

3.2. Determinação dos níveis de expressão dos genes CCR7, CCR9 e PSGL-1 por PCR em tempo real quantitativo

Para determinar os níveis de expressão dos genes CCR7, CCR9 e PSGL-1 nas diferentes linhas celulares de uma forma mais quantitativa, realizámos análises de PCR em tempo real. Mais uma vez, o gene da β -actina foi utilizado como referência. Foram realizadas duas experiências de PCR em tempo real, cada uma delas utilizando a linha celular K562 como referência interna para podermos comparar os resultados de ambas as experiências. Os valores do ciclo *threshold* (Ct) para os diferentes genes na linha K562 foram semelhantes entre as duas experiências, facilitando desta forma a sua comparação. Na primeira experiência foram analisadas as linhas celulares ALL-SIL, BE13, CEM, DND41, HPB-ALL, JURKAT e KOPTK1, e na segunda experiência as linhas MDA-435S, MOLT3, P12, PF382, RPMI8402, RS4;11 e SUPT1.

Para o gene CCR7 os valores de quantidade de mRNA relativo mais elevados foram os da linha CEM que em comparação com a K562 apresentou quase 200 vezes mais expressão (Figura 14-A). Outras 3 linhas celulares de LLA-T apresentaram valores elevados para este gene, a ALL-SIL, BE13 e HPB-ALL (apesar de se observar nesta linha um desvio-padrão um pouco superior aos outros). Quanto às linhas DND41, JURKAT e KOPTK1, os níveis de expressão são muito baixos em comparação com as restantes células. Já na segunda experiência apenas a P12 se destaca pela expressão marcada de CCR7 (Figura 14-B), apesar de inferior aos valores verificados para as linhas ALL-SIL, CEM, BE13 e HPB-ALL. Globalmente, os resultados obtidos demonstram que o gene CCR7 está expresso em linhas celulares de LLA-T e não (ou em níveis muito baixos) nas outras linhas testadas.

Os resultados obtidos para o gene CCR9 demonstram que, tal como o CCR7, está expresso de forma significativa apenas em linhas LLA-T e não em linhas de outro tipo de neoplasia (Figura 15). Curiosamente, verificou-se que linhas celulares com elevada expressão de CCR7 apresentaram níveis de expressão de CCR9 relativamente

baixos, tais como as linhas CEM, BE13 (Figura 15-A) e P12 (Figura 15-B). Para este gene a linha que apresentou expressão mais elevada na primeira experiência foi a KOPTK1 ($\approx 120x$), sendo a DND41 a linhagem seguinte na tabela com expressão setenta vezes superior aos níveis de CCR9 na linha controlo K562. Já na segunda experiência podemos verificar que as células PF382 apresentaram níveis de expressão de CCR9 cerca de 800x superiores ao controlo, seguindo-se as linhas SUPT1 e MOLT3. Ainda com valores que se destacam são as linhas ALL-SIL e HPB-ALL, mas com desvios-padrão ligeiramente superiores. Todas as restantes células apresentaram expressões abaixo das 20x. Os resultados obtidos para o gene CCR9 demonstram que, tal como o CCR7, este gene está expresso de forma signativa apenas em linhas LLA-T e não em linhas de outros tipos de neoplasia (Figura 15). Curiosamente, verificou-se que linhas celulares com elevada expressão de CCR9 apresentaram níveis de expressão de CCR7 relativamente baixos, tais como as linhas DND41, KOPTK1, MOLT3, PF382, RPMI8402, SUPT1.

Como podemos ver na figura 16 o gene PSGL-1 é expresso em todas as linhas LLA-T, as células JURKAT e KOPTK1 com os maiores valores, 53 e 38 vezes superiores a K562, respectivamente, e as outras abaixo de 30x. Como a expressão foi inferior nas linhas celulares K562, MDA-435S e RS4;11, presume-se que o gene PSGL-1 seja preferencialmente expresso em LLA-T. Os resultados obtidos por PCR em tempo real, parecem coincidir com resultados de RT-PCR, à excepção da linha celular RPMI8402 que só foi detectado o transcripto do CCR9 em PCR em tempo real.

CCR7

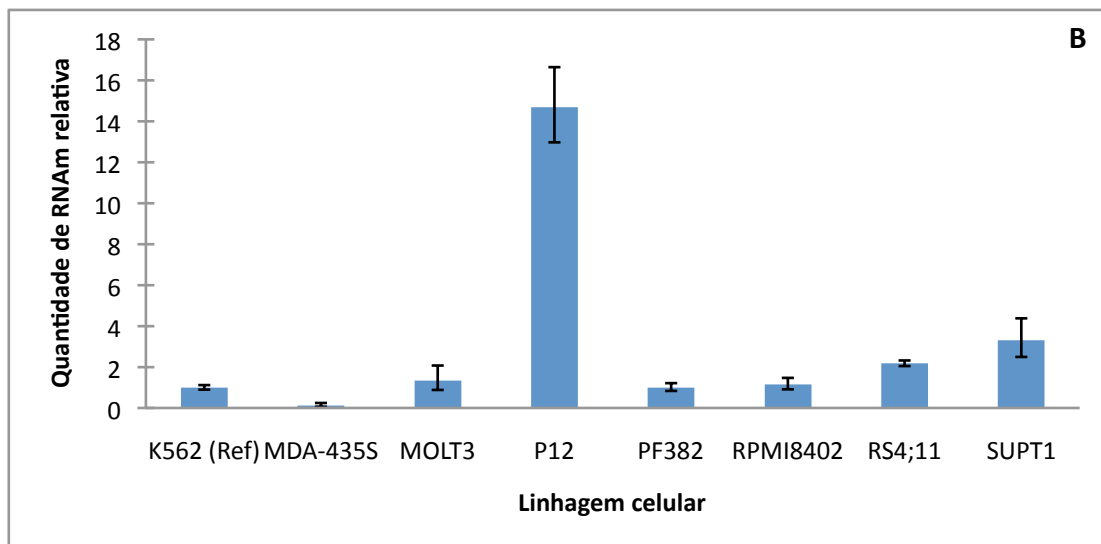
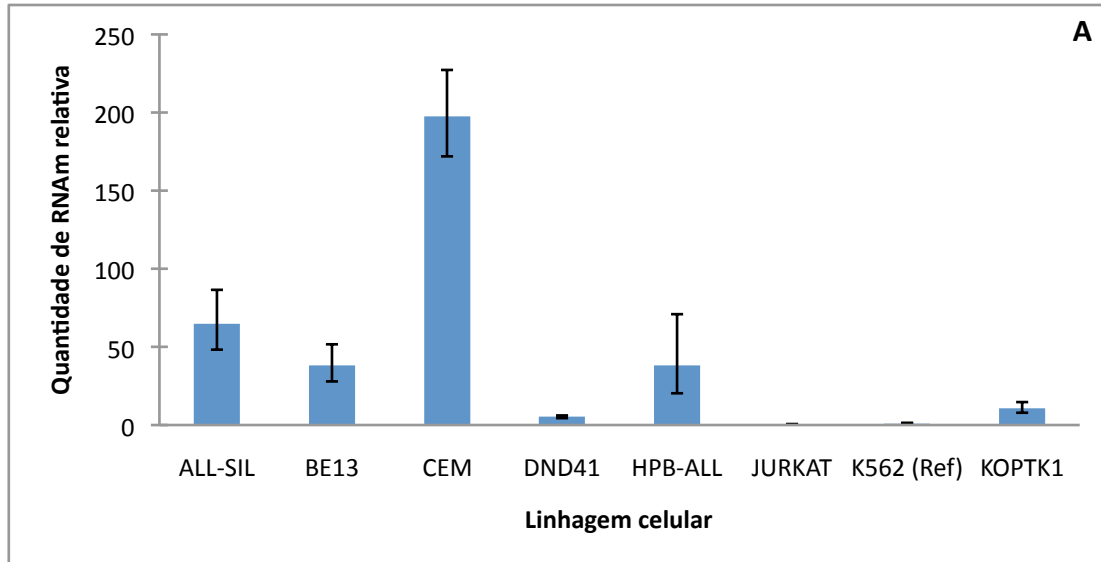


Figura 14 - Caracterização da expressão de CCR7, por PCR em tempo real, das linhas celulares em estudo.

