

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIA PEREIRA LEMOS

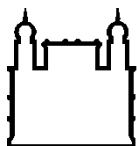
Papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos NOD.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniella Arêas Mendes da Cruz

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIA PEREIRA LEMOS

Papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos NOD.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Daniella Arêas Mendes da Cruz

Aprovada em: 12/11/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo (Presidente)/ FIOCRUZ-RJ
Prof. Dr. Marcelo Einicker/ UFRJ
Prof^a. Dr^a. Jennifer Lowe/ UFRJ
Prof.^a Dr^a. Fernanda Morgado (revisora e suplente)/ FIOCRUZ-RJ
Prof. Dr. Pedro Paulo Manso (suplente)/ FIOCRUZ-RJ

Rio de Janeiro, 12 de novembro de 2018.

Pereira Lemos, Julia.

Papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos NOD / Julia Pereira Lemos. - Rio de janeiro, 2018.

172 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Daniella Arêas Mendes da Cruz.

Bibliografia: f. 98-118

1. Diabetes tipo 1. 2. NOD. 3. Timo. 4. S1P1. 5. VLA-5. I. Título.

**À minha mãe, Célia,
meu anjo na terra,
tudo!
Do início ao fim.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Célia e Cleber, sempre e em primeiro lugar, pelo amor e esforço incondicionais. Por sempre terem investido no meu futuro, possibilitado, apoiado e torcido sempre pelas minhas vitórias. Obrigada por tudo!

À minha irmã, Juliana, pelo maior exemplo de disciplina a ser seguido;

Ao meu marido, Tulio, pela paciência e carinho infinitos, tanto amor e cuidado. Pelo apoio incondicional, por ter e me dar tanta coragem em encarar os desafios futuros e encará-los ao meu lado;

Aos meus amigos da vida, Camila Gotelip, Caroline Gayo, Felipe Alves, Felipe Maggieri, Henrique Amaral, Julliana Sant'Anna, Luiz Fernando Rodrigues, Marcello Corrêa, Paulo Freire e Thábata Santos; pelos muitos anos de amizade, por todos os momentos de descontração e por, apesar da distância imposta pelo cotidiano, me lembrarem que nossa amizade é mais forte e estarmos sempre juntos nos momentos mais importantes;

À minha orientadora, Daniella, a quem dedico toda a minha formação científica, pela confiança e oportunidade dadas a mim, toda orientação prática e teórica, pelas discussões científicas e dedicação a este trabalho;

A todos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, pelo ambiente de trabalho de cada dia que ajudaram a tornar o desenvolvimento desse mais prazeroso; em especial: ao Bruno Cister, Camila Sanches, Larissa Vasconcelos e Rafaela Reis, pela amizade e momentos de descontração e descanso depois do trabalho; à Carolina Messias, todo carinho por você, pela amizade, pela ajuda nos experimentos em geral, por todas as discussões e troca de conhecimentos ao longo de tantos anos, em que nos formamos juntas; ao Valmir Soares e Raquel Martins, pelo suporte técnico, essencial para o funcionamento e rotina do laboratório; aos pesquisadores por todas as discussões, ajudas e críticas ao trabalho; ao Dr. Vinicius Cotta de Almeida, atual chefe do laboratório, por ser como um co-orientador, dar sempre críticas muito construtivas para esse trabalho, mas também por fazer tanta questão em nos manter felizes, motivados e unidos e; ao Dr. Wilson Savino, fundador do laboratório, pela possibilidade de obter minha formação no LPT;

Ao Dr. Otacilio Moreira, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, pela colaboração nos experimentos de PCR;

À Mariana Gandini da Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz-RJ, em que realizei a separação das subpopulações celulares;

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz, pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho;

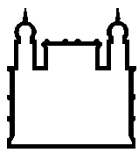
Ao Laboratório de Inflamação, em que fotografei algumas das lâminas de imunofluorescência *in situ*;

À minha revisora, Dra. Fernanda Morgado, por todas as críticas e sugestões que ajudaram a enriquecer e melhorar a redação deste trabalho;

Por fim, agradeço à banca examinadora, por terem aceitado esse convite, pelas críticas e conselhos.

**« Il faut bien que
je supporte deux ou trois chenilles
si je veux connaître les papillons.
Il paraît que c'est tellement beau. »**

(Antoine de de Saint-Exupéry)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

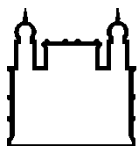
Papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos *NOD*.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Julia Pereira Lemos

