



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

TESE DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**ESTUDO DO PAPEL DESEMPENHADO PELAS
QUIMIOCINAS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA DAS CÉLULAS T**

RICARDO CABRITA DA SILVA

FARO 2009



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

TESE DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**ESTUDO DO PAPEL DESEMPENHADO PELAS
QUIMIOCINAS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA DAS CÉLULAS T**

RICARDO CABRITA DA SILVA

Orientador:

Dr. Nuno Rodrigues dos Santos

FARO 2009

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Ciências Biomédicas
Área de Biologia Molecular pela Universidade do Algarve

MSc Thesis in Biomedical Science
Area of Molecular Biology by the Universidade do Algarve

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusive responsabilidade do seu Autor

The contents of this dissertation are of the exclusive responsibility of the Author

(Ricardo Cabrita da Silva)

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer ao Dr. Nuno Rodrigues dos Santos pela grande oportunidade ao incluir-me no seu projecto e pela transmissão de conhecimentos durante esta fase. Pela sua amizade, disponibilidade e paciência que tornou este percurso mais enriquecedor.

Ao Professor José Belo pelos conselhos dados para escolha da tese ao longo do mestrado, e que desta forma ser possível entrar num grupo, CBME, que fez de mim um melhor profissional.

À Prof.^a Dr. Leonor Cancela e à Prof.^a Dr. Ana Barbosa pela amizade, apoio e disponibilidade durante a minha licenciatura de Biologia Marinha, ajudando-me a fazer as minhas escolhas.

A toda a minha família que me apoiaram e aconselharam neste percurso académico.

Aos meus pais, por todo o amor, apoio, amizade e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

À Emilie, do fundo do coração, obrigado pelo carinho, amizade e companhia. A toda a paciência e palavras de apoio que me fizeram atravessar os momentos mais difíceis. Nunca te esquecerei.

Aos elementos do GEAQUA, aos quais desejo o melhor, pela amizade durante todos estes anos.

Aos meus amigos da cidade de Albufeira e do resto do País que fui tendo o prazer de conhecer e que tornaram esta experiência melhor.

Por fim, a todos as pessoas do curso de Biologia Marinha e Pescas e mestrado em Ciências Biomédicas que tive oportunidade de conhecer, quero agradecer por toda amizade.

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda das células T é uma neoplasia que afecta um terço das crianças diagnosticadas com cancro e até hoje não existem certezas da sua origem. As quimiocinas são moléculas com capacidade quimioattractiva e estão associadas a processos biológicos tais como migração, desenvolvimento e transmigração.

Nos últimos anos têm-se vindo a descobrir que algumas quimiocinas aparecem sobre-expressas em diversos cancros e parecem desempenhar funções na sobrevivência celular, migração, invasão e metastização.

Por isso, torna-se fundamental estudar o papel, por estas desempenhado, na leucemia linfoblástica aguda das células T.

Neste trabalho analisámos a expressão de 4 receptores de quimiocinas (CCR7, CCR9, CXCR4 e PSGL-1) através de RT-PCR (semi-quantitativo) e PCR em tempo real (quantitativo) em linhas celulares de leucemia linfoblástica das células T. Foi realizado a análise de imunofluorescência por citometria de fluxo das proteínas CCR7 e CD3ε. E por fim, efectuámos a detecção de proteínas por *Western Blot*.

A amplificação do cDNA do CXCR4 e PSGL-1 foi detectada em todas as linhas celulares LLA-T, assim como o cDNA do CCR9 que apenas não foi detectado em uma linha celular LLA-T. Quanto ao CCR7, verificou-se a presença de produto de PCR em 50% das linhas celulares LLA-T. Numa análise quantitativa por PCR em tempo real, observámos que 5 linhas celulares mostraram expressão superiores em relação ao controlo. Na expressão de CCR9, foram obtidos valores muito superiores em comparação aos do CCR7. As análises por citometria de fluxo, mostraram uma detecção fraca da proteína CCR7 em 4 linhas celulares LLA-T, mesmo quando a concentração utilizada ter sido 20× inferior à recomendada.

As proteínas estudadas neste trabalho, e os respectivos ligandos, estão cada vez mais estudados em cancro tendo sido demonstrado funções muito importantes nestas patologias. A detecção da expressão destas proteínas leva-nos a crer que estas

podem possuir um papel importante para o desenvolvimento, sobrevivência e invasão das células tumorais. As diferenças de expressão entre CCR7 e CCR9 aparentam ter associação porque a elevada expressão de CCR9 parece coincide com baixa expressão de CCR7.

Apesar dos resultados irem na direcção da hipótese deste trabalho, mais estudos precisam ser feitos para além de análise de expressão. No futuro, é preciso compreender melhor os efeitos biológicos na LLA-T relacionados com estas quimiocinas.

ABSTRACT

T cell acute lymphoblastic leukemia is a neoplasia that affects 1 in 3 children in cancer diagnoses and until today the factors causing it are unknown. Chemokines are molecules with chemotaxi capability and are associated on biological processes as migration, developing and transmigration.

In the past years, findings showing overexpression of chemokines in several types of cancer might associate this proteins in celular survival, migration, invasion and metastization.

For this reason, the importance to study the role of chemokines in T-ALL is fundamental.

In this work, we analysed the expression of 4 proteins (CCR7, CCR9, CXCR4 and PSGL-1) by RT-PCR (semi-quantitive) and real-time PCR (quantitive) in T-ALL cell lines. We also performed immunofluorescency analysis by flow cytometry of CCR7 and CD3ε proteins. Finally, we used Western Blot to detect specific proteins.

cDNA amplification of CXCR4 and PSGL-1 showed that all T-ALL cell lines produces the mRNA of this proteins, as well as cDNA of CCR9 that only failed detection in one cell line. The PCR product in CCR7 was present in 50% of T-ALL cell lines tested. In real time PCR, we observed that 5 cell lines obtained the highest expression values in comparison of control. The CCR9 expression showed values much higher than the expression of CCR7. Cytometry flow analysis, detected a very weak fluorescence signal of CCR7 protein in 4 T-ALL cell lines, even when the concentration of the antibody was 20x inferior of the recommended. The chemokines studied in this work takes us to believe that this proteins have an important role for the developing, survival and invasion of tumoral cells. The differences of expression between CCR7 and CCR9 seems to be associated because cells with high expression of CCR7 coincide with low levels of CCR9 expression. Even so the results support the hypothesis of this work, more studies need to be done that goes beyond expression assays. In the future, it's necessary comprehend the biological effects through this chemokines.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução.....	13
1.1. Hematopoiese	13
1.2. Desenvolvimento dos linfócitos T	2
1.3. Quimiocinas.....	4
1.3.1. Sistema de nomenclatura.....	4
1.3.2. Estrutura das quimiocinas	7
1.3.3. Receptores	9
1.3.4. Sinalização nas quimiocinas	12
1.3.5. Regulação das células T e intravasão	14
1.3.6. As quimiocinas e o cancro	17
1.3.7. Quimiocinas e LLA-T	18
1.3.7.1. CCR7	18
1.3.7.1. CCR9	19
1.3.7.2. CXCR4	21
1.3.7.3. PSGL-1	21
1.4. RelB e LLA-T.....	22
1.5. O microambiente e o cancro.....	24
1.6. Objectivos.....	25
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Linhas celulares	26
2.2. Cultura.....	26
2.3. Congelação de células	27
2.4. Extracção de RNA	27
2.5. RT-PCR.....	28
2.6. Extracção de proteína com tampão RIPA.....	29
2.7. SDS-PAGE.....	30
2.8. Western Blotting	31
2.9. Transformação de bactérias.....	31
2.10. Extracção de plasmídeo.....	32