CCR9

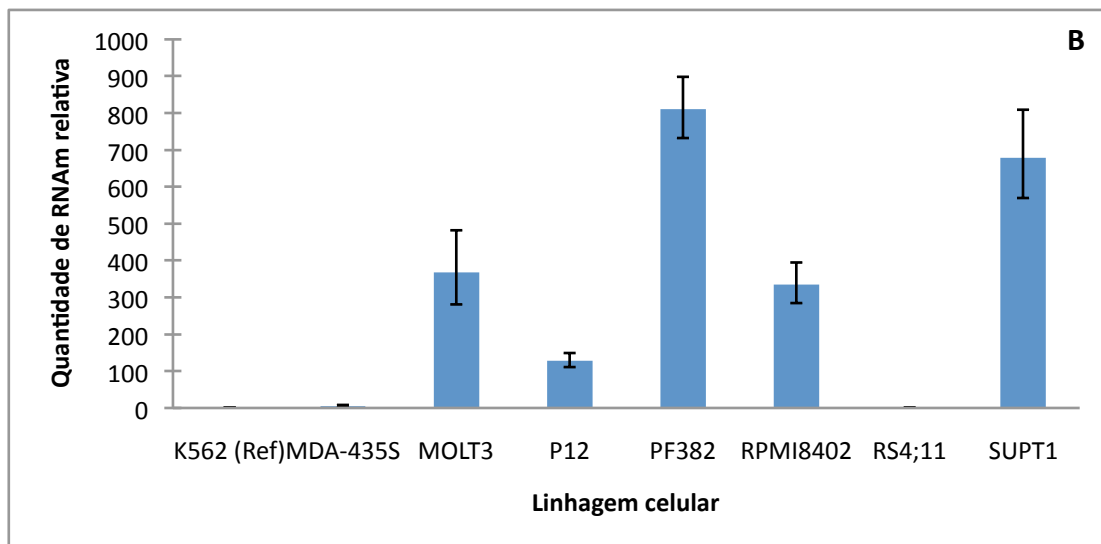
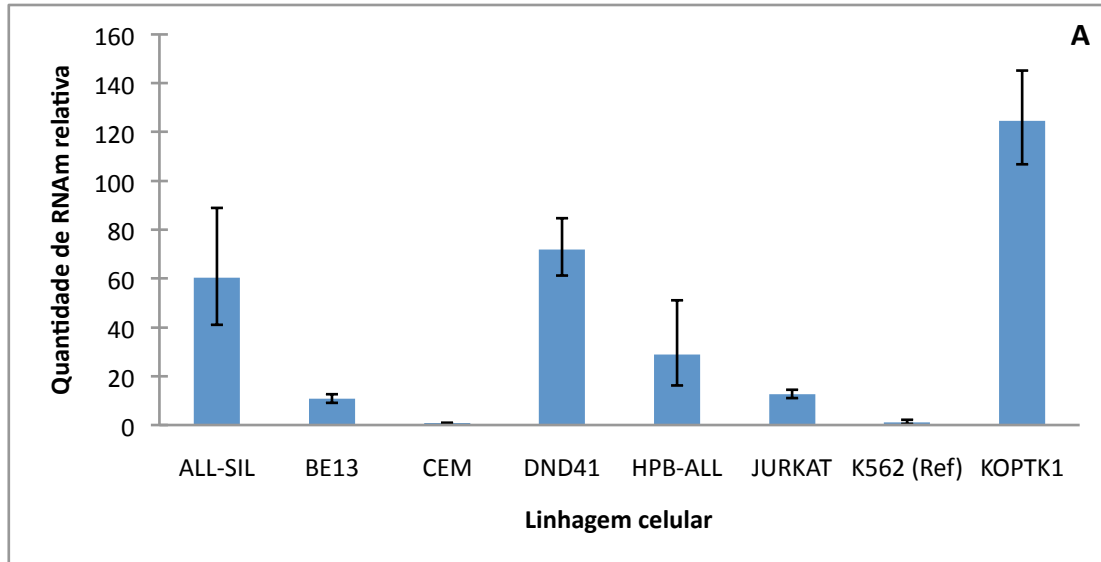


Figura 15 - Caracterização da expressão de CCR9 por PCR em tempo real.

PSGL-1

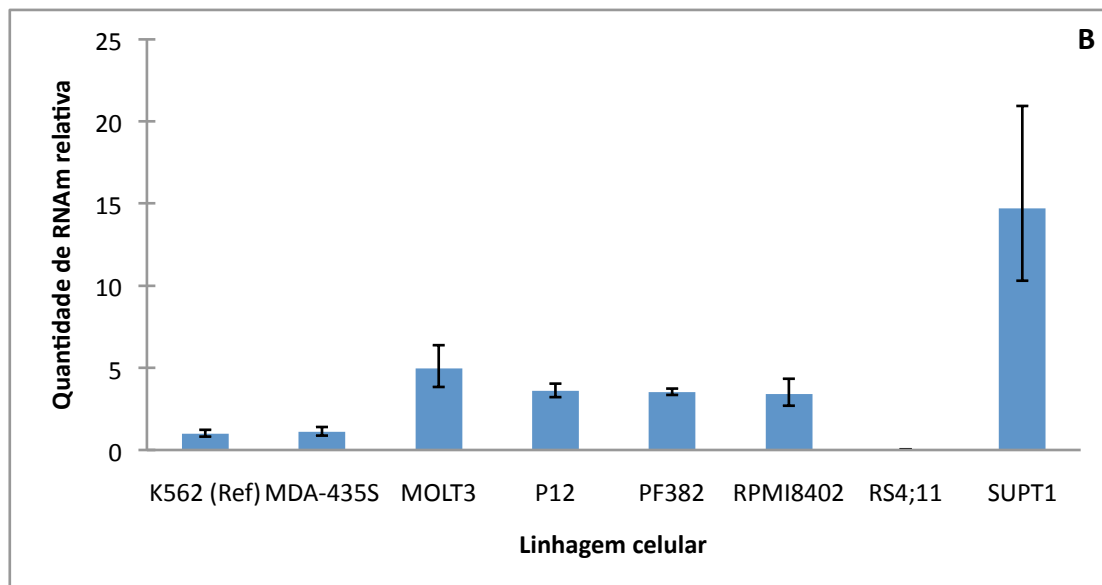
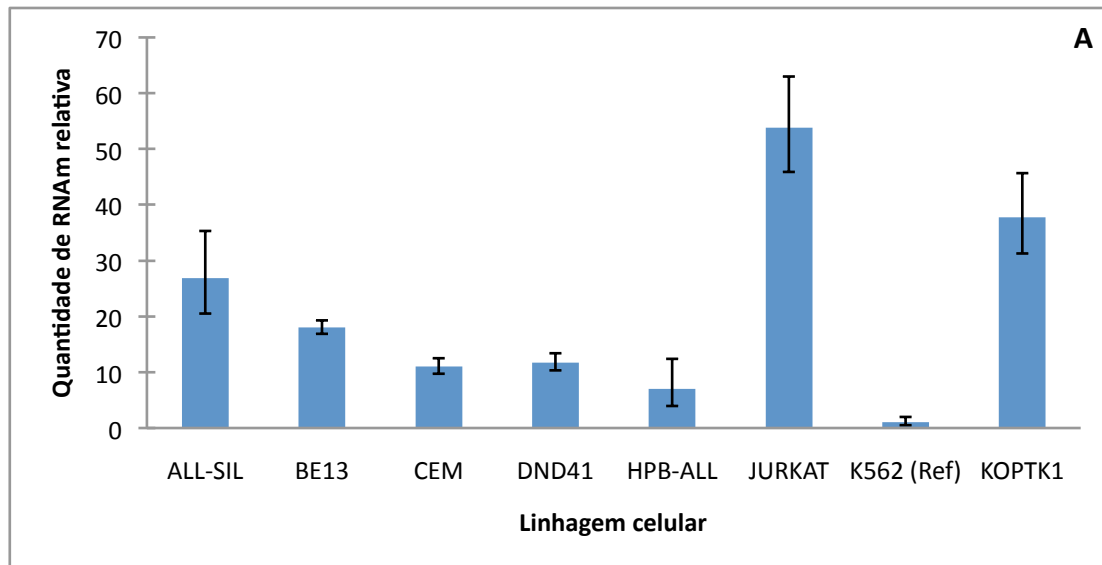


Figura 16 - Caracterização da expressão de PSGL-1 por PCR em tempo real.

3.3. Detecção das proteínas CD3 ϵ e CCR7 por citometria de fluxo

De modo a detectarmos a proteína CCR7 nas linhas LLA-T recorreremos à análise por citometria de fluxo. Nestas experiências utilizámos um anticorpo contra a proteína CCR7 conjugado ao fluorocromo aloficocianina (APC) e um anticorpo contra a proteína CD3 ϵ conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os níveis de marcação deste anticorpos foram comparados com anticorpos isotípicos não-específicos conjugados com os mesmo fluorocromos.

Primeiramente foi feita a marcação de superfície e intracelular da proteína CD3 ϵ das linhas em estudo. Como mostra a Tabela 3, o CD3 encontra-se na sua maioria na parte intracelular das células das linhas derivadas de LLA-T sendo apenas detectado em três linhagens (HPB-ALL, JURKAT e SUPT1) à superfície das células. Nas linhas LLA-B não foi detectada a presença de CD3 ϵ nem na superfície ou no interior da célula. Todas as linhagens LLA-T apresentaram CD3 ϵ no citoplasma sendo a HPB-ALL a única com um número de células positivas abaixo dos 98% (Figura 17). Quanto à marcação do receptor CCR7, podemos ver na figura 18 que 4 linhas celulares (ALL-SIL, CEM, P12 e SUPT1) apresentaram níveis de fluorescência ligeiramente superiores aos do anticorpo controlo quando comparado com o controlo. Em 3 destas linhas a marcação intracelular apresenta-se idêntica à superficial indicando que toda a proteína está expressa à superfície. Não se realizou a marcação intracelular da SUPT1 devido a falta de células na altura da experiência. Os níveis de expressão de CCR7 serão provavelmente devidos à utilização de anticorpo demasiado diluído, portanto insuficiente.