Camundongos NOD desenvolvem diabetes tipo 1 (DT1) espontaneamente em decorrência da destruição das células beta pancreáticas de forma T-dependente. Nesse sentido, alguns trabalhos demonstraram o envolvimento do timo na patogênese do DT1. Diversas alterações podem ser observadas no timo de camundongos NOD, como presença de espaços perivasculares (PVS) gigantes contendo timócitos maduros simples-positivos CD4⁺ e CD8⁺, além de células T reguladoras Foxp3⁺. Além disso, timócitos de NOD, principalmente os maduros, apresentam menor expressão da integrina VLA-5 e capacidade migratória reduzida frente ao seu ligante, fibronectina, sugerindo que esse defeito possa estar envolvido na retenção dessas células no órgão. Porém, essa retenção parece ser temporária, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos moleculares regulatórios do processo de saída de células T do timo. Diferentes trabalhos demonstraram o papel essencial do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1) e seu ligante, esfingosina-1-fosfato (S1P), na saída de timócitos do timo em condições normais e patológicas. Sendo assim, o objetivo principal desse trabalho foi investigar o papel das interações mediadas por S1P1 nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos NOD. Através de citometria de fluxo, observamos que timócitos de NOD apresentam menor expressão de S1P1 quando comparados a timócitos de camundongos C57BL/6. Essa menor expressão do receptor também foi observada em timócitos maduros CD62L^{hi}VLA-5⁻, que apresentam fenótipo condizente com o das células que se encontram retidas nos PVS. Ao contrário, células CD62L^{hi}VLA-5⁺ não apresentaram diferença significativa na expressão do receptor. Uma menor expressão do receptor também foi observada em células com fenótipo regulador Foxp3⁺, o que pode explicar seu acúmulo no timo e diminuição na periferia. Através de RT-PCR quantitativo, observamos maior expressão de S1P1 nos timócitos de NOD, o que sugere que haja uma regulação na transcrição do gene do S1P1 e uma modulação na expressão proteica do receptor. Ao avaliarmos a expressão da enzima esfingosina-1-fosfato liase 1, responsável por degradar a S1P e manter seus níveis constantes nos tecidos, observamos uma menor expressão em timócitos maduros de NOD. Diminuição semelhante foi associada a redução da expressão do receptor S1P1 e acúmulo de células maduras no timo, em outros modelos. Em ensaios de transmigração celular, observamos que timócitos maduros CD62L^{hi}VLA-5⁻ de camundongos NOD apresentam reduzida capacidade migratória frente a diferentes concentrações de S1P, quando comparados a timócitos de camundongos C57BL/6. Ao contrário, os timócitos maduros CD62L^{hi}VLA-5⁺ de NOD migraram mais frente às mesmas concentrações. Nós observamos ainda que parece haver uma diminuição da adesão celular à FN quando os timócitos de camundongos C57BL/6 são estimulados simultaneamente com S1P. Não houve diferença na expressão de S1P1 e VLA-5 nas células que se encontram nos linfonodos pancreáticos e no infiltrado inflamatório no pâncreas, sugerindo que as células que conseguem sair do timo não apresentam defeito de expressão desses receptores ou conseguem modular sua expressão na periferia. Em conjunto nossos dados indicam uma modulação de expressão do receptor S1P1 em timócitos de camundongos NOD, colocando a interação S1P/ S1P1 como um potencial componente regulador nos distúrbios migratórios observados nesses animais, assim como na patogênese do DT1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Role of sphingosine 1-phosphate receptor 1 in the intrathymic cell migration disorders in NOD mice.

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Julia Pereira Lemos

NOD mice spontaneously develop type 1 diabetes following T cell-dependent destruction of pancreatic beta cells. Previous works showed the involvement of the thymus in type 1 diabetes pathogenesis. Several alterations are observed in NOD thymus, such as the presence of giant perivascular spaces (PVS) filled with mature single-positive CD4⁺, CD8⁺ and Foxp3⁺ regulatory T cells. Moreover, NOD thymocytes have a reduced expression of the integrin VLA-5 and decreased haptotactic migration towards fibronectin, suggesting that the VLA-5 defect could be involved in the retention of these cells inside the thymus. In contrast, thymocytes retention seems to be temporary, suggesting the involvement of other regulatory molecules related to cell migration. Several reports show the role of the sphingosine-1 phosphate receptor 1 (S1P1) and its ligand, sphingosine-1-phosphate (S1P), on T cell migration and exit from thymus in normal and pathological conditions. Thus, the aim of our work was to investigate the role of S1P1-mediated interactions in NOD mice intrathymic migration disorders. By flow cytometry, we observed a lower S1P1 expression on NOD mice thymocytes compared with C57BL/6 controls, including VLA-5-negative mature CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations, which bear the phenotype of the cells retained within giant PVS. In contrast, mature VLA-5-positive thymocytes did not present significant differences in S1P1 expression. A decreased expression of the receptor was also observed in cells bearing the Foxp3⁺ regulatory phenotype, which can explain its accumulation in the thymus and decrease in the periphery. Interestingly, in quantitative RT-PCR assays, we observed a high expression of S1P1 mRNA transcript, suggesting that NOD mice have a regulation in the transcription of S1P1 gene and a modulation in the protein expression. When evaluating the expression of the enzyme sphingosine-1-phosphate lyase 1, responsible for degrading the S1P and maintaining constant levels in the tissues, we observed a lower expression in NOD mature thymocytes. Such a decrease was associated with the reduction of S1P1 expression and accumulation of mature cells in the thymus, in other models. In transwell migration assays, we observed that NOD mature CD62L^{hi}VLA-5⁻ thymocytes migrate less towards different S1P concentrations when compared with controls. In contrast, NOD mature CD62L^{hi}VLA-5⁺ thymocytes have increased migratory ability towards S1P. We also observed that there seems to be a decrease in cell adhesion to FN when the thymocytes of C57BL mice are stimulated simultaneously with S1P. There was no difference in the expression of S1P1 and VLA-5 in the pancreatic lymph nodes and in the pancreatic inflammatory infiltrate, suggesting that the cells that can leave the thymus do not present a defect of expression of these receptors or they can modulate their expression in the periphery. Our results indicate that it may exist a modulation of S1P1 expression on NOD mice and highlight the importance of the S1P/ S1P1 interaction as an important regulator of the migratory disorders observed in these animals, as well as in type 1 diabetes pathogenesis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Timo.....	1
1.1.1 Desenvolvimento de células T.....	3
1.1.2 Integrinas e moléculas de ECM no desenvolvimento de células T	6
1.1.3 O papel das quimiocinas no desenvolvimento de células T	10
1.2 A esfingosina-1-fosfato e o receptor 1 de esfingosina-1-fosfato.....	12
1.3 O diabetes tipo 1	26
1.3.1 O camundongo NOD	29
1.3.2 O timo dos camundongos NOD.....	32
2. OBJETIVO	38
2.1 Hipótese e objetivo do trabalho	38
2.1.1 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Dosagem da glicemia.....	39
3.3 Expressão de S1P1, SGPL1 e VLA-5 em células T.....	39
3.3.1 Citometria de fluxo.....	39
3.3.2 Imunofluorescência <i>in situ</i>	40
3.3.3 RT-PCR quantitativo	41
3.4 Migração celular em câmara de <i>transwell</i>	43
3.5 Efeito da ativação de S1P1 na expressão e função da integrina VLA-5.....	43
3.5.1 Adesão celular	44
3.6 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Incidência do diabetes tipo 1	45
4.2 Expressão do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato no timo de camundongos NOD	45
4.3 Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da S1P no timo de camundongos NOD.....	54
4.4 Expressão de esfingosina-1-fosfato liase nos timócitos de camundongos NOD.....	55
4.5 Migração dos timócitos de NOD frente a esfingosina-1-fosfato.....	59
4.6 Expressão de S1P1 em células T reguladoras no timo	63
4.7 Efeito da ativação de S1P1 sobre a integrina VLA-5	65

