíveis efeitos funcionais na morte, proliferação e migração celular, avaliamos se arterenol ou carbacol poderiam modular a adesão de timócitos ao epitélio tímico. Como mencionando anteriormente, a adesão de timócitos à TECs é um processo essencial no desenvolvimento das células T, uma vez que TECs influenciam na diferenciação através de interações membrana-membrana (36). Avaliamos então se o tratamento com arterenol ou carbacol poderia modular a adesão de timócitos a TECs em modelo de co-cultivo, por uma hora. Vimos que arterenol não foi capaz de induzir alterações estatisticamente significativas na adesão timócitos a TECs. Por outro lado, carbacol na concentração 10 nM induziu diminuição nos índices de associação (IA) heterocelular. O cálculo do IA leva em consideração diversos parâmetros incluindo o número total de TECs contadas ao microscópio, o número de TECs associadas a timócitos e o número de timócitos associados a TECs. Vimos uma diminuição significativa no número de timócitos associados a TECs nas concentrações de carbacol 10 e 100 nM. Esse fenômeno não foi observado na concentração mais alta, indicando que o efeito diminui gradativamente conforme o aumento da concentração.

Por fim, iniciamos experimentos que terão como objetivo definir quais interações moleculares poderiam estar envolvidas neste efeito. Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que diversas moléculas podem influenciar na adesão de timócitos a TECs, incluindo hormônios, citocinas e ligantes e receptores de ECM (36,47,109,123). Como descrito anteriormente, moléculas de ECM são componentes importantes do microambiente tímico, mediando interações célula-célula e facilitando a migração de timócitos, que depende de processos de adesão e de-adesão entre timócitos e diferentes células microambientais (123). Dentre as moléculas de ECM responsáveis pela mediação das interações celulares estão FN, LM e colágeno tipo IV e respectivos receptores (123,124). Diversos fatores podem modular moléculas de ECM no timo (47). Demonstrou-se que o tratamento de TECs com hormônios hipofisários GH e PRL induz aumento nos níveis de FN, LM e seus receptores VLA-5 e VLA-6, respectivamente, induzindo ainda aumento no índice de associação entre timócitos/TECs (36). Esse aumento é

dependente de ECM uma vez que o bloqueio de receptores de ECM aplicados às TECs inibiu os efeitos dos hormônios (36). Poderíamos então hipotetizar que ACh pudesse mediar a diminuição no índice de associação de timócitos a TECs via regulação de ECM, nesse caso diminuindo a expressão de ligantes e/ou receptores de ECM nas TECs. Avaliamos se o tratamento com carbacol, nas mesmas condições do ensaio de adesão, porém sem a adição de timócitos, poderia influenciar a expressão de receptores de FN e LM, VLA-4, VLA-5 e VLA-6 nas TECs. Resultados preliminares indicam que carbacol parece induzir diminuição na expressão membranar do receptor VLA-6, indicando que este efeito do análogo de ACh possa diminuir a adesão de timócitos a TECs via diminuição no receptor de LM. No entanto, tal experimento carece de confirmação.

LM é parte do grupo de moléculas que pode influenciar na migração de timócitos, sendo capaz de induzir migração de timócitos isolados *ex-vivo* em câmaras de Transwell (123,125). Como proposto no modelo multivetorial de migração de timócitos, diversos fatores relacionados a migração agem de forma sinérgica contribuindo para o vetor resultante (28). Diversas moléculas foram descritas como capazes de influenciar a migração frente a LM, incluindo semaforina-3A e GH (119,124). Nossos resultados do ensaio de adesão demonstraram que o tratamento com ACh induz a diminuição da adesão de timócitos e essa diminuição parece estar relacionada com a modulação do receptor de LM VLA-6. Portanto, a hipótese de que a migração de timócitos frente a LM após o tratamento com ACh poderia também estar alterada não pode ser descartada.

6. CONCLUSÕES

Diversos trabalhos buscaram desvendar a expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos e as funções dessas moléculas no timo. Porém, dados a respeito de parâmetros essenciais para diferenciação de timócitos, como migração e adesão, são escassos na literatura, reforçando a importância desse trabalho.