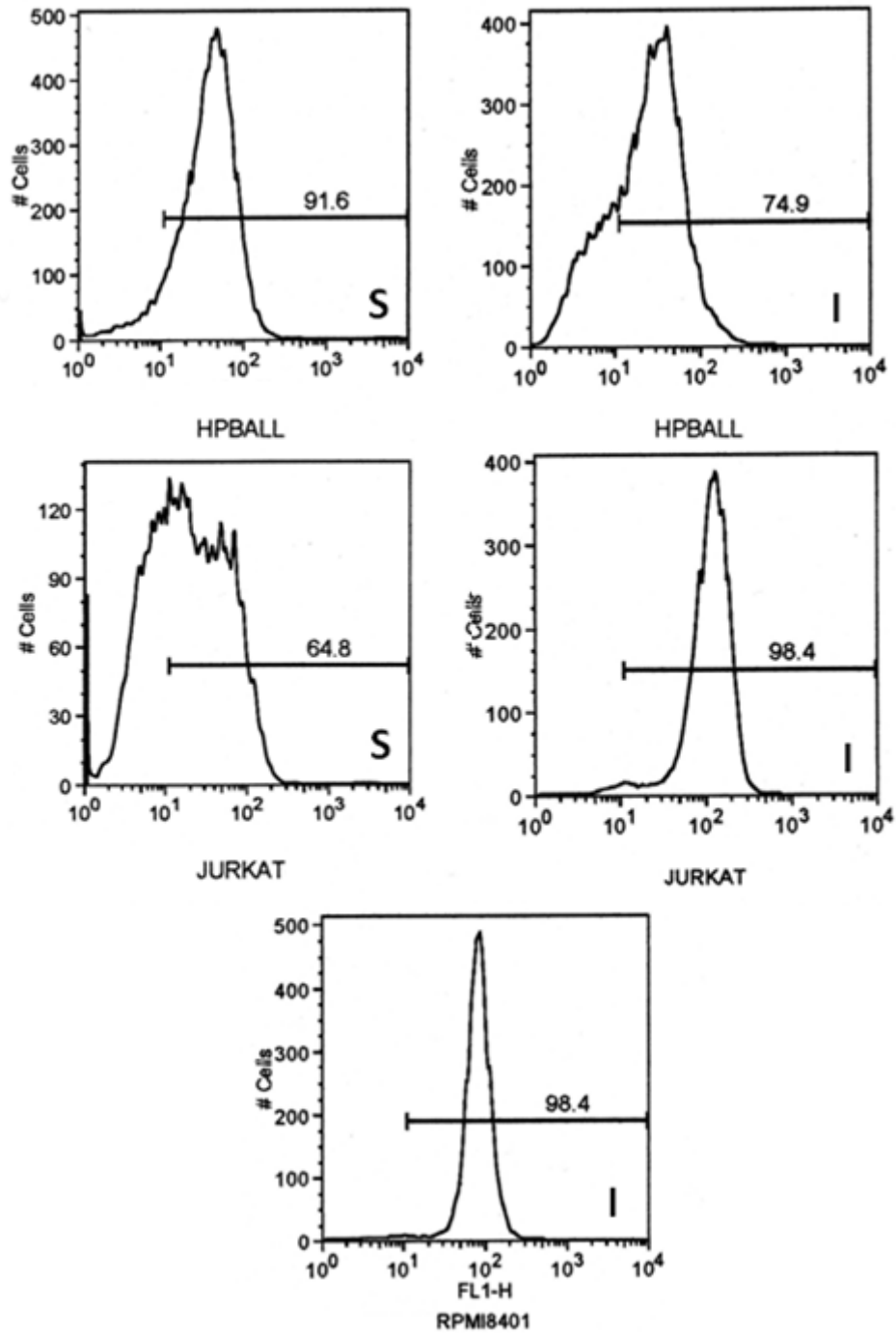


Figura 17 - Células derivadas de LLA-T marcadas com anti-CD3-FITC e analisadas por citometria de fluxo.

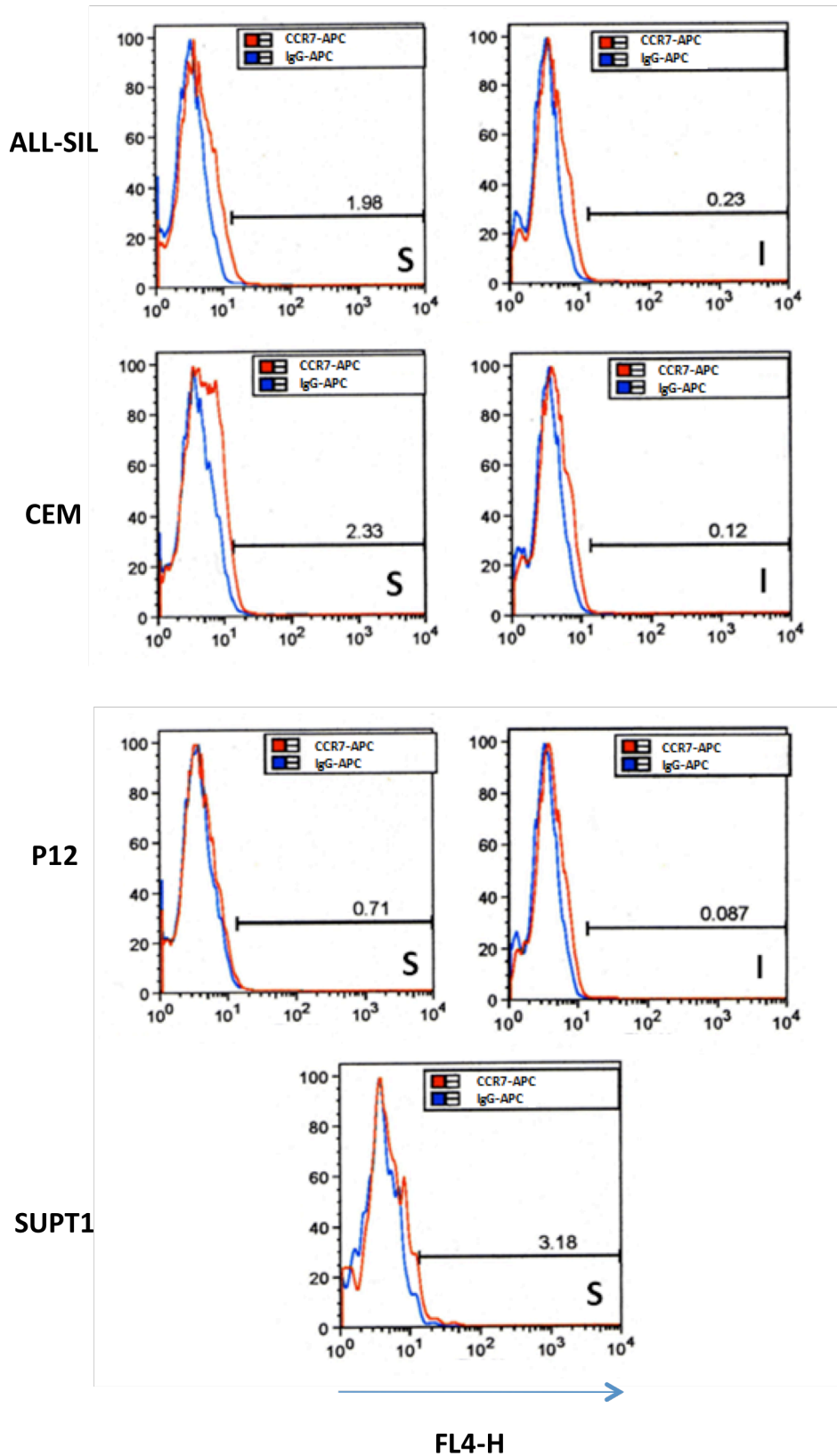


Figura 18 - Resultados de citometria de fluxo das linhas celulares LLA-T marcadas com IgG-APC e CCR7-APC.

I – Intracelular; S – Superfície

3.4. Detecção de proteínas por *Western Blotting*

Com o objectivo de avaliar os níveis de proteína CCR7 e PSGL-1 fizemos *Western blot*. A proteína de referência foi a α -tubulina e como podemos ver na figura 19 todas as células expressam esta proteína com um peso molecular ≈ 50 kDa. Apenas a HPB-ALL mostra uma segunda banda um pouco inferior a 50 kDa. Foi feita mais uma incubação mas desta vez com anti-PSGL-1 que nos permitiu observar bandas com diferentes tamanhos, três com cerca 75 kDa e uma perto dos 250 kDa (as setas vermelhas mostram as bandas com baixa intensidade). Quanto ao CCR7, não foi possível detectar nenhuma banda, nem nas linhas em estudo nem nos controlos positivos, indicando que o anticorpo utilizado não funcionou nas condições testadas.