4.8 Expressão de S1P1 e VLA-5 nos linfonodos pancreáticos e pâncreas de camundongos NOD.....	67
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8. ANEXOS.....	103
8.1 Anexo 1.....	103
8.2 Anexo 2.....	124
8.3 Anexo 3.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Localização anatômica do timo em seres humanos.....	1
Figura 1.2 Representação esquemática de um espaço perivascular tímico.	2
Figura 1.3 Representação histológica do timo.	3
Figura 1.4 Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos e do microambiente tímico.	6
Figura 1.5 Representação esquemática de um dímero de fibronectina e seus principais sítios de ligação.....	8
Figura 1.6 Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer durante a diferenciação dos timócitos.	12
Figura 1.7 Representação esquemática da via de síntese e transporte de S1P.	16
Figura 1.8 Esquema representativo da expressão de S1P1 e saída de células T do timo.	21
Figura 1.9 Principais vias de sinalização ativadas pelos receptores de S1P.....	23
Figura 1.10 Esquema ilustrativo do pâncreas mostrando as porções exócrina e endócrina.	28
Figura 1.11 Esquema da cinética de ativação e migração de células T e sua chegada ao pâncreas.....	31
Figura 1.12 Esquema das alterações observadas no timo de camundongos NOD.	34
Figura 1.13 O modelo de migração multivetorial de timócitos.	37
Figura 4.1 Esquema representativo da estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo.....	46
Figura 4.2 Expressão de S1P1 em timócitos de camundongos NOD.	48
Figura 4.3 Expressão de S1P1 em timócitos maduros CD62 ^{hi} de camundongos NOD.	49
Figura 4.4 Expressão de VLA-5 e S1P1 em timócitos maduros CD62L ^{hi} de camundongos NOD.	50
Figura 4.5 Expressão de VLA-5 e S1P1 em timócitos maduros CD62L ^{neg/lo} de camundongos NOD.....	51
Figura 4.6 Expressão de S1P1 em timócitos de NOD com 4 semanas de idade.....	52
Figura 4.7 Expressão de S1P1 no microambiente tímico de camundongos NOD.	53
Figura 4.8 Expressão do RNAm de S1P1 em timócitos de camundongos NOD.	54
Figura 4.9 Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da S1P em timócitos de camundongos NOD.....	55
Figura 4.10 Expressão de SGPL1 nas subpopulações SP CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de camundongos NOD.	56
Figura 4.11 Expressão de SGPL1 em timócitos de camundongos NOD.....	57
Figura 4.12 Expressão de SGPL1 em células VLA-5 ⁺ e VLA-5 ⁻ de camundongos NOD.....	58
Figura 4.13 Expressão de SGPL1 no microambiente tímico de camundongos NOD.....	59
Figura 4.14 Migração dos timócitos de NOD frente a diferentes concentrações de S1P.....	60