Detectamos a expressão de receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1D} , α_{2C} e β_2 e de receptores colinérgicos M1, M3, M5 e α_7 em timócitos e respectivas subpopulações DN, DP, SP CD4, SPCD8, assim como em diferentes linhagens de TEC. Nas subpopulações de timócitos foi possível observar alterações no padrão de receptores que podem estar envolvidos na maturação celular, como β_2 -AR mais expresso em timócitos DP, SP CD4, SPCD8 quando comparados à subpopulação mais imatura DN. Além disso, a subunidade de nAChRs α_7 , parece mais expresso na subpopulação de DN e SPCD8. Foi observado um perfil semelhante de expressão entre timócitos e TECs, com β_2 -AR sendo o menos expresso entre as populações celulares, α_{1D} o mais expresso entre os α -ARs e M1 o mais expresso entre os receptores colinérgicos.

Por outro lado, carbacol e arterenol, nas concentrações em diferentes concentrações não modularam morte celular em timócitos em nenhum dos períodos de tempo avaliados (3, 4, 6, 24 e 48 horas). Apenas arterenol em alta concentração, 1 mM, foi capaz de induzir a apoptose.

Apesar da expressão de receptores adrenérgicos e colinérgicos em timócitos, nenhuma das drogas foi capaz de modular a proliferação celular sem estímulo prévio por mitógenos. Além disso, esses agonistas também não mostraram ter efeito quimiotático sobre os timócitos. Por fim, vimos que carbacol (mas não arterenol) foi capaz de diminuir a adesão de timócitos a TECs.

Em conjunto, nossos dados indicam que carbacol pode modular fenômenos biológicos relacionados com a adesão de timócitos a TECs, indicando assim que este evento biológico, crucial nas interações TEC-timócitos, pode ser modulado por ACh (Figura 6.1). Será importante em futuro próximo aprofundarmos estes estudos, no sentido de demonstrar que interações adesivas estão sendo alvo de modulação colinérgica, assim como a respectiva cascata de sinalização celular.

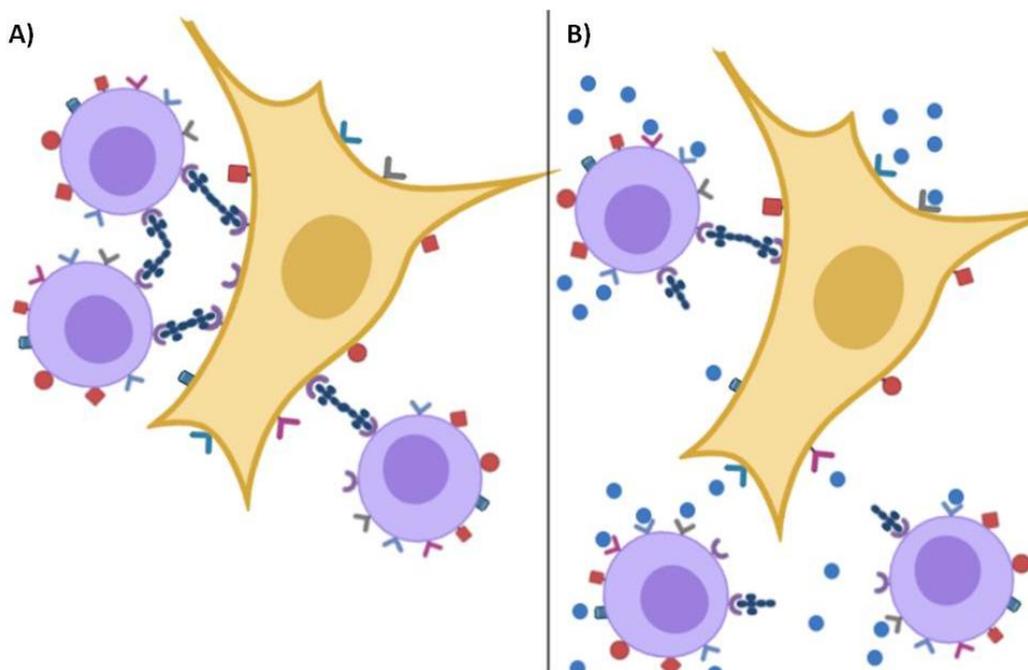


Figura 6.1: Carbacol diminui a adesão de timócitos à TECs. **A)** Timócitos (células roxas) e TECs (células amarelas) expressam receptores adrenérgicos (receptores vermelhos) e colinérgicos (receptores no formato “v” e cilíndrico) e apresentam um perfil de expressão semelhante. A adesão de timócitos à TECs depende de diversos fatores, incluindo moléculas de matriz extracelular, como lamininas (estruturas entre as células de cor azulada). **B)** A adição de carbacol (círculos azuis) nas concentrações 10, 100 e 1000 nM ao meio durante o ensaio de adesão induz à diminuição no índice de adesão. Observamos que após o tratamento com carbacol, há um número menor de timócitos associados a TECs, essa diminuição parece estar relacionada com a menor expressão o receptor de laminina (receptor em forma de “u” de cor roxa) VLA-6 em TECs. Criado através de ferramenta disponíveis em <biorender.com>.