2.11.	<i>Real time</i> PCR	33
2.12.	Citometria de fluxo.....	34
2.13.	Transfecção das células 293T	35
3.	Resultados.....	36
3.1.	Determinação dos níveis de expressão dos genes CCR7, CCR9, CXCR4 e PSGL-1 por RT-PCR semi-quantitativo	36
3.2.	Determinação dos níveis de expressão dos genes CCR7, CCR9 e PSGL-1 por PCR em tempo real quantitativo	39
3.3.	Detecção das proteínas CD3ε e CCR7 por citometria de fluxo.....	44
3.4.	Detecção de proteínas por <i>Western Blotting</i>	47
4.	Discussão.....	49
4.1.	Expressão de CCR7	49
4.2.	Expressão de PSGL-1	50
4.3.	Expressão de CXCR4	52
4.4.	Expressão de CCR9	53
4.5.	Detecção de proteínas por <i>Western Blotting</i>	54
4.6.	Detecção das proteínas CD3ε e CCR7 por citometria de fluxo.....	55
4.7.	Activação de CCR7?	56
5.	Perpectivas futuras	58
6.	Referências.....	59
7.	Anexos.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hematopoiese	2
Figura 2 - Esquema resumido do desenvolvimento das células T.....	3
Figura 3 - Receptores das quimiocinas e os seus ligandos.....	7
Figura 4 - Estrutura tri-dimensional de uma quimiocina.....	9
Figura 5 - Receptor de quimiocina.	10
Figura 6 - Sequência de eventos durante a activação do receptor.	11
Figura 7 - Equilíbrio dos receptores e a estabilização por disponibilidade de quimiocinas.	13
Figura 8 - Via de sinalização das quimiocinas.....	14
Figura 9 - Migração e desenvolvimento dos timócitos ao longo do timo.	15
Figura 10 - Via de sinalização do CCR7.....	19
Figura 11 - Activação do receptor CXCR4.....	21
Figura 12 - Resumo das vias de sinalização do NF-κB.	24
Figura 13 - Análise da expressão de mRNA por RT-PCR dos genes CCR7, CCR9, CXCR4 e PSGL-1.	38
Figura 14 - Caracterização da expressão de CCR7, por PCR em tempo real, das linhas celulares em estudo.	41
Figura 15 - Caracterização da expressão de CCR9 por PCR em tempo real.	42
Figura 16 - Caracterização da expressão de PSGL-1 por PCR em tempo real.....	43
Figura 17 - Células derivadas de LLA-T marcadas com anti-CD3-FITC e analisadas através da análise por citometria de fluxo.....	45
Figura 18 - Resultados de citometria de fluxo das linhas celulares LLA-T marcadas com IgG-APC e CCR7-APC.	46
Figura 19 - Resultados da análise de Western blot das linhas celulares com os anticorpos contra α-tubulina e PSGL-1.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CEH – células estaminais hematopoéticas

CET – células epiteliais do timo

DN – *double negative*

DP – *double positive*

ELR – motivo Glu-Leu-Arg

FKHR – factor de transcrição *forkhead*

GDP – guanosina difosfato

GTP – guanosina trifosfato

GSK-3 β – cinase 3 β da sintetase do glicogénio

IgG – imunoglobulina

I κ – inibidores da NF- κ B

IL-7 – interleucina 7

JAK – cinase Janus

JNK1 – cinase terminal-NH2 c-Jun

LFA-1 - *lymphocyte function-associated antigen 1*

LLA-T – leucemia linfoblástica aguda das células T

MAPK – proteína cinase *mitogen-activated*

MGSA – actividade estimulatória do crescimento de melanoma

mRNA – RNA mensageiro

NF- κ B - factor nuclear kappa B

NK – *natural killers*

PI3K – fosfoinosítídeo 3-cinase

PLC β – fosfolipase C beta

PSGL-1 – glicoproteína ligando da selectina P

SCY – *small secreted cytokines*

SP – *single positive*

STAT - transdutores de sinalização e transactivadores de transcrição

TCR – receptor das células T

TEL - *translocated ets leukemia*

VEGF – factor de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

Na medula óssea, a formação de células sanguíneas depende do controlo rigoroso da proliferação, diferenciação e sobrevivência. A expansão de células malignas imaturas pode afectar a população de células sanguíneas saudável e resultar em problemas como anemia (deficiência nas células vermelhas), hemorragias (deficiência nas plaquetas) e aumento do risco de infecções (deficiência nas células normais brancas). Mais tarde pode ocorrer a libertação destas células malignas e infiltrar-se em órgãos como o fígado, baço e rins. Esta doença designa-se leucemia e pacientes sem tratamento sucumbem (Van Vlierberghe *et al.* 2008).

A leucemia é uma patologia hematológica que afecta um terço das crianças diagnosticadas com cancro, sendo a leucemia linfoblástica aguda a maior representante de todas (3 em cada 4 crianças). O pico de incidência é entre 1 a 4 anos. O sexo masculino é ligeiramente mais afectado e os caucasianos mais afectados que os de raça negra. Por estes e outros factores não há certezas da origem desta leucemia. Todos os anos são diagnosticadas 400 crianças no Reino Unido e 4000 nos Estados Unidos da América (www.cancer.org), tornando-se assim muito importante saber quais os mecanismos de desenvolvimento e os factores intrínsecos desta doença.

1.1. Hematopoiese

Como dito anteriormente, a leucemia tem origem em células hematopoéticas, e como o nome indica, a leucemia linfoblástica aguda das células T, não é mais do que uma expansão clonal de um sub-tipo destas. Todos os componentes celulares do sangue são originários do mesmo ancestral comum, as células estaminais hematopoéticas (CEH). Estas representam cerca de 0,01 a 0,05% da população total da medula óssea, havendo em média uma produção de 10^{11} a 10^{12} células diariamente.

O processo no qual se originam as células sanguíneas designa-se por hematopoiese. As CEH têm a capacidade de dar origem à linhagem linfóide e mielóide.