Figura 4.15 Capacidade migratória de timócitos SP CD62Lhi VLA-5⁺ e VLA-5⁻ de camundongos NOD.....	61
Figura 4.16 Capacidade migratória de timócitos SP CD62L^{neg/lo} de camundongos NOD.....	62
Figura 4.17 Expressão de S1P1 em células Treg SP CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ de camundongos NOD.....	64
Figura 0.18 Efeito da ativação de S1P1 na expressão de VLA-5 e adesão celular à FN...66	66
Figura 4.19 Expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD.....	68
Figura 4.20 Expressão de S1P1 e VLA-5 no pâncreas de camundongos NOD.....	70
Figura 6.1 O receptor S1P1 e a integrina VLA-5 nos distúrbios de migração intratímica de camundongos NOD.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Expressão dos receptores de S1P nos diferentes órgãos e tecidos, o tipo de proteína G as quais estão acoplados e suas principais funções.	17
Tabela 3.1 Primers e parâmetros da curva padrão para amplificação gênica nos timos de C57BL/6 e NOD.....	42
Tabela 4.1 Taxa de incidência do DT1 na colônia de camundongos NOD mantida no ICTB da Fiocruz/RJ.....	45

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – cassete ligador de ATP (*ATP-binding cassette*)
- ACTB – gene beta-actina (*Beta-actin gene*)
- AMPC – AMP cíclico
- APC – alofococianina (*Allophycocyanin*)
- ApoM – apolipoproteína M
- BrdU- 5-bromo-2'-deoxiuridina (*5-Bromo-2'-Deoxyuridine*)
- BSA – albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- CCL – quimiocina do tipo C-C (*C-C chemokine receptor*)
- CCR – receptor de quimiocina do tipo C-C (*C-C chemokine receptor*)
- CD – grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)
- Cer1P – ceramida-1-fosfato (*Ceramide 1-phosphate*)
- CERS1-6 – ceramida sintase 1-6 (*Ceramide Synthase*)
- CERT – proteína transportadora de ceramida (*ceramide transfer protein*)
- CK – citoqueratina (*Cytokeratin*)
- cTEC – célula epitelial tímica cortica (*Cortical Thymic Epithelial Cell*)
- Ctla – antígeno de linfócito T citotóxico (*cytotoxic T lymphocyte antigen*)
- CXCL – quimiocina do tipo C-X-C (*C-X-C motif chemokine*)
- CXCR – receptor de quimiocina do tipo C-X-C (*C-X-C chemokine receptor*)
- DC – célula dendrítica (*Dendritic Cell*)
- DEGS – dihidroceramida desaturase (*dihydroceramide desaturase*)
- DN – tímócito duplo-negativo, (*Double-Negative Thymocyte*), para as moléculas CD4 e CD8
- DP – tímócito duplo-positivo, (*Double-Positive Thymocyte*), para as moléculas CD4 e CD8
- DT1 – diabetes tipo 1
- ECM – matriz extracelular (*Extracellular Matrix*)
- EDG – gene de diferenciação endotelial (*Endothelial Differentiation Gene*)
- eNOS – Óxido-nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric-oxide synthase*)
- EPM – erro padrão da média
- FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein-5-isothiocyanate*)
- FN – fibronectina (*Fibronectin*)
- Foxp3 – *forkhead box protein 3*
- GAD – *Glutamic acid decarboxylase*
- GPCR – receptor acoplado a proteína G (*G protein-coupled receptor*)

HDL – lipoproteína de alta densidade (*High-density lipoprotein*)
ICAM – molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
Idd – diabetes insulino-dependente (*Insulin dependent diabetes*)
IFN – interferon
IL – interleucina (*Interleukin*)
IPEX – imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*)
KLF – *Kruppel like fator*
LDV – motivo de leucina-ácido aspártico-valina (*Leucine-aspartic acid-valine motif*)
LM – laminina (*Laminin*)
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated Protein Kinase*)
MHC – complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)
mTEC – célula epitelial tímica medular (*Medullary Thymic Epithelial Cell*)
NK – célula matadora natural (*natural-killer*)
NO – óxido nítrico (*Nitric Oxide*)
NOD – camundongo diabético não obeso (*Non-obese diabetic*)
PE – ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
PerCP – proteína piridina de clorofila (*Piridin-chlorophyll-a-protein*)
PI – iodeto de propídeo (*Propidium Iodide*)
PI3K – fosfatidilinositol 3 (*Phosphoinositide 3-kinase*)
Ptpn – *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*
PVS – espaço perivascular (*Perivascular Space*)
RE – retículo endoplasmático
REDV – motivo de arginina-ácido glutâmico-ácido aspártico-valina (*arginine-glutamic acid-aspartic acid-valine motif*)
RGD – motivo de arginina-glicina-ácido aspártico (*Arginine-glycine-aspartic acide motif*)
ROS – espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
S1P – esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate*)
S1P1-5 – receptor 1-5 de esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1-5*)
SFB – soro fetal bovino
SGPL – esfingosina-1-fosfato liase (*Sphingosine 1-phosphate lyase*)
SP – tímócito simples-positivo (*Simple-Positive Thymocyte*)
SPF – livre de patógenos específicos (*Specif Pathogens Free*)
SPHK – esfingosina quinases (*Sphingosine Kinases*)
Spns – *spinster*