7. REFERÊNCIAS

1. Murphy K, Travers P, Walport M, Paula A, Lambert F, Beatriz C, et al. *Imunobiologia de Janeway*. 7o ed. Artmed E, organizador. 2010. 885 p.
2. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 12a . Koogan G, editor. 2013
3. Bruss DM, Ely S. Anatomy, Head and Neck, Blood Thymus Barrier. [Updated 2019 Aug 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546601/>
4. Geenen V, Savino W. History of the Thymus: From a Vestigial Organ to the Programming of Immunological Self-Tolerance. G. A. Passos (ed.), *Thymus Transcriptome and Cell Biology*. Springer. Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.
5. Miller JFAP. Immunological Function of the Thymus. *Lancet*. 1961;278(7205):748–9.
6. Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella LF. Thymus and aging: Morphological, radiological, and functional overview. *Age (Omaha)*. 2014;36(1):313–51.
7. Miller JFAP. The thymus and the development of immunologic responsiveness. *Science*. 1964;144(3626):1544–51.
8. Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus. *Annu Rev Immunol*. 2007;25(1):649–79.
9. Matsumoto M, Rodrigues PM, Sousa L, Tsuneyama K, Matsumoto M, Alves LN. The Ins and Outs of Thymic Epithelial Cell Differentiation and Function. G. A. Passos (ed.), *Thymus Transcriptome and Cell Biology*. 35-65P. Springer. Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.
10. Boyd RL, Hugo P. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today*. 1991;
11. Savino W, Cotta-de-Almeida V, Van Buul-Offers SC, Koster JG, Dardenne M. Abnormal thymic microenvironment in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(2):100–12.
12. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev*. 2000;21(4):412–43.
13. Abramson J, Anderson G. Thymic Epithelial Cells. *Annu Rev Immunol*. 2017;35(1):85–118.

14. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6):951–61.
15. Passos, G. A., Genari, A. B., Assis, A. F., Monteleone-Cassiano, A. C., Donadi, E. A., Oliveira, E. H., et al. The Thymus as a Mirror of the Body's Gene Expression. G. A. Passos (ed.), *Thymus Transcriptome and Cell Biology*. 35-65P. Springer. Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.
16. Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Setting the stage: An anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.* 2004;25(4):210–7.
17. Yoganathan K, Chen E L Y, Singh J, Zúñiga-Pflücker C. T-Cell Development: From T-Lineage Specification to Intrathymic Maturation. G. A. Passos (ed.), *Thymus Transcriptome and Cell Biology*. 35-65P. Springer. Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.
18. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-Lineage Developmental Programme. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):9–21.
19. Yang Q, Bell JJ, Bhandoola A. T-Cell Lineage Determination. *Immunol Rev.* 2010;238(1):12–22.
20. Famili F, Wiekmeijer A-S, Staal FJ. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Futur Sci OA.* 2017;3(3).
21. Lai JCY, Wlodarska M, Liu DJ, Abraham N, Johnson P. CD45 Regulates Migration, Proliferation, and Progression of Double Negative 1 Thymocytes. *J Immunol.* 2010;185(4):2059–70.
22. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg E V. Developmental and Molecular Characterization of Emerging b - and gd -Selected Pre-T Cells in the Adult Mouse Thymus. *Immunity.* 2006;24(1):53–64.
23. James KD, Jenkinson WE, Anderson G. T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol.* 2018;104(2):275–84.
24. Passos GA, Mendes-da-Cruz DA, Oliveira EH. The thymic orchestration involving Aire, miRNAs and cell-cell interactions during the induction of central tolerance. *Front Immunol.* 2015;6(JUN):1–7.
25. Mendes-da-Cruz DA, Messias CV, Lemos JP , Savino W. Intrathymic Cell Migration: Implications in Thymocyte Development and T-Cell Repertoire Formation. G. A. Passos