A primeira vai resultar em células (0,01% - 0,05%) *ral killer*, enquanto que a segunda dá origem macrófagos, neutrófilos, eosinófilo, basófilos, megacariócitos e eritrócitos (Figura 1).

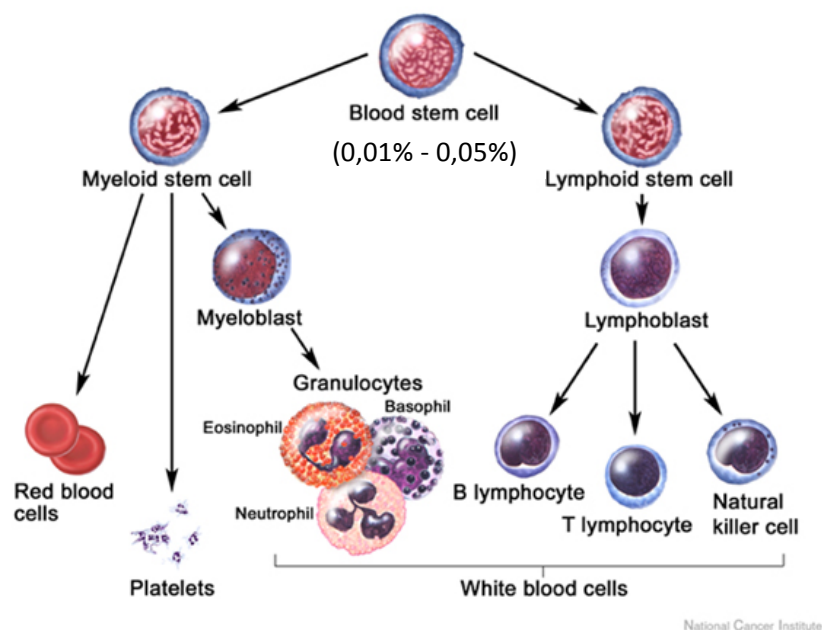


Figura 1 - Hematopoiese

1.2. Desenvolvimento dos linfócitos T

No desenvolvimento normal das células T as células progenitoras linfóides migram da medula óssea para o timo (Rosenkilde *et al.* 2004), onde estas diferenciam-se em timócitos e por fim em linfócitos T maduros (Blackburn *et al.* 2004; Takahama 2006). O que torna o timo um local importante para o sistema imunitário.

A selecção e diferenciação das células T são mediadas por vários processos complexos, dependentes do microambiente tímico. Os linfócitos vão deslocar-se ao longo do timo e sofrer várias interações linfo-estroma determinantes para a regulação da selecção e desenvolvimento das células T (Blackburn *et al.* 2004; Witt *et al.* 2004; Takahama 2006). Estas distintas interações dentro do timo tornam necessária a existência de multi-microambientes. Os timócitos migrantes comunicam com as células estromais a curta distância e a longa distância, passando por vários processos decisivos para a sua sobrevivência. Uma pequena fracção dos timócitos que

começam esta jornada consegue sobreviver ao ultrapassar as diferentes etapas de selecção e sair do timo (1-3%) (Blackburn *et al.* 2004; Takahama 2006).

O estroma do timo está dividido em duas regiões principais ricas em células epiteliais do timo (CET) distintas ao nível estrutural e fenotípico, a medula e o córtex (Figura 2). Existem vários tipos de CET no córtex e medula que medeiam aspectos específicos na progressão da maturação dos timócitos. O percurso fenotípico dos linfócitos começa com *double negative* (DN) ($CD4^-/CD8^-$), evoluindo para *double positive* (DP) ($CD4^+/CD8^+$) e por fim seleccionadas como *single positive* ($CD4^+/CD8^-$ ou $CD4^-/CD8^+$) (Blackburn *et al.* 2004; Takahama 2006). Na figura 2 podemos ver a trajectória dos timócitos ao longo do timo. Este percurso efectuado pelos timócitos dá-se em parte à resposta a um estímulo quimioattractor produzido pelas CET, as quimiocinas (Witt *et al.* 2004; Takahama 2006).

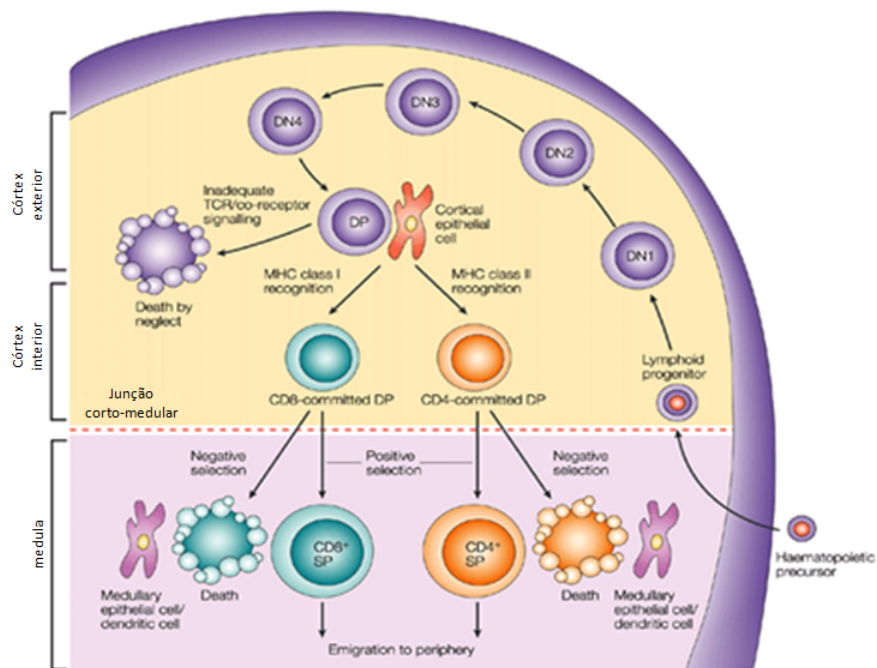


Figura 2 - Esquema resumido do desenvolvimento das células T.

1.3. Quimiocinas

1.3.1. Sistema de nomenclatura

Cerca de 50 quimiocinas e pelo menos 18 receptores foram identificados (Baggiolini *et al.* 1997; Murdoch *et al.* 2000; Gerard *et al.* 2001; Balkwill 2004; Ebert *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007). Devido à rápida descoberta de novas quimiocinas e ao facto dos investigadores darem nomes diferentes às mesmas moléculas, foi apresentado no *Keystone Chemokine Symposium*, em 2000, um novo sistema de classificação (Tabela 1). Dependendo do grupo em que se inserem, aos ligandos adicionou-se um L (p.e. CCL19) e aos seus receptores um R (p.e. CCR7) (Figura 3) (Zlotnik *et al.* 2000; Rosenkilde *et al.* 2004; Ebert *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007). Quanto aos genes, estes são designados por *SCY* (*small secreted cytokines*). Estão divididos em quatro grupos, *SCYa* (subfamília CC), *SCYb* (subfamília CXC), *SCYc* (subfamília C) e *SCYd* (subfamília CX3C) (Zlotnik *et al.* 2000).