TCR – receptor de células T (*T Cell Receptor*)

TEC – célula epitelial tímica (*Thymic Epithelial Cell*)

TLC- cromatografia em camada fina (*Thin-layer Chromatography*)

TNC – complexo *nurse* tímico (*Thymic Nurse Complex*)

TNF – fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

Treg – células T reguladora (*Regulatory T cell*)

VCAM – molécula de adesão vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)

VLA – *Very Late Antigen*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Timo

O timo é um órgão linfoide primário no qual ocorre a diferenciação de células T (Miller and Osoba 1967; Gameiro et al. 2010). Está localizado no mediastino superior, atrás do esterno e na altura dos grandes vasos que emergem do coração (figura 1.1). Possui dois lobos, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso. Desta cápsula, originam-se septos que dividem o parênquima tímico em lóbulos contínuos uns com os outros (Junqueira and Carneiro 2013).

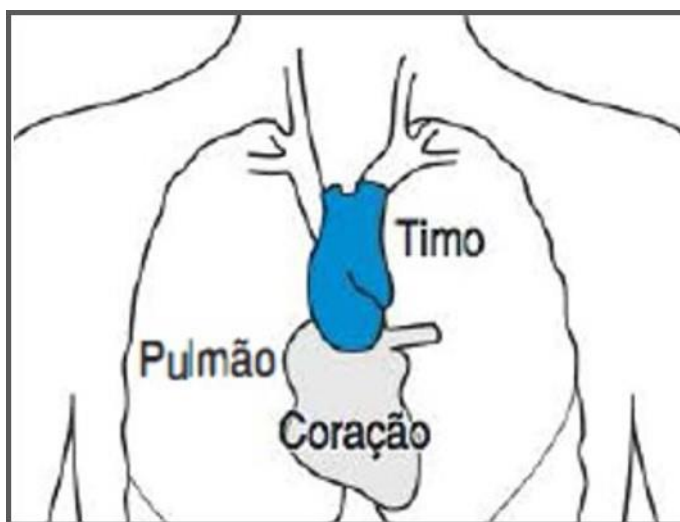


Figura 1.1 Localização anatômica do timo em seres humanos (adaptado de Murphy 2014).

Os principais constituintes celulares do timo são os linfócitos em processo de desenvolvimento (timócitos), as células epiteliais tímicas corticais (cTECs) e medulares (mTECs), macrófagos, fibroblastos e células dendríticas (DC). Essa organização celular tridimensional está entremeada por uma rede de matriz extracelular (ECM) (Savino et al. 2004). Os timócitos agrupam-se mais densamente na periferia de cada lóbulo, levando ao aparecimento de um córtex externo e de uma medula interna, apesar de não haver nenhum limite anatômico bem definido entre essas duas zonas. Estruturalmente, o lóbulo tímico é composto por 4 compartimentos distintos: a zona subcapsular, o córtex, a junção córtico-medular e a medula. O córtex apresenta grande quantidade de cTECs, além de macrófagos e fibroblastos e a medula contém uma rede de mTECs e DCs (Parslow et al. 2004). A junção córtico-medular contém uma densa rede de células endoteliais que permitem a entrada e saída de timócitos. Geralmente, os vasos entram no parênquima tímico no final do septo interlobular. Foi demonstrada a presença de um espaço de tecido conjuntivo que separa cada vaso do compartimento epitelial

do parênquima tímico nas regiões córtico-medular e medular (Sainte-Marie and Leblond 1964). Essa estrutura foi denominada de espaço perivascular (PVS, do inglês *perivascular space*) (Bearman et al. 1975). Esses espaços são encontrados ao redor dos vasos e geralmente estão rodeados por uma fina camada de TECs. Um grande número de células pode ser observado no interior dos PVS, em sua maioria timócitos, além de células B, macrófagos e fibroblastos, em associação a uma rede de matriz extracelular (Savino et al. 1993a; Ushiki and Takeda 1997) (figura 1.2).