- (ed.), *Thymus Transcriptome and Cell Biology*. 35-65P. Springer. Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2019.
26. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427(6972):355–60.
 27. Cotta-de-Almeida V, Serra Villa-Verde DM, Lepault F, Pléau JM, Dardenne M, Savino W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: A fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol*. 2004;34(6):1578–87.
 28. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial Abnormal Cell Migration in the NOD Mouse Thymus. *J Immunol* [Internet]. 2008;180(7):4639–47.
 29. Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz DA, et al. Thymocyte migration: An affair of multiple cellular interactions? *Brazilian J Med Biol Res*. 2003;36(8):1015–25.
 30. Pérez AR, Mendes-da-Cruz DA, Geenen V, Savino W. Editorial: Hormones, Neurotransmitters, and T-Cell Development in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(July):1–2.
 31. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):0472–83.
 32. Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, de Meis J, Ferreira Lima-Quaresma KR, et al. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol*. 2003;33(9):2439–48.
 33. Mendes-da-Cruz DA, De Meis J, Cotta-de-Almeida V, Savino W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*. 2003;5(10):825–32.
 34. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016;12(2):77–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.168>
 35. Pérez AR, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky HO, del Rey A, et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav Immun*. 2007;21(7):890–900.

36. de Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Dardenne M, Savino W. Pituitary hormones modulate cell – cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1997;76(1–2):39–49. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00031-3)
37. Lepletier A, de Carvalho VF, e Silva PMR, Villar S, Pérez AR, Savino W, et al. *Trypanosoma cruzi* Disrupts Thymic Homeostasis by Altering Intrathymic and Systemic Stress-Related Endocrine Circuitries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11):1–13.
38. Savino W, Arzt E, Dardenne M. Immunoneuroendocrine connectivity: The paradigm of the thymus- hypothalamus/pituitary axis. *Neuroimmunomodulation*. 1999;6(1–2):126–36.
39. Del Rey A, Besedovsky HO. Immune-Neuro-Endocrine Reflexes, Circuits, and Networks: Physiologic and Evolutionary Implications. *Front Horm Res*. 2017;48:1–18.
40. Procaccini C, Pucino V, De Rosa VD, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol*. 2014;5(APR):1–10.
41. Braun TP, Marks DL. Pathophysiology and treatment of inflammatory anorexia in chronic disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2010;1(2):135–45.
42. Guyton AC, Hall JE. *Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier. Vol. 12a editio. 2011.
43. Malek H, Ebadzadeh MM, Safabakhsh R, Razavi A, Zaringhalam J. Dynamics of the HPA axis and inflammatory cytokines: Insights from mathematical modeling. *Comput Biol Med*. 2015;67:1–12.
44. Goya RG, Gagnerault MC, De Moraes MCL, Savino W, Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymus function in aging mice. *Brain Behav Immun*. 1992;6(4):341–54.
45. Savino W, Dardenne M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: From physiology to therapy. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2010;10(4):434–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.002>
46. Dardenne M, Kelly PA, Bach JF, Savino W. Identification and functional activity of prolactin receptors in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(21):9700–4.
47. Villa-Verde DMS, de Mello-Coelho V, Farias-de-Oliveira DA, Dardenne M, Savino W. Pleiotropic Influence of Triiodothyronine on Thymus Physiology*. *Endocrinology* [Internet]. 1993;133(2):867–75.