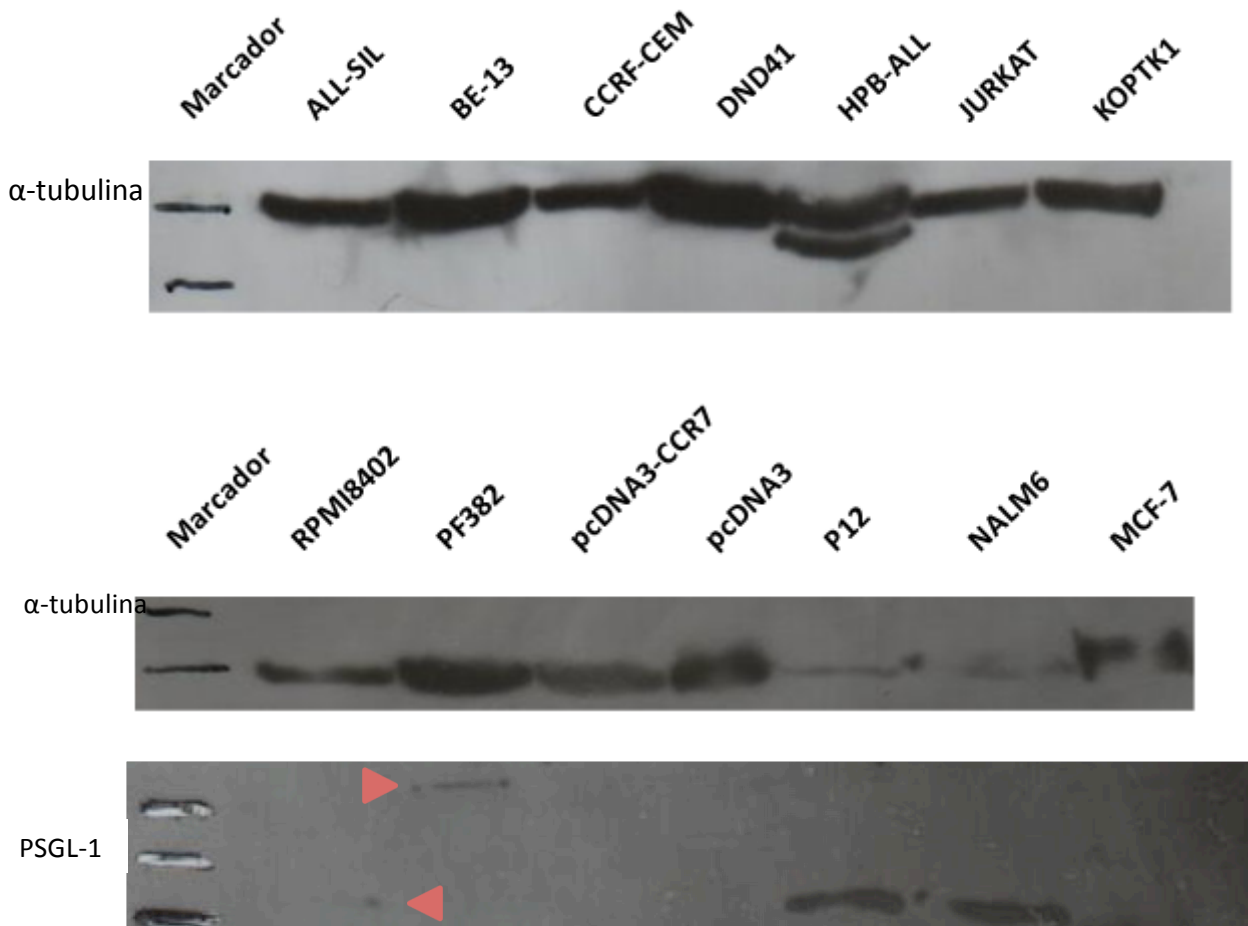


Figura 19 - Resultados da análise de Western blot das linhas celulares (identificadas na imagem) com os anticorpos contra α -tubulina e PSGL-1. As setas vermelho mostram bandas com fraca intensidade.

Tabela 3 - Tabela com identificação de CD3 nas linhagens celulares.

Linhagem	CD3	
	Intracelular	Superficial
ALL-SIL	+	-
BE13	+	-
CCRF-CEM	+	(+)
DND41	+	(+)
HPB-ALL	+	+
JURKAT	+	+
KOPTK1	+	-
MOLT3	+	(+)
NALM6	-	-
P12	+	-
PF382	+	-
RPMI8402	+	-
RS4;11	-	-
SUPT1	N.D.	+
TALL1	+	-

4. Discussão

Ultimamente as quimiocinas em cancro tornaram-se num alvo de estudo preferencial, visto que estas proteínas aparentam desempenhar um importante papel em diversos processos como homeostasia ou migração celular (seja para manutenção ou desenvolvimento de cancro). O papel importante das quimiocinas em vários processos biológicos é demonstrado no desenvolvimento de timócitos (Blackburn *et al.* 2004; Takahama 2006), hematopoiese (Broxmeyer 2008), sistema imunitário (Zlotnik *et al.*), migração celular (Riol-Blanco *et al.* 2005) e sobrevivência celular (Singh *et al.* 2004). Em cancro o microambiente é fundamental porque consoante o tipo de células que lá existem fornecem moléculas importantes para as células cancerosas (Joyce *et al.* 2009). As células tumorais, expressando determinados receptores ou ligandos, poderão tomar partido destas proteínas quimioattractoras e assim activar vias de sinalização importantes para a sua sobrevivência ou desenvolvimento oncogénico. Muitas publicações relataram o papel das quimiocinas em cancro (como já referido anteriormente) e diversas destas proteínas foram já associadas à leucemia linfoblástica aguda das células T (Crazzolara *et al.* 2001; Qiuping *et al.* 2003; Annels *et al.* 2004; Buonamici *et al.* 2009). Para compreender melhor os mecanismos tumorais intrínsecos e extrínsecos associados às quimiocinas estudamos os receptores de quimiocinas CCR7, CCR9, CXCR4 e o glicoproteína ligando da selectina P (PSGL-1).

4.1. Expressão de CCR7

O interesse no receptor de quimiocina CCR7 deve-se ao facto deste estar envolvido no tráfego de timócitos durante o seu desenvolvimento no timo e ainda participar na migração dos linfócitos para os nódulos linfáticos. Para além disso, o CCR7 participa em vários mecanismos implicados em cancro (Balkwill 2004). Nas nossas análises de RT-PCR, obtivemos produto em 6 das 16 linhas celulares (cerca de 50% das linhas celulares LLA-T). Na linha celular MDA-435S (utilizado como controlo positivo para o CCR7) não parece ter havido amplificação de cDNA do receptor CCR7. Isto pode dever-se ao menor número de células utilizado para a extracção de RNA. Na

amplificação por PCR em tempo real, as linhas celulares que apresentaram maior expressão foram a ALL-SIL, BE13, CEM, HPB-ALL e P12. Sendo a linha celular CEM a que mostra mais quantidade de mRNA relativa de todas (200×).

Recentemente, foram identificadas mutações no NOTCH-1 em muitos pacientes com LLA-T. Buonamici *et al* (2009) demonstraram que é possível induzir LLA-T e direccionar as células para o sistema central nervoso através da expressão de NOTCH-1 intracelular. A capacidade de transformação do NOTCH-1 intracelular deve-se à sua capacidade de regulação de outros genes. Um dos genes encontrado sobre-expresso foi o gene que codifica o receptor CCR7. Estes investigadores relatam que o CCR7 é responsável pela infiltração do sistema central nervoso por células leucémicas que exprimem NOTCH-1 em ratinhos, apesar do CCR7 perder a capacidade de invasão na ausência de determinados factores nestas células leucémicas que estarão presentes nas células T *wild-type* (Buonamici *et al.* 2009). Shields *et al* (2007) mostraram, usando um modelo *in vitro* em co-cultura, que células cancerosas que expressam CCR7 migram em direcção a um gradiente de CCL21 induzido pelos autores. Eles relatam também que numa cultura tridimensional de matrigel, células de melanoma e de tumor da mama expressam níveis mais elevados de CCL19 e CCL21 do que em 2D. Com este mesmo modelo, conseguiram mimetizar o fluxo dos vasos linfáticos *in vivo* demonstrando desta forma que a migração nos vasos pode ser mediada através da quimioatração do CCR7. Os resultados obtidos por estes autores demonstram portanto que células cancerosas (de leucemia ou carcinomas) que expressam CCR7 têm a capacidade de utilizar este receptor para facilitar a sua migração e metastização (Shields *et al.* 2007).

4.2. Expressão de PSGL-1

Dados recentes obtidos por Veerman *et al* (2007) revelaram outro interactor, a proteína PSGL-1, para os ligandos do CCR7, CCL21 e CCL19. A expressão nos órgãos linfóides secundários destes ligandos, aumenta a atracção das células T através do PSGL-1, isto porque se verificou que na ausência de PSGL-1, a velocidade de migração é afectada. A expressão de PSGL-1, em linhas LLA-T, pode potenciar a atracção de

células T leucémicas de ratinho para tecidos ou órgãos específicos, tal como demonstrado para células T normais por estes investigadores. Os nossos dados mostram que o mRNA de PSGL-1 está expresso em todas as linhagens LLA-T analisadas por RT-PCR e PCR em tempo real. A expressão conjugada do CCR7 e PSGL-1 nestas células poderá aumentar a capacidade destas células de migrar para outros órgãos distantes. Desta forma, Veerman *et al* (2007) propõem que a interacção entre a proteína PSGL-1 e as quimiocinas CCL19/CCL21 precede a interacção com o CCR7 e que poderá ter como função principal a de capturar as quimiocinas e assim facilitar a sua interacção com o CCR7. Alternativamente, as interacções CCL19-PSGL-1 e CCL21-PSGL-1 poderão induzir através da PSGL-1 e desta forma facilitar o processo quimiotáctico.