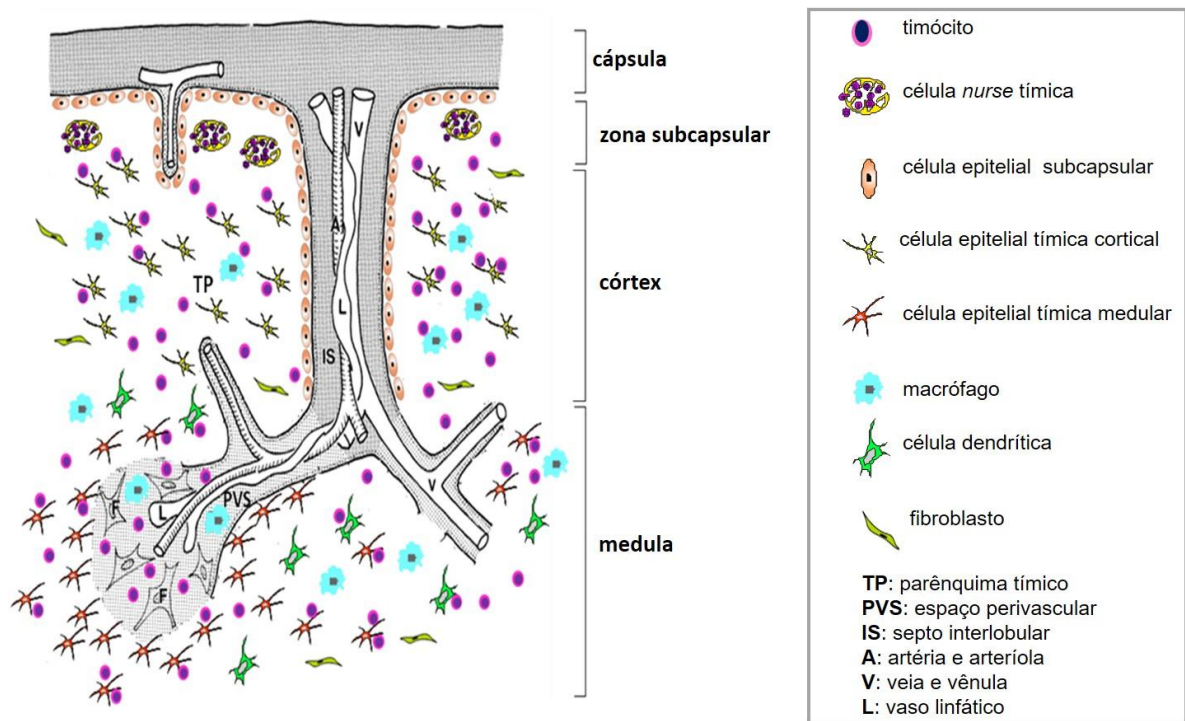


Figura 1.2 Representação esquemática de um espaço perivascular tímico. A figura mostra um esquema de um espaço perivascular (PVS) no timo e seus componentes celulares (adaptado de Ushiki and Takeda 1997).

No córtex, também é possível observar um tipo particular de TEC, o complexo *nurse* tímico (TNC), um complexo linfoepitelial, no qual uma única célula epitelial pode abrigar um número variável de timócitos, em sua maioria imaturos (Savino et al. 2004). Além disso, em algumas áreas da medula tímica, o epitélio forma pequenas estruturas espirais queratinizadas denominadas corpúsculos de Hassal (Figura 1.3) (Parslow et al. 2004).

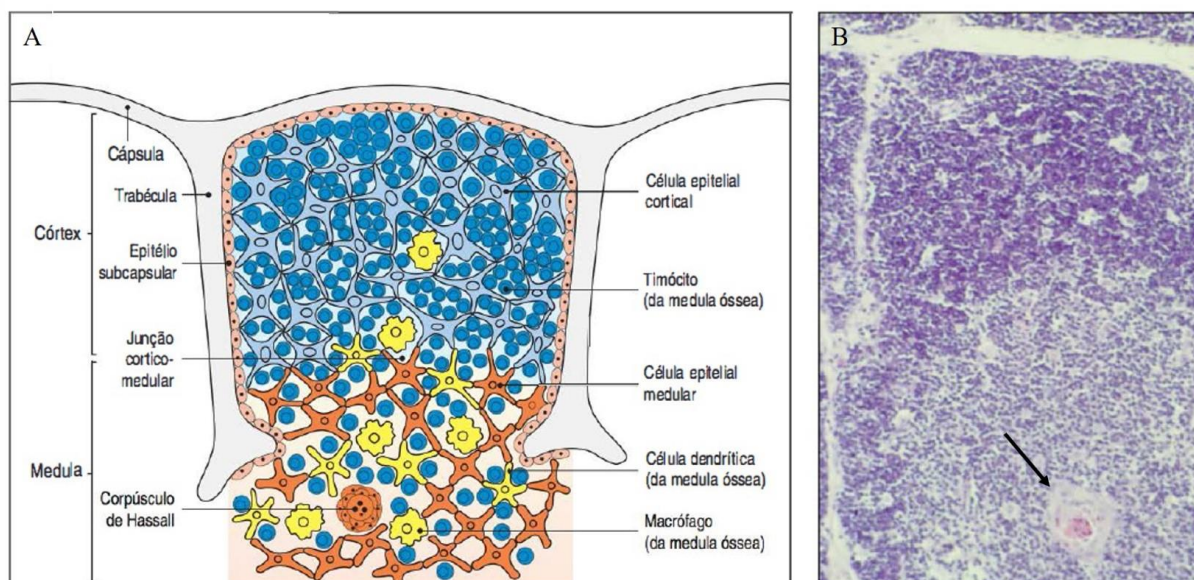


Figura 1.3 Representação histológica do timo. (A), Esquema de um lóbulo tímico, ilustrando seus compartimentos e componentes celulares; (B), Microscopia ótica de um lobo de timo humano corado por hematoxilina e eosina, mostrando o córtex, fortemente corado e a medula com um corpúsculo de Hassal, indicado pela seta preta (adaptado de Murphy 2014).