Na figura 3 podemos ver os receptores e os seus ligandos.

Tabela 1 – Localização cromossomal e nomenclatura antiga e recente das quimiocinas.

Super-família das quimiocinas

Nome sistemático	Outros nomes	Cromossoma
Família CXC		
CXCL1	Gro α /MGSA- α	4q13.3
CXCL2	Gro β /MGSA- β	4q13.3
CXCL3	Gro γ /MGSA- γ	4q13.3
CXCL4	PF4	4q13.3
CXCL5	ENA-78	4q13.3
CXCL6	GCP-2	4q13.3
CXCL7	NAP-2	4q13.3

CXCL8	IL-8	4q13.3
CXCL9	MIG	4q21.1
CXCL10	IP-10	4q21.1
CXCL11	I-TAC	4q21.1
CXCL12	SDF-1 α/β	10q11.21
CXCL13	BLC, BCA-1	4q21.1
CXCL14	BRAK, Bolekine	5q31.1
CXCL16		17p13.2
CXCL17	DMC	19q13.2

Família CC

CCL1	I-309	17q11.2
CCL2	MCP-1/MCAF	17q11.2
CCL3	MIP-1 α , LD78 α	17q11.2
CCL3L1	LD78 β	17q12
CCL3L3	LD78 β	17q12
CCL4	MIP-1 β	17q12
CCL5	RANTES	17q12
CCL7	MCP-3	17q11.2
CCL8	MCP-2	17q11.2
CCL11	Eotaxin	17q11.2
CCL13	MCP-4	17q11.2
CCL14	HCC-1	17q12
CCL15	HCC-2	17q12
CCL16	HCC-4 LEC	17q12
CCL17	TARC	16q13
CCL18	PARC	17q12
CCL19	MIP3 β , ELC	9p13.3
CCL20	MIP3 α , LARC	2q36.3
CCL21	SLC	9p13.3

CCL22	MDC	16q13
CCL23	MPIF-1	17q12
CCL24	Eotaxin 2	7q11.23
CCL25	TECK	19p13.2
CCL26	Eotaxin 3	7q11.23
CCL27	CTACK, ILC	9p13.3
CCL28	MEC	5p12

Outras classes

	Lymphotactin, SCM-	
XCL1	1 α	1q24.2
XCL2	SCM-1 β	1q24.2
CX3CL1	Fractalkine	16q13

Neste trabalho usarei apenas a nomenclatura mais recente.

Receptor	Ligandos
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1
CCX-CKR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17,CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

Figura 3 - Receptores das quimiocinas e os seus ligandos.

1.3.2. Estrutura das quimiocinas

As quimiocinas são citocinas com capacidade de quimiotaxia, provocando desta forma a migração directa durante inflamação (Gerard *et al.* 2001; Balkwill 2004; Laing *et al.* 2004; Rosenkilde *et al.* 2004), e transporte de células estaminais hematopoéticas, células dendríticas e leucócitos (Gerard *et al.* 2001; Balkwill 2004; Laing *et al.* 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Riol-Blanco *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007). Pertencem a um grupo de pequenas proteínas (\approx 8-12 kDa) secretadas por diversos tipos de células e induzidas por estímulos patogénicos, factores de crescimento e citocinas proinamatórias (Zlotnik *et al.* 2000; Gerard *et al.* 2001; Balkwill 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007). As quimiocinas pertencem a uma super-família, tendo em comum quatro resíduos de cisteínas em locais altamente conservados, que

estabelecem ligações por pontes disulfídricas (Figura 4) (Baggiolini *et al.* 1997; Balkwill 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Ebert *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007; Broxmeyer 2008). Consoante a posição do primeiro par de cisteínas do terminal-N, as quimiocinas podem ser divididas em quatro grupos, as quimiocinas C, CC, CXC e CX₃C (onde o X representa o número de aminoácidos que separam as duas cisteínas). Desta forma, as moléculas apresentam uma homologia que as caracteriza a nível estrutural e aminoacídico (Zlotnik *et al.* 2000; Fernandez *et al.* 2002; Balkwill 2004; Laing *et al.* 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Ebert *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007; Broxmeyer 2008). Após o N loop podemos observar a hélice 3₁₀ que aparece antes das 3 folhas-β e 1 hélice-α. Estas estão juntas através de 3 loops, 30s, 40s e 50s. A terceira e quarta cisteína encontram-se no loop 30s e 50s, respectivamente (Figura 4B) (Fernandez *et al.* 2002; Allen *et al.* 2007).

A maior parte das quimiocinas pertencem às subfamílias CC e CXC (Laing *et al.* 2004). As quimiocinas CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 15 (as quais específicas para os receptores CXCR1 e CXCR2) contêm um motivo de três resíduos, designado por ELR. Os três resíduos Glu-Leu-Arg estão presentes no N-terminal e precedem a primeira cisteína, sendo essenciais para a activação dos receptores CXCR1 e CXCR2 (Fernandez *et al.* 2002; Laing *et al.* 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007). A presença deste N-terminal Glu-Leu-Arg (ELR⁺) em quimiocinas CXC, confere à maior parte destas citocinas, a capacidade de promover angiogénese, enquanto que quimiocinas ELR⁻ são angiostáticas (Laing *et al.* 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007), à excepção da quimiocina CXCL12 que possui propriedades angiogénicas (Laing *et al.* 2004).

Em resposta a factores específicos, as quimiocinas são produzidas em tecidos e depois entram em circulação, sendo imobilizados por proteoglicanos de heparina na barreira vascular endotelial (Fernandez *et al.* 2002).

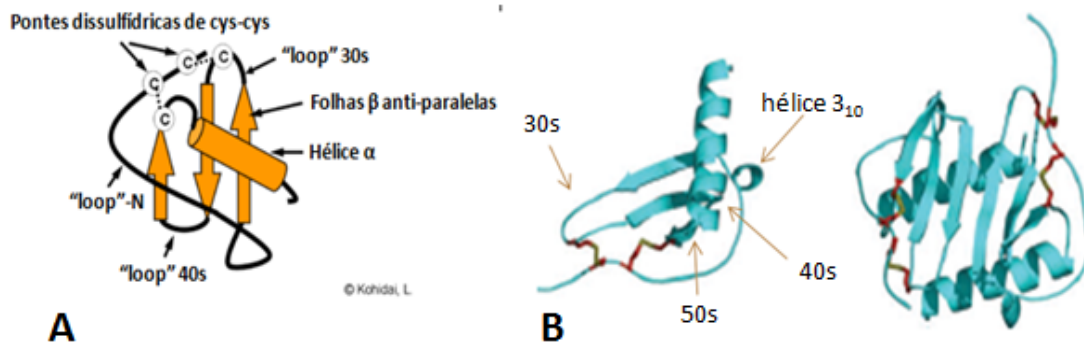


Figura 4 - Estrutura tri-dimensional de uma quimiocina.