48. Lepletier A, Chidgey AP, Savino W. Perspectives for Improvement of the Thymic Microenvironment through Manipulation of Thymic Epithelial Cells: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(6):504–14.
49. Ventevogel MS, Sempowski GD. Thymic Rejuvenation and Aging. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):516–22.
50. Hince M, Sakkal S, Vlahos K, Dudakov J, Boyd R, Chidgey A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cell Immunol*. 2008;252(1–2):122–38.
51. Hansenne I, Rasier G, Péqueux C, Brilot F, Renard C, Breton C, et al. Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network. *J Neuroimmunol*. 2005;158(1–2):67–75.
52. Godinho-Silva C, Cardoso F, Veiga-Fernandes H. Neuro–Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology. *Annu Rev Immunol*. 2019;37(1):19–46.
53. Pacheco R, Contreras F, Prado C. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. *Cell Interact*. 2012;
54. Roggero E, Besedovsky HO, Del Rey A. The role of the sympathetic nervous system in the thymus in health and disease. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(5):339–49.
55. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*. 2016;6(3):1239–78.
56. Bellinger DL, Lorton D. Autonomic regulation of cellular immune function. *Auton Neurosci Basic Clin* [Internet]. 2014;182:15–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2014.01.006>
57. Dantzer R. Neuroimmune interactions: From the brain to the immune system and vice versa. *Physiol Rev*. 2018;98(1):477–504.
58. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* [Internet]. 2004;9(1–3):2063.
59. Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*. 2000;86(1):29–48.
60. Ventura ALM., Abreu PA., Freitas RCC., Sathler PC., Loureiro N, Castro HC. Sistema colinérgico: Revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. Vol. 37, *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2010. p. 66–72.

61. Rinner I, Kawashima K, Schauenstein K. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *J Neuroimmunol.* 1998;81(1–2):31–7.
62. Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, et al. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res.* 1996;44(1):66–72.
63. Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci [Internet].* 2007;80(24–25):2314–9
64. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front Immunol.* 2017;8(SEP):1–18.
65. Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci [Internet].* 2017;134(1):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>
66. Fujii T, Kawashima K. Ca²⁺ oscillation and c-fos gene expression induced via muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362(1):14–21.
67. Wang H, Yu M, Ochani M, Amelia CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003;421(6921):384–8.
68. Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Grando SA, et al. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene *knockout* mice. *J Neuroimmunol.* 2007;189(1–2):69–74.
69. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. 2007;117(2).
70. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med.* 2006;203(7):1623–9.
71. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):418–28.

72. Bratton BO, Martelli D, McKinley MJ, Trevaks D, Anderson CR, McCallen RM. Neural regulation of inflammation: No neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. *Exp Physiol*. 2012;97(11):1180–5.
73. Vida G, Peña G, Deitch EA, Ulloa L. α 7-Cholinergic Receptor Mediates Vagal Induction of Splenic Norepinephrine. *J Immunol*. 2011;186(7):4340–6.
74. Vida G, Peña G, Kanashiro A, del Rocio Thompson-Bonilla M, Palange D, Deitch EA, et al. β 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. *FASEB J*. 2011;25(12):4476–85.
75. Bellinger D L, Nance D M, Lorton D. Innervation of the Immune System. Kusnecov A W e H. Anisman (ed) *The Wiley-Blackwell Handbook Of Psychoneuroimmunology*. 24-72p. 2014 John Wiley & Sons, Ltd
76. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. Vol. 52, *Pharmacological Reviews*. 2000. p. 595–638.
77. Swanson MA, Lee WT, Sanders VM. IFN- γ Production by Th1 Cells Generated from Naive CD4 + T Cells Exposed to Norepinephrine . *J Immunol*. 2001;166(1):232–40.
78. Alaniz RC, Thomas SA, Perez-Melgosa M, Mueller K, Farr AG, Palmiter RD, et al. Dopamine β -hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2274–8.
79. Haskó G, Elenkov IJ, Vizi ES. Presynaptic receptors involved in the modulation of release of noradrenaline from the sympathetic nerve terminals of the rat thymus. *Immunol Lett*. 1995;47(1–2):133–7.
80. Leposavić G, Radojević K, Vidić-Danković B, Kosec D, Pilipović I, Perišić M. Early postnatal castration affects thymic and thymocyte noradrenaline levels and β -adrenoceptor-mediated influence on the thymopoiesis in adult rats. *J Neuroimmunol*. 2007;182(1–2):100–15.
81. Pilipović I, Vidić-Danković B, Perišić M, Radojević K, Čolić M, Todorović V, et al. Sexual dimorphism in the catecholamine-containing thymus microenvironment: A role for gonadal hormones. *J Neuroimmunol*. 2008;195(1–2):7–20.
82. Leposavić G, Pilipović I, Radojević K, Pešić V, Perišić M, Kosec D. Catecholamines as immunomodulators: A role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2008;144(1–2):1–12.