No timo, ocorrem os processos de diferenciação e seleção de células T, processos esses mediados pelo estroma tímico. Como demonstrado na Figura 1.3A, o estroma é dividido histologicamente em córtex e medula e cada uma dessas regiões contém microambientes específicos que são cruciais para o desenvolvimento das células T e formação do repertório de receptores de célula T (TCR) (Sitnicka 2009). O córtex proporciona um microambiente necessário para a seleção positiva de timócitos imaturos, enquanto na medula, ocorre a seleção negativa de células T com potencial autorreativo, além do desenvolvimento de células T reguladoras, desempenhando papel crucial no estabelecimento da tolerância central.

1.1.1 Desenvolvimento de células T

As células T se desenvolvem no timo a partir de uma célula progenitora linfóide comum proveniente da medula óssea que migra, através da corrente sanguínea, para o timo, no qual entram por meio de vasos presentes na junção córtico-medular e amadurecem. No timo, as células progenitoras recebem um sinal, proveniente do microambiente e transduzido pelo receptor Notch1 que ativa genes específicos, levando ao comprometimento com a linhagem de células T. Acredita-se que a sinalização via Notch é necessária durante todo o desenvolvimento das células T e que esta auxilie também na diferenciação $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ e CD4 ou CD8 (Murphy 2014). Ao entrarem no timo, as células progenitoras são denominadas duplo-negativas (DN), pois não expressam em sua superfície membranar os correceptores CD4 e CD8 ($CD4^{\text{CD8}^{\text{-}}}$),

além do complexo CD3:TCR. Essas células correspondem a cerca de 5 % do total de timócitos no timo. Os timócitos DN de camundongos são ainda subdivididos, com base na expressão das moléculas CD44 e CD25, em quatro estágios fenotípicos denominados DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) e DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Godfrey DI et al. 1993). Durante o estágio DN as células sofrem rearranjo gênico da cadeia β ou das cadeias $\gamma\delta$ do TCR, determinando se os timócitos serão $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, embora a maioria se desenvolva em $\alpha\beta$ (Carpenter and Bosselut 2010). O rearranjo do gene da cadeia β do TCR inicia na fase DN2 e continua na fase DN3. Nessa fase, tem início a expressão das proteínas Rag1 e Rag2, necessárias para que o rearranjo dos genes do TCR ocorra. As células que não realizam um rearranjo bem-sucedido permanecem no estágio DN3 e morrem; ao contrário, as células que sofrem um rearranjo bem-sucedido passam para o estágio DN4 e proliferam intensivamente. Nessa etapa, as células expressam um pré-TCR que se encontra associado ao complexo molecular CD3, necessário para a sinalização do receptor. A expressão do pré-TCR leva à proliferação celular, parada do rearranjo dos genes da cadeia β e a expressão dos correceptores CD4 e CD8, determinando o estágio duplo-positivo (DP) CD4⁺CD8⁺, que representa cerca de 80 % dos timócitos (Murphy 2014). Nessa etapa tem início o rearranjo dos genes da cadeia α , levando à expressão do complexo TCR $\alpha\beta$ definitivo, tornando as células DP responsivas aos antígenos e então sujeitas aos processos de seleção positiva e negativa (Carpenter and Bosselut 2010). A expressão das enzimas Rag1 e Rag2 e a recombinação dos genes do TCR são interrompidas nesse estágio do desenvolvimento (Murphy 2014).

As células T respondem aos antígenos que se encontram na forma de pequenos peptídeos ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I ou de classe II. Os processos de seleção positiva e negativa ocorrem através da interação do TCR $\alpha\beta$ das células T DP com complexos MHC associados a peptídeos próprios (pMHC) expressos pelo epitélio tímico e pelas DCs (Carpenter and Bosselut 2010). Timócitos que expressam TCRs que não interagem com o complexo pMHC não recebem os sinais necessários à sua sobrevivência e por isso morrem por negligência. Da mesma forma, timócitos DP que apresentam receptores que interagem com alta avidéz com peptídeos próprios, morrem por apoptose, evitando o desenvolvimento de células com potencial autoimune no processo de seleção negativa. As células que possuem TCRs que se ligam aos pMHC com avidéz moderada são selecionados positivamente, seguindo no processo de diferenciação (Germain 2002).

A expressão da proteína AIRE induz a expressão de diversos genes tecido-específicos no timo, disponibilizando uma variedade de peptídeos extratímicos tecido-específicos apresentados no processo de seleção negativa. Esses processos determinam que as células T

maduras que deixam o timo sejam restritas ao MHC e tolerantes a muitos autoantígenos. Os timócitos que expressam TCRs que se associam com autopeptídeos ligados ao MHC de classe I perdem a expressão da molécula CD4 e tornam-se TCR^{hi}CD4⁻CD8⁺ (cerca de 5 %), enquanto aquelas que expressam TCRs que se associam ao MHC classe II se tornam TCR^{hi}CD4⁺CD8⁻ (cerca de 10 %). Nesse estágio final do desenvolvimento, são chamadas de timócitos simples-positivos (SP) e são agora células maduras e prontas para deixar o timo e exercer suas funções efetoras na periferia. Alternativamente, alguns clones que reconhecem autoantígenos com avidéz elevada se diferenciam em células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺, um mecanismo que parece depender da avidéz e duração da sinalização do TCR, sobrevivência mediada por TGF- β e citocinas, tais como IL-2, IL-7, e IL-15 (Ohkura and Sakaguchi 2010; Josefowicz et al. 2012). Essas células derivadas do timo representam a maioria das Tregs na periferia, em comparação com Tregs diferenciadas a partir de células T *naïve* convencionais (Richards et al. 2015). O tempo que a célula progenitora leva para entrar no timo até a saída da célula T madura é de cerca de 3 semanas em camundongos (Murphy 2014).