1.3.3. Receptores

A maioria dos receptores são constituídos por cadeias de 350 resíduos de aminoácidos e têm uma massa molecular com cerca de 40 kDa (Murdoch *et al.* 2000). Possuem uma pequena parte do N-terminal acídica que pode ser sulfatada nos resíduos de tirosina. Contêm sítios de glicosilação e também resíduos de serina e treonina no C-terminal intracelular que actuam como sítios de fosforilação para regulação do receptor (Baggiolini *et al.* 1997; Fernandez *et al.* 2002). Estes receptores possuem 7 domínios transmembranares com 3 loops intracelulares e 3 extracelulares, pontes dissulfídicas entre cisteínas conservadas e proteínas G acopladas ao C-terminal (Figura 5) (Baggiolini *et al.* 1997; Murdoch *et al.* 2000; Fernandez *et al.* 2002; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007). A ligação das quimiocinas à superfície da células vai provocar uma série de reacções em cascata através destes receptores (Baggiolini *et al.* 1997; Murdoch *et al.* 2000; Fernandez *et al.* 2002; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007).

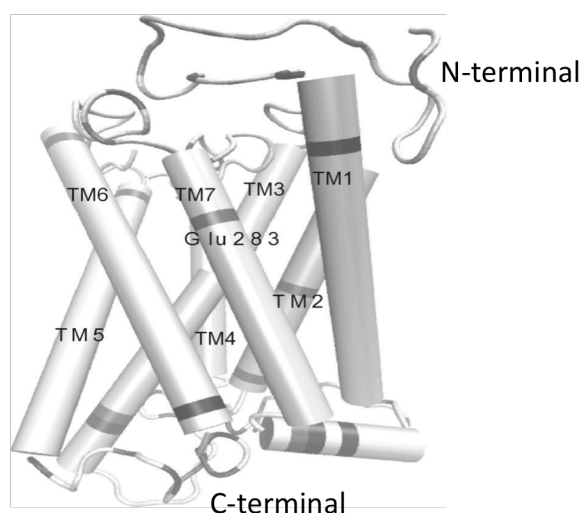


Figura 5 - Receptor de quimiocina.

Supõe-se que a interação receptor-ligando envolve o domínio N-terminal e o terceiro *loop* extracelular enquanto que motivos associados à região intracelular dão origem a várias cascatas de sinalização (Allen *et al.* 2007). A sinalização dá-se através de proteínas G (Fernandez *et al.* 2002; Witt *et al.* 2004; Ebert *et al.* 2005; Allen *et al.* 2007). Estas permanecem inactivadas quando o GDP está ligado à subunidade da proteína G e a activação dá-se quando o GDP é trocado pelo GTP. Durante a ligação do ligando, os receptores associam-se com as proteínas G, facilitando desta forma a troca da guanosina difosfato para a guanosina trifosfato. Na activação, dá-se a dissociação das subunidades $\beta\gamma$ da subunidade α da proteína G e a ligação do GTP à subunidade α . Esta dissociação vai provocar uma série de cascatas de sinalização, activando uma série de eventos no citoplasma da célula (Figura 6). Por exemplo, a libertação das subunidades $\beta\gamma$ medeiam a migração através da activação de outras proteínas (Oldham *et al.* 2008). Apesar da subunidade α não ser essencial para o efeito quimioattractor das quimiocinas, há estudos que referem um suposto papel desta subunidade em sinalização intracelular (Thelen 2001).

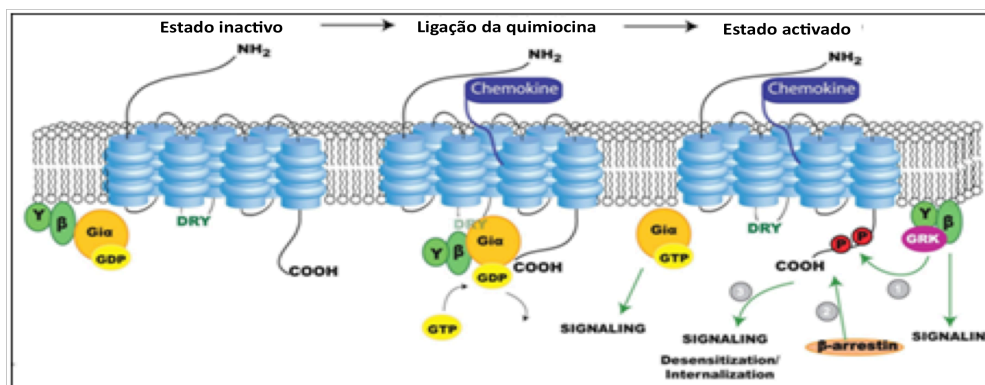


Figura 6 - Sequência de eventos durante a activação do receptor.

Como mostra a figura 3, certos receptores podem interagir com mais do que uma quimiocina, e sabendo que as células respondem diferentemente consoante o microambiente, a expressão destes receptores vão ser regulados através da presença de diferentes factores (Rodríguez-Frade *et al.*, 2005).

O facto dos receptores possuírem resíduos de serina e treonina no C-terminal, torna estes aminoácidos alvo de cinases associadas a proteínas G e arrestinas que provocam desensibilização e internalização (Allen *et al.* 2007). Estudos mostram que a ligação do CXCL8 aos receptores CXCR1 e CXCR2 nos neutrófilos provoca a diminuição da expressão dos receptores. O CXCL8 sofre internalização por parte da célula, sendo então degradado por enzimas lisossomais. Após a degradação, os receptores são re-sintetizados e voltam para a membrana para desempenhar a sua função normal. Supõe-se que este processo acontece com todos os receptores de quimiocinas identificados até ao momento (Murdoch *et al.* 2000). A internalização dos receptores passa pela fosforilação do receptor, associação à arrestina β e formação de vesículas de clatrina (Allen *et al.* 2007). A activação e consequente internalização do receptor podem levar a eventos de sinalização via MAPK (Rodríguez-Frade *et al.*, 2005), entre outras (Murdoch *et al.* 2000).

A sinalização provocada pelo estímulo dos receptores vai provocar a transcrição de vários genes-alvo envolvidos na mobilidade, sobrevivência, invasão e interacção com a matriz extracelular. Por isso, as quimiocinas desempenham um papel muito importante na coordenação do processo inflamatório e no desenvolvimento de células do sistema imune.

Características como a linhagem, estadió de diferenciação e factores microambientais (concentração de quimiocinas, citocinas inflamatórias e hipóxia) determinam a expressão selectiva de receptor-quimiocina da célula (Balkwill 2004).