A capacidade do timo produzir células T depende da entrada de progenitores linfóides provenientes da medula óssea. Estes progenitores quando chegam ao timo atravessam as paredes das vénulas que dão acesso ao timo (Rosenkilde *et al.* 2004; Rossi *et al.* 2005). Rossi *et al* (2005) mostram que este acesso dá-se através de interacções entre o PSGL-1 expresso pelos progenitores tímicos e um dos seus ligandos (selectina P) expresso pelas células endoteliais do timo. Estes dados mostram que a proteína PSGL-1 não só possuem uma função em estado imaturos das células T como tem também uma função importante na capacidade de infiltração das células T CD4⁺ em locais de inflamação da pele, tal como verificado por Hinata *et al* utilizando ratinhos PSGL-1^{-/-}. Estes autores também testaram se mais alguma selectina estaria envolvida no processo, tendo descoberto que apenas a selectina L parece interagir com o PSGL-1 e ser responsável pela infiltração e migração de linfócitos para locais de inflamação dermais. Noutro estudo Hirata *et al* (2004) apontam para uma interacção do PSGL-1 com CCL27 (assim como com as quimiocinas CCL21 e CCL28) e sugerem que o PSGL-1 possui uma função regulatória da resposta mediada por esta quimiocina. Um subconjunto de células T que migram para tecido dermal expressando CCR10 (receptor para o CCL27) e ao mesmo tempo PSGL-1, poderá interagir com o CCL27 regulando a sua função (Hirata *et al.* 2004).

Rivera-Nieves *et al* (2006) relatam que o PSGL-1 parece desempenhar uma função na colite ulcerosa. Num modelo de ratinho para esta doença foi detectada a expressão de PSGL-1 na *lamina propria* intestinal, assim como a expressão da selectina

L (outro dos ligando) em células T memória CD4⁺. É a interacção entre estas proteínas que resulta na entrada destas células nos nódulos linfáticos mesentéricos na *lamina propria* íleo (Rivera-Nieves *et al.* 2006) levando a constante inflamação deste local. Esta capacidade do PSGL-1 regular a migração para certos órgãos e de interagir com outras quimiocinas apoia a nossa hipótese que o PSGL-1 poderá facilitar a migração de células de LLA-T. O facto as linhas celulares de LLA-T por nós testadas apresentarem expressão do mRNA do PSGL-1 e algumas linhas mostrarem a presença de proteína vão de encontro à hipótese do PSGL-1 regular a migração e infiltração das células malignas neste tipo de neoplasia. A presença de PSGL-1 pode também regular a interacção CCR7-CCL19/CCL21.

4.3. Expressão de CXCR4

Nas leucemias linfoblásticas crónica, foram detectados níveis de expressão de CCR7 elevados em pacientes com linfadenopatia (Till *et al.* 2002). Estes autores relatam que as quimiocinas CXCL12, CCL19 e CCL21 conseguem induzir a transmigração através do endotélio vascular, sendo menor para o CXCL12. Isto pode dever-se ao facto de os ligandos do CCR7 estarem presentes no endotélio e estroma e o CXCL12 no estroma. O CXCR4 parece então participar na migração pelo endotélio, mas não na entrada dos nódulos linfáticos como sugerido pelos autores. A expressão de CXCR4 (análise RT-PCR) foi detectada em todas as nossas linhagens de LLA-T. A presença deste receptor pode conferir às células LLA-T a capacidade de infiltração em órgãos que expressam o seu ligando, CXCL12.

Bertolini *et al* (2002) relataram igualmente a expressão de CXCR4 nas linhas celulares LLA-T CCRF-CEM, JURKAT e MOLT-4 (linhagem “irmã” da MOLT-3). Estes dados são confirmados pelos nossos resultados. Estes investigadores decidiram então neutralizar este receptor em células de linfoma não-Hodgkin (LNH) e verificaram uma diminuição na capacidade de extravasão destas células. A neutralização com anti-CXCR4 ainda induziu a apoptose como indicado pela produção de anexina-V (marcador apoptótico). Tendo em conta que a interacção CXCR4-CXCL12 parece estar envolvida

em processo fulcrais em LLA, LMA e LNH folicular, este receptor pode ser muito importante na sobrevivência celular nestas patologias (Bertolini *et al.* 2002).

Müller *et al.* (2001) analisaram a expressão de diversos receptores de quimiocinas e encontraram alguns sobre-expressos em células do cancro da mama quando comparadas com os níveis de expressão nas células epiteliais mamárias normais. Um desses receptores é o CCR7 (já referido) e outro o CXCR4. Uma das particularidades desta expressão é o facto de não existir em células normais (Muller *et al.* 2001). Em células tumorais primárias, análise por citometria de fluxo, mostraram até 97,98% de células positivas para o CXCR4. Sabemos também, que este receptor está envolvido na migração durante o desenvolvimento dos timócito. Aqui, possui um papel muito importante para o seu desenvolvimento, tanto na migração como, por exemplo, na interacção com o complexo TCR/CD3 (Takahama 2006; Patrussi *et al.* 2008). A sua neutralização ou do respectivo ligando provoca a paragem na diferenciação e diminuição do número de timócitos, em humanos adultos (Hernandez-Lopez *et al.* 2002).

4.4. Expressão de CCR9

O enigma dos factores que levam os tumores a desenvolver e metastizar continua a manter-se, e ultimamente muito se tem feito para melhor compreender este mecanismo. Várias publicações mencionam a capacidade do receptor CCR9 induzir sobrevivência e metastização em vários tipos de cancros.

Os valores da quantidade de mRNA relativa de CCR9 mostram valores muito elevados, tendo a linha celular PF382 apresentado 800× mais expressão que o controlo. Entre as análise de PCR apenas uma das linhas não apresentou a expressão de CCR9. Quanto à RPMI8402, a expressão de mRNA só foi detectada por PCR em tempo real. Isto poderá ter sido causado por erro na parte experimental.

O receptor CCR9 é essencial nalguns processos de homeostasia e diferenciação celular. Por exemplo, verificou-se que o CCL25, através do CCR9, acciona vias de sinalização importantes para a orientação e migração de timócitos em

desenvolvimento (Norment *et al.* 2000); induz a migração de progenitores da medula óssea para o epitélio intestinal (Onai *et al.* 2002); parece induzir a migração de tímócitos CD8⁺ para órgão linfóides secundários (Carramolino *et al.* 2001); e estimula a adesão de células CD4⁺CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ ao VCAM-1 e ao péptido CS-1/FN (Parmo-Cabanas *et al.* 2007).

No que se refere ao cancro, foi descrito que a expressão funcional de CCR9 está relacionada com metastização intestinal (Letsch *et al.* 2004; Richmond 2008) e parece levar à migração celular da leucemia das células T adulta para o tracto gastrointestinal (Nagakubo *et al.* 2007). No cancro da próstata parece induzir a migração e infiltração de células tumorais (Singh *et al.* 2004) e ainda foi descrito como estando envolvido noutros cancros como a LLA-T, melanoma, cancro dos ovários e carcinoma nasofaríngeo (Valdivia-Silva *et al.* 2009).

4.5. Detecção de proteínas por *Western Blotting*

Após a detecção de quimioluminescência podemos observar que todas as linhas celulares testadas apresentam α -tubulina com um tamanho que ronda os 50 kDa em relação ao marcador. Portanto confirma-se ser α -tubulina visto que a banda esperada era de 50 kDa. Isto mostra que a extracção de proteínas foi bem feita e que, como esperado, todas as linhas celulares testadas possuem α -tubulina. Quanto à linha celular HPB-ALL uma outra banda foi detectada um pouco abaixo dos 50 kDa. Isto pode dever-se a modificações pós-transcricionais, degradação proteolítica, etc.

Quanto à detecção de PSGL-1, 3 bandas foram detectadas rondando os 75 kDa e uma outra banda de cerca 250 kDa (de sinal fraco). A proteína PSGL-1 possui um peso molecular perto dos 120 kDa mas *in vivo* formam dímeros entre si com 250 kDa. As bandas de 75 kDa e de 250 kDa (diferente à esperada) podem ser explicadas por modificações dentro da célula, visto que a utilização de alguns reagentes (SDS, mercaptanol, etc) quebra a dimerização destas proteínas. Já na outra metade das linhas celulares a detecção de PSGL-1 parece não ter sido bem sucedida. As sucessivas reutilizações e lavagens da membrana podem explicar esta ausência de bandas. A

detecção de CCR7 não foi conseguida mas desta vez por possível problema com o *stock* de anticorpo.