83. Singh U, Millson DS, Owen JJT, Smith PA. Identification of β adrenoceptors during thymocyte ontogeny in mice. *Eur J Immunol*. 1979;9(1):31–5.
84. Marchetti B, Concetta M, Paradis P, Bouvier M. Characterization, expression, and hormonal control of a Thymic B2-Adrenergic receptor. *Am Physiol Soc* [Internet]. 1994;267(5):E718–31. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.5.E718>
85. Radojčić T, Baird S, Darko D, Smith D, Bulloch K. Changes in β -adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: An analysis of T cells and macrophages. *J Neurosci Res*. 1991;30(2):328–35.
86. Kurz B, Feindt J, Von Gaudecker B, Kranz A, Loppnow H, Mentlein R. β -Adrenoceptor-mediated effects in rat cultured thymic epithelial cells. *Br J Pharmacol*. 1997;120(8):1401–8.
87. Kavelaars A. Regulated expression of α -1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2002;16(6):799–807. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00033-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00033-8)
88. Pešić V, Kosec D, Radojević K, Pilipović I, Perišić M, Vidić-Danković B, et al. Expression of α 1-adrenoceptors on thymic cells and their role in fine tuning of thymopoiesis. *J Neuroimmunol*. 2009;214(1–2):55–66
89. Lepasavić G, Arsenović-Ranin N, Radojević K, Kosec D, Pešić V, Vidić-Danković B, et al. Characterization of thymocyte phenotypic alterations induced by long-lasting β -adrenoceptor blockade in vivo and its effects on thymocyte proliferation and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2006;285(1–2):87–99.
90. Del Rey A, Kabiersch A, Petzoldt S, Besedovsky HO. Sympathetic abnormalities during autoimmune processes: potential relevance of noradrenaline-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2003;992:158–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12794055
91. Hueber AO, Bernard AM, Langlet-El Battari C, Marguet D, Massol P, Foa C, et al. Thymocytes in Thy-1(-/-) mice show augmented TCR signaling and impaired differentiation. *Curr Biol*. 1997;7(9):705–8.
92. Von Patay B, Kurz B, Mentlein R. Effect of transmitters and co-transmitters of the sympathetic nervous system on interleukin-6 synthesis in thymic epithelial cells. *Neuroimmunomodulation*. 1999;6(1–2):45–50.

93. Leposavić G, Pešić V, Stojić Z, Radojević K, Arsenović N, Kosec D, et al. Age-associated plasticity of α 1-adrenoceptor-mediated tuning of T-cell development. *Exp Gerontol.* 2010;45:918–35.
94. Fatani JA, Qayyum MA, Mehta L, Singh U. Parasympathetic innervation of the thymus: A histochemical and immunocytochemical study. *J Anat.* 1986;VOL. 147:115–9.
95. Nance DM, Hopkins DA, Bieger D. Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. *Brain Behav Immun.* 1987;1(2):134–47.
96. Nance DM, Sanders VM. Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987-2007). *Brain Behav Immun.* 2007;86(12):736–745.
97. Rinner I, Globerson A, Kawashima K, Korsatko W, Schauenstein K. A possible role for acetylcholine in the dialogue between thymocytes and thymic stroma. *Neuroimmunomodulation.* 1999;6(1–2):51–5.
98. Panneck AR, Rafiq A, Schütz B, Soultanova A, Deckmann K, Chubanov V, et al. Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell Tissue Res.* 2014;358(3):737–48.
99. Mihovilovic M, Butterworth-Robinette J. Thymic epithelial cell line expresses transcripts encoding α -3, α -5 and β -4 subunits of acetylcholine receptors, responds to cholinergic agents and expresses choline acetyl transferase. An in vitro system to investigate thymic cholinergic mechanisms. *J Neuroimmunol.* 2001;117(1–2):58–67.
100. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* 2003;74(6):675–96.
101. Maestroni GJM. Dendritic Cell Migration Controlled by α 1b -Adrenergic Receptors. *J Exp Med.* 2000;(165):6743–7.
102. Amarante-Mendes JGP, Chammas R, Abrahamsohn P, Patel PC, Potworowski EF, Macedo M. Cloning of a Thymic Stromal Cell Capable of Protecting Thymocytes from Apoptosis. *Cell Immunol* [Internet]. 1995;161(2):173–80. Available from: <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1024>
103. Terra-Granado E, Berbert LR, De Meis J, Nomizo R, Martins VR, Savino W, et al. Is there a role for cellular prion protein in intrathymic T cell differentiation and migration? *Neuroimmunomodulation.* 2007;14(3–4):213–9.
104. Cotrim-sousa L, Freire-assis A, Pezzi N, Paranhos P. Adhesion between medullary thymic epithelial cells and thymocytes is regulated by miR-181b-5p and miR-30b *. *Mol Immunol*