1.3.4. Sinalização nas quimiocinas

O estado conformacional dos receptores na membrana da célula pode ser em forma de monómeros, homo-dímeros, heterodímeros ou oligómeros de alto peso molecular (Rodríguez-Frade *et al*, 2005). Nos receptores CCR2, CCR5 e CXCR4 a homodimerização foi observada através da indução dos ligandos, iniciando a sinalização depois da estabilização da conformação provocada pela ligação do ligando. Simulações bioinformáticas prevêem que os domínios transmembranares 1, 2 e 4 são importantes na interacção entre monómeros. A capacidade de dimerização destes receptores é afectada por mutações nesses domínios (Rodríguez-Frade *et al*, 2005). O interesse na importância da conformação dos receptores na sinalização tornou-se maior nos últimos anos.

A capacidade das quimiocinas formarem heterodímeros, possibilita o desempenho de funções específicas não obtidas por homodímeros. Por exemplo, a heterodimerização dos receptores CCR2 e CCR5 resulta no coplamento de proteínas G insensíveis à toxina pertúsica numa diminuição da quantidade de ligando necessário para uma resposta e activação cinética alternativa da via PI3 K (fosfoinositídeo 3-cinase) (Rodríguez-Frade *et al*, 2005).

A presença de diferentes quimiocinas influenciam as várias conformações possíveis afectando a sua capacidade de estabilizarem homo ou heterodímeros de receptores (Figura 7). Estas combinações de quimiocinas no microambiente possibilitam o aumento da plasticidade e especificidade do sistema imune (Rodríguez-Frade *et al*, 2005).

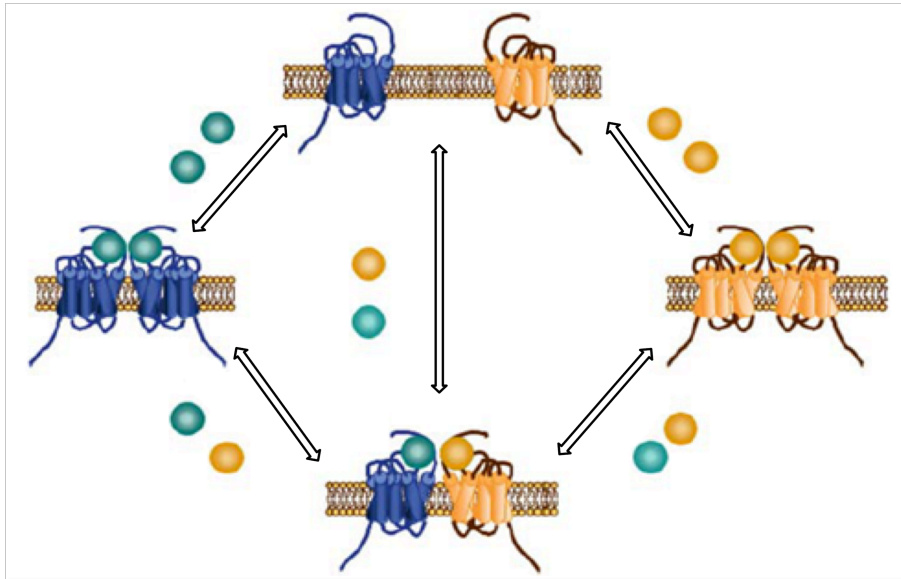


Figura 7 - Equilíbrio dos receptores e a estabilização por disponibilidade de quimiocinas.

Como referido anteriormente, as quimiocinas activam cascatas de sinalização através das proteínas G. A outra grande via de sinalização activada pela mudança de conformação dos receptores dá-se através da cinase JAK associada ao receptor JAK (cinase Janus) que activa proteínas da família STAT (transdutores de sinalização e transactivadores de transcrição) ao fosforilar o receptor (Rodríguez-Frade *et al*, 2005). A transcrição de genes, reorganização do exosqueleto e internalização e reciclagem do receptor são o efeito da activação da via JAK-STAT.

A activação de proteína G mostra-se como essencial nos processos conduzidos pelas quimiocinas. A consequente activação de moléculas sinalizadoras, como a PI3 K, PLC β e pequenas GTPases garantem as funções descritas no parágrafo anterior (Rodríguez-Frade *et al*, 2005). Na figura 8 está um esquema das moléculas que participam nas cascatas de sinalização resultantes da activação dos receptores de quimiocinas.

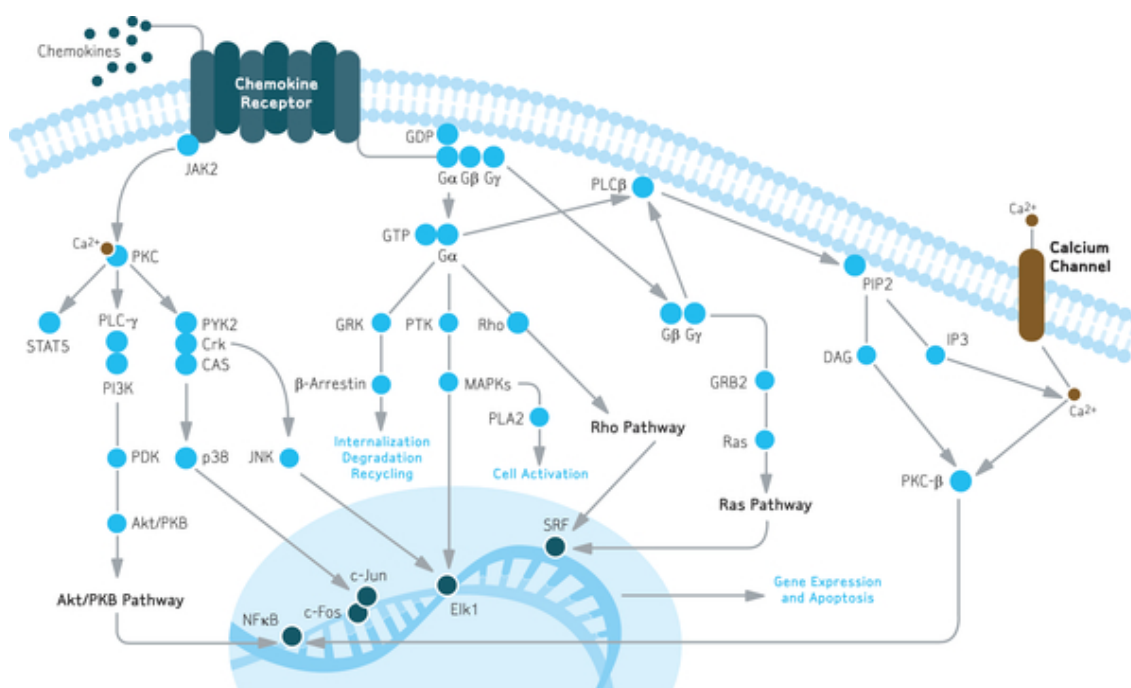


Figura 8 - Via de sinalização das quimiocinas.