4.6. Detecção das proteínas CD3 ϵ e CCR7 por citometria de fluxo

Na análise das proteínas CD3 ϵ e CCR7 por citometria de fluxo verificamos que todas as linhas celulares LLA-T apresentam a proteína CD3 ϵ preferencialmente no interior da célula. Apenas 3 dessas linhas celulares apresentaram CD3 ϵ na superfície da célula (HPB-ALL, JURKAT e SUPT1. Burger *et al* (1999) correlacionaram o fenótipo de marcadores de superfície das linhas celulares LLA-T com o padrão de diferenciação dos timócitos humanos normais. Para isso, realizaram uma série de análises a marcadores por citometria de fluxo de modo a criar uma classificação das linhas celulares de LLA-T. Nestas análises eles classificaram a RPMI8402 como CD3 ϵ ⁻ (Burger *et al.* 1999), ao contrário do que observámos na nossa análise de citometria. De facto, verificámos que a linha celular RPMI8402 apresenta mais de 90% das células com CD3 ϵ no interior da célula (Figura 17). Já Sartor *et al* (1994) verificaram que a linha RPMI8402 apresenta CD3 intracelular com valores superiores a 90% (análise por citometria de fluxo). Enquanto que na superfície a percentagem de células com CD3 quase que não existe (Sartor *et al.* 1994). Esta discrepância de resultados entre 3 grupos de investigação pode dever-se a uma simples troca de linha celular e conseqüentemente erro na análise. Para descartar essa hipótese deveria-se fazer uma análise citogenética de modo a confirmar a identidade da linha celular.

Em relação ao CCR7, a presença deste receptor apenas foi detectada em 4 linhas celulares (ALL-SIL, CEM, P12 e SUPT1). A análise intracelular da linhagem SUPT1 não foi possível por falta de células. Quanto à fraca detecção de CCR7 nestas linhas celulares poderá ser explicada pela utilização insuficiente do respectivo anticorpo 20x inferior à recomendada.

4.7. Activação de CCR7?

Nos dados obtidos por PCR em tempo real verificámos que em algumas linhas celulares a elevada expressão do CCR7 parece coincidir com a baixa expressão de CCR9. Como referido anteriormente, a activação de CCR9 leva à fosforilação da proteína GSK-3 β e está relacionada com sinais de sobrevivência celular (Qiuping *et al.* 2003). McKenzie *et al.* (2006) descrevem o GSK-3 β como uma cinase capaz de fosforilar e regular a sinalização do NOTCH. Buonamici *et al.* ao transplantarem células que expressam NOTCH intracelular em ratinhos detectaram uma sobre-expressão do receptor CCR7. Se o NOTCH intracelular for inibido pela GSK-3 β , tal como foi verificado por Espinosa *et al.* (2003), a expressão de CCR9 poderia levar a um aumento da actividade NOTCH-1 impedindo que a GSK-3 β iniba o NOTCH-1. As mutações activadoras no NOTCH-1 são frequentes em pacientes com LLA-T tendo também sido detectadas em linhas celulares desta patologia (Aster *et al.* 2008). Fomos ver se existiam mutações nas regiões de ligação do NOTCH-1 nas linhas em que encontrámos esta situação. Sabe-se ainda que o local de ligação da GSK-3 β ao NOTCH-2 é na região C-terminal e que aqui vai fosforilar a treonina-2068 e/ou serina-2070, treonina-2074 e Treonina-2093 (Espinosa *et al.* 2003). Na tabela 2 podemos ver que existem mutações no domínio PEST do NOTCH-1 e sabendo que o local de ligação do GSK-3 β é nas repetições-anquirina (sete no total) do domínio *PEST* (Espinosa *et al.* 2003; Bradley *et al.* 2006), não encontrámos mutações entre a zona codificante 1927 e 2089 (região onde se encontra as repetições, ver www.uniprot.org). Como esta região com as repetições-anquirina não se encontra alterada, a capacidade de interacção com a cinase GSK-3 β não é perdida. Ou seja, pode haver algo mais que possa estar a inibir de alguma forma a expressão de CCR7 via NOTCH-1. Ainda que a actividade NOTCH possa ser aumentada através da inibição de GSK-3 β mediada pela PI3K e sabendo que a expressão desta está relacionada com a actividade do NOTCH-1 (McKenzie *et al.* 2006), falta-nos perceber porque a expressão de CCR7 aparece com valores tão baixos. O'Neil *et al.* mostram que todas as linhas analisadas no nosso trabalho, com a excepção da TALL1, mostram actividade de NOTCH-1, e quatro delas possuem mutações de FBW7 que induza a resistência aos inibidores γ -secretase. Uma destas linhas é a JURKAT, que

pelos resultados de RT-PCR e PCR em tempo real não expressa CCR7. A tabela 2 indica várias mutações associadas a proteínas importantes para o desenvolvimento de cancro, como por exemplo o NOTCH1, p53, Ras, etc. Algumas destas proteínas interagem com o NOTCH-1 inibindo (p.e. PTEN) ou aumentando a sua actividade (Aster *et al.* 2008). E a existência ou ausência destes podem influenciar a função de NOTCH-1 afectando a expressão de CCR7 (Aster *et al.* 2008; Buonamici *et al.* 2009). Falta então perceber este mecanismo e saber a razão pela qual a existência de actividade de NOTCH-1 e a ausência da expressão do receptor de quimiocina CCR7.

As proteínas NF- κ B são factores de transcrição que aparecem activados em alguns cancros e que induzem a transcrição de genes que conferem às células propriedades de sobrevivência, proliferação, etc (referido na introdução). A activação desta via resulta na sobre-expressão de genes, entre elas o gene que codifica o receptor CCR7 (Ferris *et al.* 2007). Existe uma regulação recíproca entre o NOTCH e o NF- κ B, onde o NF- κ B aumenta a transcrição do ligando do NOTCH (Jagged-1) e o NOTCH aumenta a transcrição do p52, p50, p65/RelA, RelB e c-Rel (Osipo *et al.* 2008). Ao mesmo tempo, o NOTCH aumenta a produção de I κ B α , um inibidor de NF- κ B, tendo desta forma o potencial para tanto estimular como inibir a actividade NF- κ B (Osipo *et al.* 2008). Esta pode ser uma das explicações para haver linhas celulares com e outras sem expressão de CCR7. De seguida fomos procurar se o complexo NF- κ B responsável pela expressão de CCR7 pode ser suprimido pelo I κ B α . É também mencionado que apenas um complexo NF- κ B constituído pelo p65/p50 é encontrado em células dendríticas imaturas, onde o CCR7 vai ser regulado com o aumento da sua expressão (Hegde *et al.* 2004; Riol-Blanco *et al.* 2005). Este é um dos complexos reprimido pelo I κ B α (Hayden *et al.* 2004). Hegde *et al.* sugerem o envolvimento do NF- κ B, pois verificaram a inibição da regulação positiva de CCR7 após terem suprimido a activação do NF- κ B. Resumindo, o NOTCH-1 possui um papel importante para a expressão de CCR7, no entanto nas nossas análises algumas linhas celulares não mostraram a expressão de CCR7. O que pode significar que o NOTCH, por si, poderá não ser suficiente para induzir a expressão do receptor de quimiocina CCR7. Aqui foi discutido algumas moléculas com potencial de cooperar com o NOTCH de modo a regular positivamente a expressão de CCR7.

5. Perspectivas futuras

Neste trabalho foi discutido vários mecanismos, mediados pelas quimiocinas em estudo, importantes para o cancro. A expressão destes receptores em leucemia linfoblástica aguda das células T podem fornecer às células a capacidade para sobrevivência, migração e proliferação. Resultados preliminares mostram que existe a expressão destes receptores de quimiocina, sendo o CXCR4 detectado em todas as linhagens testadas, em linhagens celulares de LLA-T. Apenas estudos de expressão são insuficientes e não nos conseguem afirmar nada com certeza, por isso é preciso compreender com maior detalhe os efeitos biológicos dos receptores nestas mesmas linhas LLA-T.

Mais análises por *western blot* e citometria de fluxo são necessárias para a determinação da presença destas proteínas (principalmente o CCR7) nesta neoplasia. Ensaio de proliferação, migração e apoptose em simultâneo com outras células que expressam os respectivos ligandos. Iremos também fazer ensaios de transmigração com células MDCK (células de rim caninas), para verificar se as células LLA-T ultrapassam esta barreira física em resposta a quimiocinas assim avaliando a sua capacidade de invasão. Iremos também analisar as vias de transdução de sinal activadas pelas quimiocinas (*western blot*) e ainda estudar o comportamento da doença injectando células LLA-T em animais imunodeficientes, de modo a determinar a capacidade de migração, metastização, proliferação e desenvolvimento tumoral *in vivo* mediada pelas quimiocinas.

6. Referências

Allen, S. J., Crown, S. E. & Handel, T. M. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.

Annels, N. E., Willemze, A. J., Van Der Velden, V. H., Faaij, C. M., Van Wering, E., Sie-Go, D. M., Egeler, R. M., Van Tol, M. J. & Revesz, T. (2004). "Possible link between unique chemokine and homing receptor expression at diagnosis and relapse location in a patient with childhood T-ALL." Blood **103**(7): 2806-2808.

Aster, J. C., Pear, W. S. & Blacklow, S. C. (2008). "Notch signaling in leukemia." Annu Rev Pathol **3**: 587-613.

Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.

Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer **4**(7): 540-550.

Bertolini, F., Dell'agnola, C., Mancuso, P., Rabascio, C., Burlini, A., Monestiroli, S., Gobbi, A., Pruneri, G. & Martinelli, G. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." Cancer Res **62**(11): 3106-3112.

Blackburn, C. C. & Manley, N. R. (2004). "Developing a new paradigm for thymus organogenesis." Nat Rev Immunol **4**(4): 278-289.

Bradley, C. M. & Barrick, D. (2006). "The notch ankyrin domain folds via a discrete, centralized pathway." Structure **14**(8): 1303-1312.