[Internet]. 2019;114(February):600–11. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.010>

105. Lemos JP, Smaniotto S, Messias C V., Moreira OC, Cotta-de-almeida V, Dardenne M, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 is involved in non-obese diabetic mouse thymocyte migration disorders. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1–14.
106. Smith ML, Oliveira Souza FG, Bruce KS, Strang CE, Morley BJ, Keyser KT. Acetylcholine receptors in the retinas of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor knockout mouse. *Mol Vis.* 2014;20(January):1328–56.
107. Aihara T, Nakamura Y, Taketo MM, Matsui M, Okabe S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M 3 and M 5 but not M 1 muscarinic acetylcholine receptors in mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(6 51-6):1199–207.
108. Radojević K, Rakin A, Pilipović I, Djikić J, Bufan B, Vujnović I, et al. Effects of catecholamines on thymocyte apoptosis and proliferation depend on thymocyte microenvironment. 2014;
109. Lagrota-Cândido JM, Villa-Verde DMS, Vanderlei FH, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon- γ modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. *Cell Immunol.* 1996;170(2):235–44.
110. Kubera M, Skowron-Cendrzak A, Mazur-Kolecka B, Bubak-Satora M, Basta-Kaim A, Laskowska-Bozek H, et al. Stress-induced changes in muscarinic and β -adrenergic binding sites on rat thymocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 1992;37(3):229–35.
111. Bao JY, Huang Y, Wang F, Peng YP, Qiu YH. Expression of α -AR subtypes in T lymphocytes and role of the α -ARs in mediating modulation of T cell function. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14(6):344–53.
112. Pilipović I, Vujnović I, Arsenović-Ranin N, Dimitrijević M, Kosec D, Stojić-Vukanić Z, et al. Peripubertal ovariectomy influences thymic adrenergic network plasticity in adult rats. *J Neuroimmunol.* 2016;297:103–16.
113. Kuo YP, Lucero L, Michaels J, DeLuca D, Lukas RJ. Differential expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in fetal and neonatal mouse thymus. *J Neuroimmunol.* 2002;130(1–2):140–54.
114. Qian J, Galitovskiy V, Chernyavsky AI, Marchenko S, Grando SA. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naive CD4 T cells

- toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes Immun* [Internet]. 2011;12(3):222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/gene.2010.72>
115. Shiroma LO, Costa VP. Parasympathomimetics. In: *Glaucoma: Second Edition*. 2015. p. 577–82.
 116. RANG, H. P. et al. *Rang & Dale Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
 117. MacManus JP., Boynton AL., Whitfield JF, Gillian DJ., Isaacs RJ. Acetylcholine-induced Initiation of Thymic Lymphoblast DNA Synthesis and Proliferation. *J Cell Physiol*. 1975;(85):321–30.
 118. Rossi A, Tria MA, Baschieri S, Doria G, Frasca D. Cholinergic Agonists Selectively Induce Proliferative Responses in the Mature Subpopulation of Murine Thymocytes. *Neurosci Res*. 1989;24:369–73.
 119. Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DMS, Nogueira AC, Dardenne M, et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5545–50.
 120. García JJ, Sáez M del C, De la Fuente M, Ortega E. Noradrenaline and its end metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol inhibit lymphocyte chemotaxis: Role of alpha- and beta-adrenoreceptors. *Mol Cell Biochem*. 2003;254(1–2):305–9.
 121. Cox MA, Bassi C, Saunders ME, Nechanitzky R, Morgado-Palacin I, Zheng C, et al. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. *J Intern Med*. 2020;287(2):120–33.
 122. Cox MA, Duncan GS, Lin GHY, Steinberg BE, Yu LX, Brenner D, et al. Choline acetyltransferase-expressing T cells are required to control chronic viral infection. *Science* (80-). 2019;363(6427):639–44.
 123. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Ferreira Golbert DC, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. Laminin-mediated interactions in thymocyte migration and development. *Front Immunol*. 2015;6(NOV).
 124. Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhes Migr*. 2010;4(3):382–90.
 125. Smaniotto S, De Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*. 2005;146(7):3005–