1.3.5. Regulação das células T e intravasação

A expressão da selectina-P nas células do endotélio tímico, guia a entrada dos progenitores linfóides que por sua vez expressam a PSGL-1 (glicoproteína ligando da selectina P) (Figura 9a) (Rossi *et al.* 2005; Takahama 2006). Ratinhos com ausência de PSGL-1 apresentam timos com menos progenitores e nichos sem pro-timócitos, tornando esta glicoproteína muito importante na distribuição de timócitos (Rossi *et al.* 2005). A entrada dos progenitores através da junção cortico-medular do timo, rica em vasos sanguíneos, dá início ao percurso programado de diferenciação controlado rigorosamente por quimiocinas (Blackburn *et al.* 2004; Rossi *et al.* 2005; Takahama 2006).

A presença ou ausência da expressão do CD25 e CD44 indica o estado durante a fase DN dos timócitos (DN1-DN3). Durante esta fase as células entram em expansão clonal, perdem o potencial de diferenciação em células B e NK, rearranjam a cadeia β do receptor das células T (RCT), acabando na transição de DN para DP (Blackburn *et al.* 2004; Takahama 2006). Todo este processo é promovido pela via NOTCH e suportado pela IL-7 (Takahama 2006). No percurso da junção cortico-medular até à zona subcapsular, os timócitos imaturos migram primeiramente até ao córtex sob influência

das quimiocinas CXCR4 e CCR7 (Figura 9b) e até à zona subcapsular pela sinalização do CCR9 (Figura 9c) (Witt *et al.* 2004; Takahama 2006). Aqui vai-se dar a formação de células DP, o primeiro *checkpoint* no desenvolvimento de células T. Só as células que conseguem rearranjar o *locus Tcrb* correctamente e formar o complexo pré TCR (TCR β e pT α), é que iniciam o desenvolvimento para DP expressando baixos níveis de receptores antigénicos TCR $\alpha\beta$ (Takahama 2006).

Como descrito por Takahama *et al.*, os timócitos retornam para o córtex apresentando alta mobilidade, interrompendo este movimento apenas para interagir o RCT com o péptido-MHC expresso nas células estromais e dendríticas. As células DP recebem sinais de sobrevivência após interacções de baixa afinidade com o péptido para se diferenciarem em células SP, este processo é designado por selecção positiva. Timócitos com alta reactividade são eliminados por apoptose, impedindo desta forma problemas de autoimunidade (Figura 9d). Nesta fase apenas 3-5% dos timócitos em desenvolvimento sobrevivem. O aumento na expressão do receptor CCR7 na superfície dos timócitos DP seleccionados positivamente vai atrair estas células para a medula, devido à produção de CCL19 e CCL21 pelas células tímicas medulares (CETm) (Figura 9e) (Takahama 2006).

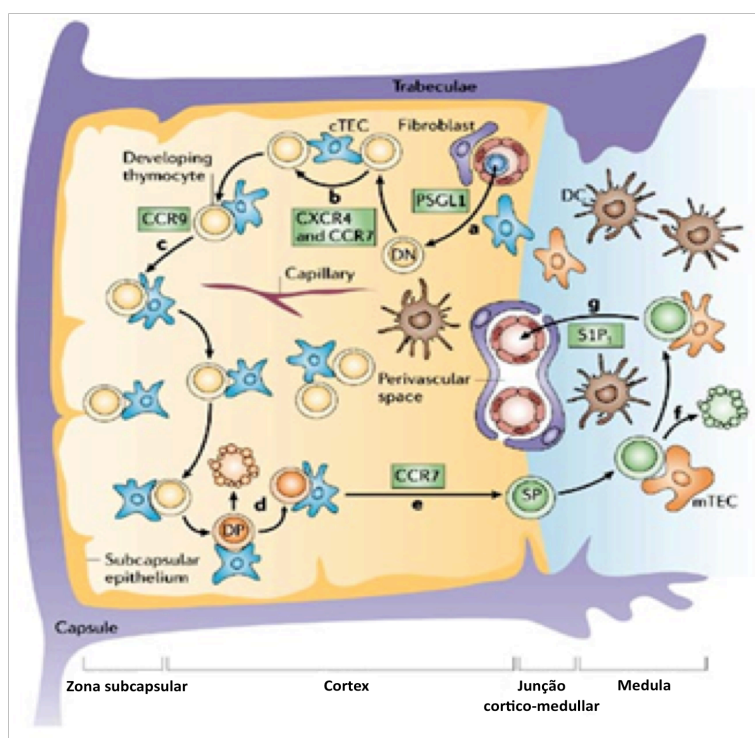


Figura 9 - Migração e desenvolvimento dos timócitos ao longo do timo.

As células seleccionadas positivamente, vão passar por uma série de eventos e presume-se que passem cerca de 12 dias na medula antes de migrarem do timo. No processo de maturação dos timócitos, dá-se ainda a expressão do receptor S1P₁. Este receptor vai permitir que as células T maduras sejam atraídas para a circulação e a consequente migração para outros nichos (Takahama 2006).

Após muitos estudos com quimiocinas, é agora do conhecimento geral que estas possuem um papel muito importante para além da função migratória. As quimiocinas são importantes para o desenvolvimento, a homeostase e função do sistema do sistema imune.

De modo aos leucócitos cheguem ao local de inflamação ou ferimento, estes têm de responder a um gradiente de quimioatractores que os guiem directamente. As quimiocinas desempenham um papel muito importante nesta fase pois sabe-se que *in vitro* elas provocam efeitos quimioatractivos e levam à acumulação de células inflamatórias *in vivo* (Murdoch *et al.* 2000; Luther *et al.* 2001; Balkwill 2004; Rosenkilde *et al.* 2004). As células quando chegam ao local, saem da corrente sanguínea através de interacções mediadas por selectinas que vão provocar o *tethering* e rolamento dos leucócitos na superfície do endotélio onde a tensão tangencial é menor (Hasegawa *et al.* 2000; Murdoch *et al.* 2000; Rossi *et al.* 2005; Veerman *et al.* 2007). Na superfície do endotélio existem quimiocinas (expostas por glicosaminoglicanos) que se tornam mais fáceis de aceder após a diminuição da velocidade dos leucócitos (Murdoch *et al.* 2000). A activação dos receptores na superfície dos leucócitos vai levar à ligação da integrina β 2 aos ligandos Ig (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3) sobre-expressos no endotélio por acção de citocinas pro-inflamatórias (Murdoch *et al.* 2000). Isto vai permitir que os leucócitos consigam atravessar a barreira do endotélio e alcançar a fonte de inflamação. Aqui as células vão passar por mudanças de morfologia celular que facilita a locomoção, secreção de enzimas lisossomais e produção de aniões superóxido, todos importantes para eliminar a ameaça externa (Murdoch *et al.* 2000).