Broxmeyer, H. E. (2008). "Chemokines in hematopoiesis." Curr Opin Hematol **15**(1): 49-58.

Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M. G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B. G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J. C., Sen, F., Gehrie, E., Li, M., Newcomb, E., Zavadil, J., Meruelo, D., Lipp, M., Ibrahim, S., Efstratiadis, A., Zagzag, D., Bromberg, J. S., Dustin, M. L. & Aifantis, I. (2009). "CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia." Nature **459**(7249): 1000-1004.

Burger, R., Hansen-Hagge, T. E., Drexler, H. G. & Gramatzki, M. (1999). "Heterogeneity of T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines: suggestion for classification by immunophenotype and T-cell receptor studies." Leuk Res **23**(1): 19-27.

Carramolino, L., Zaballos, A., Kremer, L., Villares, R., Martin, P., Ardavin, C., Martinez, A. C. & Marquez, G. (2001). "Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs." Blood **97**(4): 850-857.

Crazzolaro, R., Kreczy, A., Mann, G., Heitger, A., Eibl, G., Fink, F. M., Mohle, R. & Meister, B. (2001). "High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **115**(3): 545-553.

Dos Santos, N. R., Williame, M., Gachet, S., Cormier, F., Janin, A., Weih, D., Weih, F. & Ghysdael, J. (2008). "RelB-dependent stromal cells promote T-cell leukemogenesis." PLoS One **3**(7): e2555.

Ebert, L. M., Schaerli, P. & Moser, B. (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." Mol Immunol **42**(7): 799-809.

Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C. & Bigas, A. (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways." J Biol Chem **278**(34): 32227-32235.

Fernandez, E. J. & Lolis, E. (2002). "Structure, function, and inhibition of chemokines." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 469-499.

Ferris, R. L. & Grandis, J. R. (2007). "NF-kappaB gene signatures and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(19): 5663-5664.

Gerard, C. & Rollins, B. J. (2001). "Chemokines and disease." Nat Immunol **2**(2): 108-115.

Hasegawa, H., Nomura, T., Kohno, M., Tateishi, N., Suzuki, Y., Maeda, N., Fujisawa, R., Yoshie, O. & Fujita, S. (2000). "Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells." Blood **95**(1): 30-38.

Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.

Hegde, S., Pahne, J. & Smola-Hess, S. (2004). "Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression." FASEB J **18**(12): 1439-1441.

Hernandez-Lopez, C., Varas, A., Sacedon, R., Jimenez, E., Munoz, J. J., Zapata, A. G. & Vicente, A. (2002). "Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development." Blood **99**(2): 546-554.

Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B. G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O. & Miyasaka, M. (2004). "Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus." J Biol Chem **279**(50): 51775-51782.

Hong, X., Jiang, F., Kalkanis, S. N., Zhang, Z. G., Zhang, X. P., Decarvalho, A. C., Katakowski, M., Bobbitt, K., Mikkelsen, T. & Chopp, M. (2006). "SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion." Cancer Lett **236**(1): 39-45.

Joyce, J. A. & Pollard, J. W. (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.

Kawamura, M., Ohnishi, H., Guo, S. X., Sheng, X. M., Minegishi, M., Hanada, R., Horibe, K., Hongo, T., Kaneko, Y., Bessho, F., Yanagisawa, M., Sekiya, T. & Hayashi, Y. (1999). "Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia." Leuk Res **23**(2): 115-126.

Laing, K. J. & Secombes, C. J. (2004). "Chemokines." Dev Comp Immunol **28**(5): 443-460.

Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Assfalg, G., Asemissen, A. M., Thiel, E. & Scheibenbogen, C. (2004). "Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis." J Invest Dermatol **122**(3): 685-690.

Luther, S. A. & Cyster, J. G. (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." Nat Immunol **2**(2): 102-107.

Malyukova, A., Dohda, T., Von Der Lehr, N., Akhoondi, S., Corcoran, M., Heyman, M., Spruck, C., Grander, D., Lendahl, U. & Sangfelt, O. (2007). "The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling." Cancer Res **67**(12): 5611-5616.

Mckenzie, G., Ward, G., Stallwood, Y., Briend, E., Papadia, S., Lennard, A., Turner, M., Champion, B. & Hardingham, G. E. (2006). "Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3-kinase-dependent signals." BMC Cell Biol **7**: 10.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., Mcclanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E. & Zlotnik, A. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.

Murdoch, C. & Finn, A. (2000). "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases." Blood **95**(10): 3032-3043.

Nagakubo, D., Jin, Z., Hieshima, K., Nakayama, T., Shirakawa, A. K., Tanaka, Y., Hasegawa, H., Hayashi, T., Tsukasaki, K., Yamada, Y. & Yoshie, O. (2007). "Expression of CCR9 in HTLV-1+ T cells and ATL cells expressing Tax." Int J Cancer **120**(7): 1591-1597.

Norment, A. M., Bogatzki, L. Y., Gantner, B. N. & Bevan, M. J. (2000). "Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling." J Immunol **164**(2): 639-648.

O'neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J. P., Pieters, R., Draetta, G., Sears, R., Clurman, B. E. & Look, A. T. (2007). "FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors." J Exp Med **204**(8): 1813-1824.

Oldham, W. M. & Hamm, H. E. (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.

Onai, N., Kitabatake, M., Zhang, Y. Y., Ishikawa, H., Ishikawa, S. & Matsushima, K. (2002). "Pivotal role of CCL25 (TECK)-CCR9 in the formation of gut cryptopatches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes." Int Immunol **14**(7): 687-694.

Osipo, C., Golde, T. E., Osborne, B. A. & Miele, L. A. (2008). "Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB." Lab Invest **88**(1): 11-17.

Parmo-Cabanas, M., Garcia-Bernal, D., Garcia-Verdugo, R., Kremer, L., Marquez, G. & Teixido, J. (2007). "Intracellular signaling required for CCL25-stimulated T cell adhesion mediated by the integrin alpha4beta1." J Leukoc Biol **82**(2): 380-391.

Patrussi, L. & Baldari, C. T. (2008). "Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells." Immunol Lett **115**(2): 75-82.

Qiuping, Z., Jei, X., Youxin, J., Wei, J., Chun, L., Jin, W., Qun, W., Yan, L., Chunsong, H., Mingzhen, Y., Qingping, G., Kejian, Z., Zhimin, S., Qun, L., Junyan, L. & Jinqun, T. (2004). "CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation." Cancer Res **64**(20): 7579-7587.

Qiuping, Z., Qun, L., Chunsong, H., Xiaolian, Z., Baojun, H., Mingzhen, Y., Chengming, L., Jinshen, H., Qingping, G., Kejian, Z., Zhimin, S., Xuejun, Z., Junyan, L. & Jinqun, T. (2003). "Selectively increased expression and functions of chemokine receptor CCR9 on CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute lymphocytic leukemia." Cancer Res **63**(19): 6469-6477.

Richmond, A. (2008). "CCR9 homes metastatic melanoma cells to the small bowel." Clin Cancer Res **14**(3): 621-623.

Riol-Blanco, L., Sanchez-Sanchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbi, A. L., Sanchez-Mateos, P. & Rodriguez-Fernandez, J. L. (2005). "The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed." J Immunol **174**(7): 4070-4080.

Rivera-Nieves, J., Burcin, T. L., Olson, T. S., Morris, M. A., Mcduffie, M., Cominelli, F. & Ley, K. (2006). "Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis." J Exp Med **203**(4): 907-917.

Rodríguez-Frade, J. M., Serrano, A., Martínez-A, C. & Mellano, M. (2005). "Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling." Volume 8. Springer Berlin Heidelberg. 153-170.

Rosenkilde, M. M. & Schwartz, T. W. (2004). "The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease." APMIS **112**(7-8): 481-495.

Rossi, F. M., Corbel, S. Y., Merzaban, J. S., Carlow, D. A., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L. & Ziltener, H. J. (2005). "Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1." Nat Immunol **6**(6): 626-634.

Sartor, M. & Bradstock, K. (1994). "Detection of intracellular lymphoid differentiation antigens by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia." Cytometry **18**(3): 119-122.

Shields, J. D., Fleury, M. E., Yong, C., Tomei, A. A., Randolph, G. J. & Swartz, M. A. (2007). "Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling." Cancer Cell **11**(6): 526-538.

Singh, S., Singh, U. P., Stiles, J. K., Grizzle, W. E. & Lillard, J. W., Jr. (2004). "Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion." Clin Cancer Res **10**(24): 8743-8750.

Takahama, Y. (2006). "Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection." Nat Rev Immunol **6**(2): 127-135.

Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-134.

Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M. & Cawley, J. C. (2002). "The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes." Blood **99**(8): 2977-2984.

Valdivia-Silva, J. E., Franco-Barraza, J., Silva, A. L., Pont, G. D., Soldevila, G., Meza, I. & Garcia-Zepeda, E. A. (2009). "Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis." Cancer Lett **283**(2): 176-185.

Van Vlierberghe, P., Pieters, R., Beverloo, H. B. & Meijerink, J. P. (2008). "Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **143**(2): 153-168.

Veerman, K. M., Williams, M. J., Uchimura, K., Singer, M. S., Merzaban, J. S., Naus, S., Carlow, D. A., Owen, P., Rivera-Nieves, J., Rosen, S. D. & Ziltener, H. J. (2007). "Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs." Nat Immunol **8**(5): 532-539.

Vogel, C. F. & Matsumura, F. (2009). "A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family." Biochem Pharmacol **77**(4): 734-745.

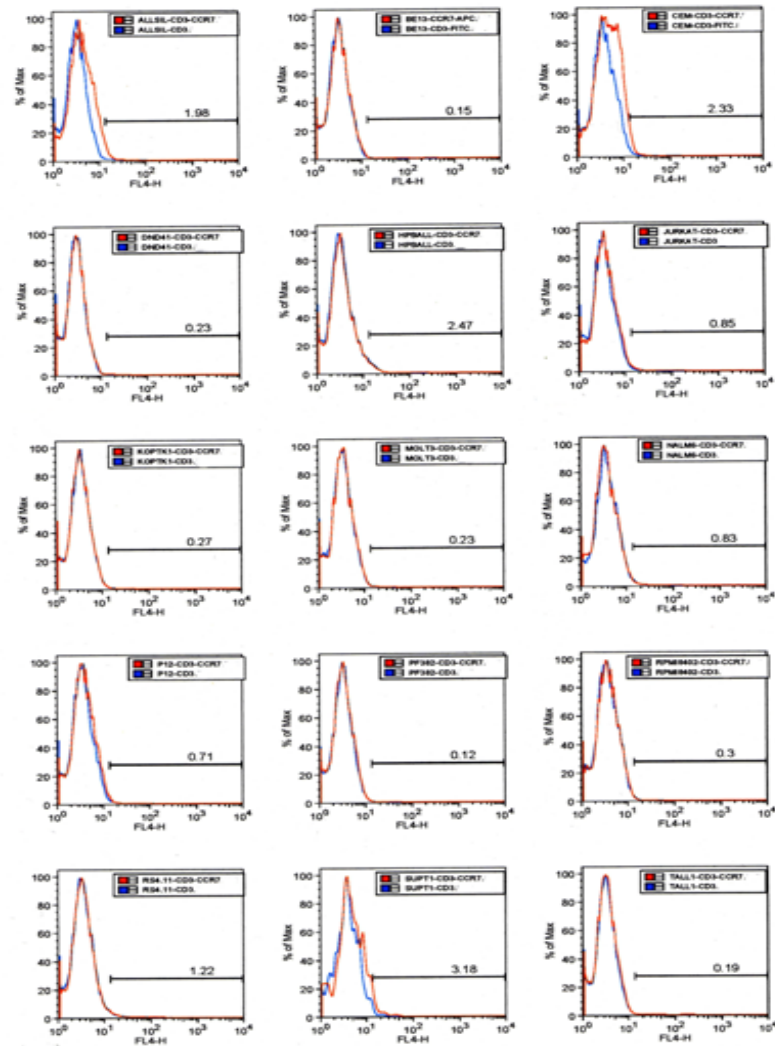
Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A. & Bravo, R. (1995). "Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family." Cell **80**(2): 331-340.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. T., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T. & Aster, J. C. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." Science **306**(5694): 269-271.

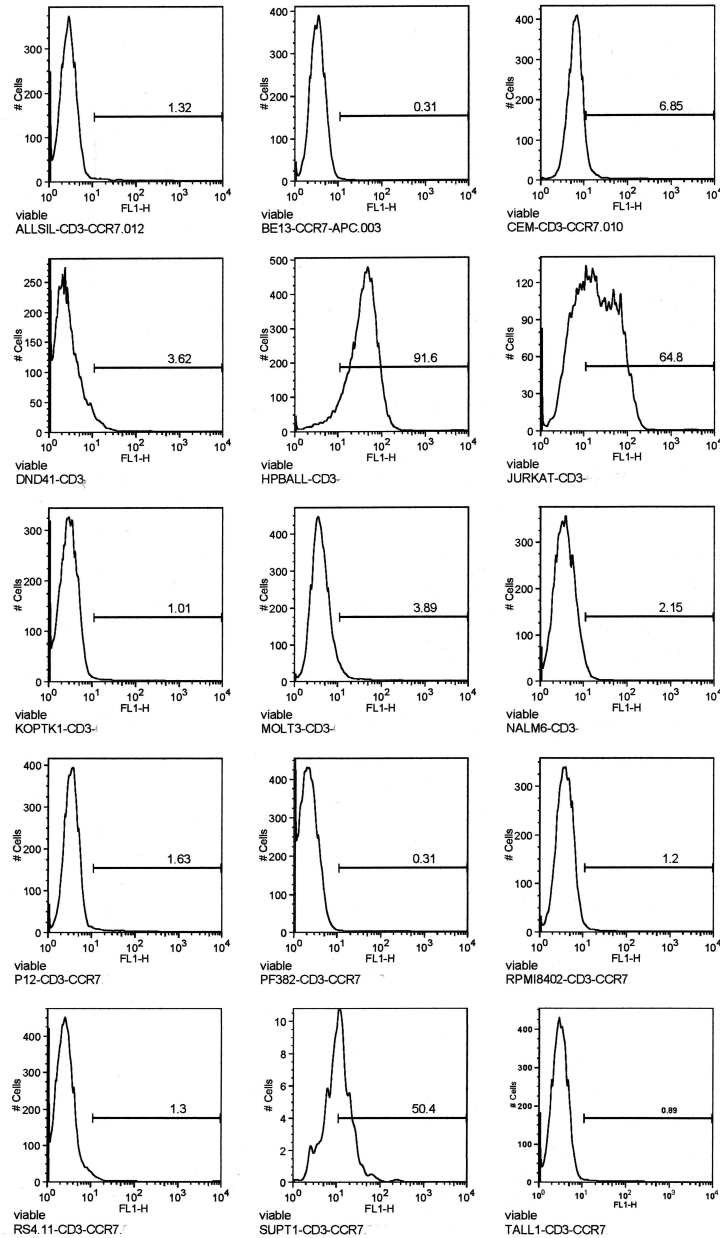
Witt, C. M. & Robey, E. A. (2004). "The ins and outs of CCR7 in the thymus." J Exp Med **200**(4): 405-409.

Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

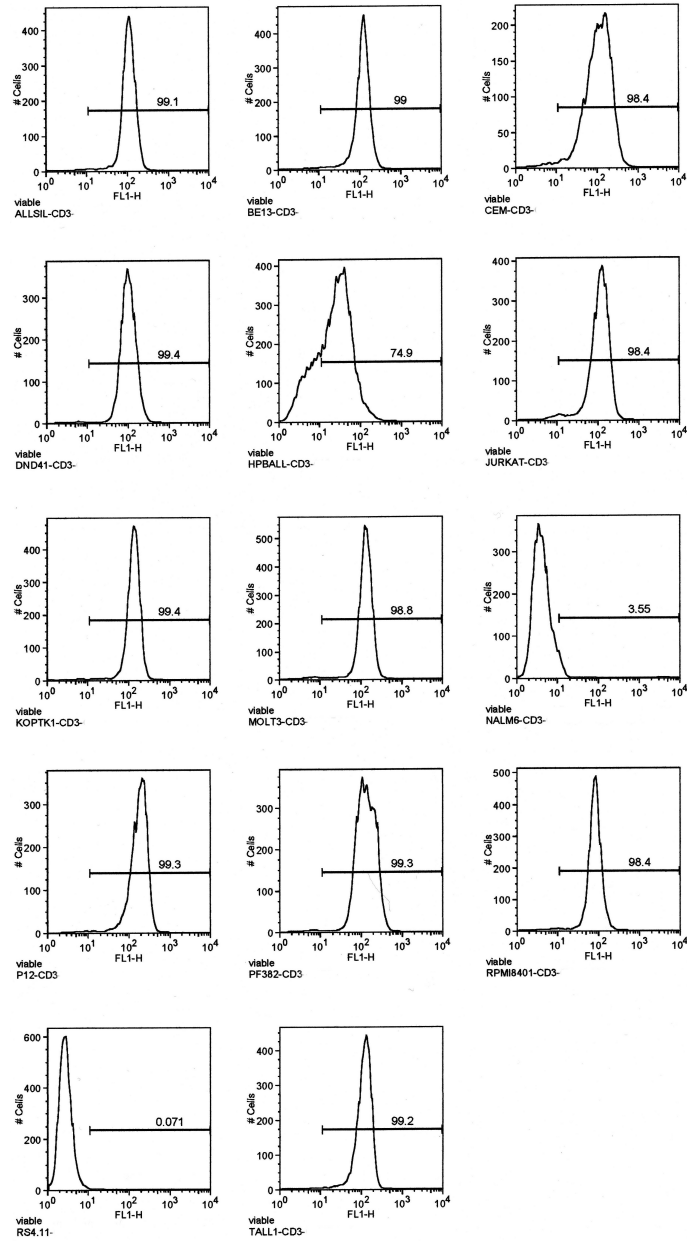
7. Anexos



Anexo I - Resultados de citometria de fluxo intracelular das linhas celulares LLA-T marcadas com IgG-APC e CCR7-APC.



Anexo II - Células derivadas de LLA-T marcadas com anti-CD3-FITC e analisadas por citometria de fluxo de superfície



Anexo III - Células derivadas de LLA-T marcadas com anti-CD3-FITC e analisadas por citometria de fluxo intracelular.