Uma outra função das quimiocinas é de participar na angiogénese . No caso de haver danificação de vasos sanguíneos, a capacidade angiogénica por parte de algumas quimiocinas vai promover a quimioatracção, proliferação de células endoteliais e formação de tubo endotelial (Baggiolini *et al.* 1997; Fernandez *et al.* 2002; Rosenkilde *et al.* 2004; Allen *et al.* 2007). Como dito anteriormente a quimiocina CXCL12 possui

propriedades angiogénicas e quando produzida vai induzir a libertação de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), que por sua vez aumenta a expressão do receptor CXCR4 de maneira autócrina em células de cancro da mama (Balkwill 2004; Rosenkilde *et al.* 2004; Hong *et al.* 2006). Isto demonstra a importância da quimiocinas no processo de angiogénese na inflamação.

O processo de angiogénese mediado por quimiocinas não é exclusivo da inflamação. Existe uma relação entre o crescimento de um tumor e a angiogénese, e há estudos que mostram um papel das quimiocinas na formação de tumores (Rosenkilde *et al.* 2004).

1.3.6. As quimiocinas e o cancro

A complexa rede das quimiocinas influencia a infiltração de células do sistema imunitário em tumores. Este recrutamento é importante para garantir que as células malignas possam proliferar, sobreviver, migrar e criar novos vasos (Balkwill 2004).

A presença de leucócitos no cancro é comum, mas a razão pela qual esta se dá ainda não é compreendida. Apesar da presença de leucócitos infiltrados poder indicar uma tentativa do sistema imunitário rejeitar o tumor, a sua presença pode também ser devido ao facto dos leucócitos terem sido atraídos por quimiocinas, uma vez que os leucócitos podem ter um efeito positivo para as células tumorais (Balkwill 2004). A relação entre a vascularização do cancro da mama e a infiltração de macrófagos pode sugerir que os leucócitos podem ser potenciais recursos para a produção de factores de crescimento do tumor (p.e. angiogénese) (Balkwill 2004). Suportando esta teoria, o número de macrófagos no cancro cervical humano está relacionado com a expressão de CCL2 (Gerard *et al.* 2001).

A proliferação das células de melanoma e de linhas celulares pancreáticas é estimulada pelo MGSA (*melanoma growth stimulatory activity*), assim como o carcinoma pulmonar de células pequenas é estimulado pelo CXCL8. Isto demonstra que as células malignas podem usar as quimiocinas como factores de crescimento (Gerard *et al.* 2001).

Um último papel para as quimiocinas no desenvolvimento de cancro é o potencial de dar às células cancerígenas a capacidade de migração e metástase. A

presença dos receptores CCR7 e CCR10 em células de melanoma e dos receptores CXCR4 e CCR7 na superfície das células de cancro da mama, pode explicar o facto dos maiores locais de metastização destes cancros terem altas concentrações dos respectivos ligandos (Balkwill 2004; Rosenkilde *et al.* 2004).

O nosso trabalho foca a presença ou ausência dos receptores CCR7, CCR9, CXCR4 e PSGL-1.

1.3.7. Quimiocinas e LLA-T

1.3.7.1. CCR7

A migração das células T para os orgão linfáticos secundários, onde poderão detectar a presença de antigénios externos e iniciar a resposta imunitária a antigénios estranhos, e o processo de entrada nos orgão depende da ligação da integrina LFA-1 expressa nas células T com o ICAM-1 apresentado pelos grandes vénulos endoteliais. É agora do nosso conhecimento que a interacção do CCR7 com os seus ligandos é requerida para a activação do LFA-1 que por sua vez permite a entrada das células T nos nódulos linfáticos (Hasegawa *et al.* 2000; Veerman *et al.* 2007). Na LLA-T, a activação de NOTCH1 está relacionada com a expressão de CCR7. A análise de amostras primárias e de linhagens com NOTCH1 activo mostram que grande parte apresenta CCR7. Esta expressão de CCR7 vai ser essencial para a sinalização de adesão para a localização do sistema central nervoso (Buonamici *et al.* 2009). A activação de proteínas como o NOTCH1 está muitas vezes relacionadas com o desenvolvimento de cancro. A sinalização aberrante do NOTCH1 provocada através de mutações foi encontrada em 50% das linhas celulares e de pacientes examinados e está activa em 80% dos casos de LLA-T (O'Neil *et al.* 2007). Na tabela 2 podemos ver estas e outras mutações que foram identificadas nas nossas linhas celulares.

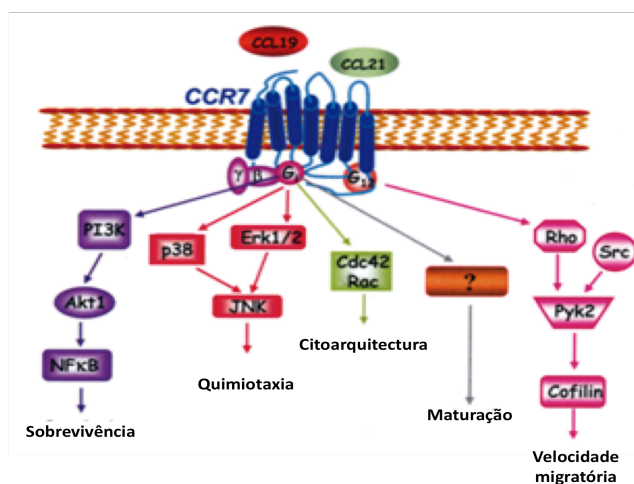


Figura 10 - Via de sinalização do CCR7.

1.3.7.1. CCR9

Como referido anteriormente, a indução da migração de células DP e de SP no timo pelo CCR9 é essencial no tráfego das células T. A sua activação vai regular as vias de sinalização importantes para a sobrevivência da célula através da fosforilação das GSK-3 β (cinase-3 β da sintetase do glicogénio) e FKHR (factor de transcrição *forkhead*). O seu ligando, CCL25, é importante para o desenvolvimento, homeostasia e quimiotaxia das células. Já em células malignas, estas podem aproveitar as capacidades da activação do CCR9 para resistir à apoptose, expansão descontrolada e infiltração (Qiuping *et al.* 2004). Estes autores demonstraram que as células T-ALL CD4⁺ conseguem resistir a várias terapias e mostram uma sobrevivência fora do normal, provavelmente através da sobre-expressão de CCR9 nestas células. Foi também observado que após a adição de TNF- α (indutor de apoptose), as células produzem uma poderosa proteína antiapoptótica, Livin, através da activação da via JNK1. Resultados obtidos apontam para uma regulação autócrina de CCL25 nas células malignas e por este facto, órgãos afectados por LLA-T mostram altas quantidades desta quimiocina. A inibição do receptor diminui a capacidade das células aderirem e sofrerem quimioatração visto que há indução da internalização do receptor (Qiuping *et al.* 2003).