O processo de maturação dos timócitos ocorre simultaneamente à migração dessas células e, durante esse processo, estas interagem com diferentes componentes do microambiente tímico essenciais para o seu desenvolvimento. Como ilustrado na figura 1.4, a maioria dos timócitos imaturos (DN e DP) encontra-se na região cortical, enquanto células maduras (SP CD4⁺ e CD8⁺) são encontradas na medula (Boyd and Hugo 1991; Anderson et al. 1996; Savino et al. 2002). Essa migração é regulada principalmente por moléculas de ECM e moléculas solúveis, como as quimiocinas. Mudanças na expressão de quimiocinas e seus receptores permitem que os timócitos interajam com os diferentes nichos do microambiente tímico, necessários em cada etapa do seu desenvolvimento (Bunting et al. 2011).

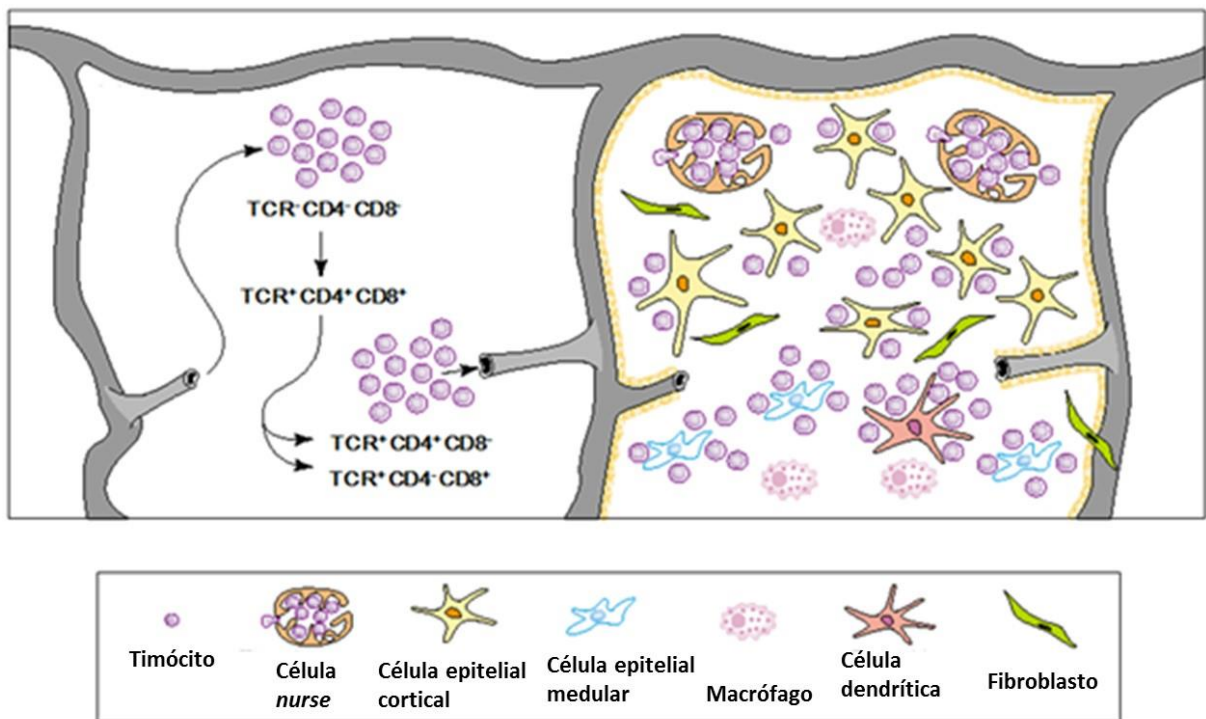


Figura 1.4 Representação esquemática do processo de diferenciação e migração de timócitos e do microambiente tímico. Células progenitoras entram no timo através da junção córtico-medular e migram no interior do órgão durante o processo de diferenciação, durante o qual entram em contato com diferentes componentes do microambiente tímico presentes em cada região do lóbulo (adaptado de Savino et al. 2002).

1.1.2 Integrinas e moléculas de ECM no desenvolvimento de células T

Além dos componentes celulares do timo, durante o processo de diferenciação os timócitos entram em contato com moléculas de ECM e quimiocinas, componentes essenciais para a migração e desenvolvimento das células T.

Os principais componentes de ECM no timo são colágeno, laminina (LM) e fibronectina (FN). Essas moléculas estão distribuídas heterogeneamente no parênquima tímico; formam fibrilas mais finas na região cortical, e mais grossas e abundantes na região medular. São produzidas por diferentes componentes celulares do microambiente tímico, como TECs, TNCs e fibroblastos (Savino et al. 2002, 2004). Timócitos são capazes de aderir e migrar frente a essas moléculas através de integrinas expressas em sua superfície.

As integrinas são uma família de glicoproteínas heterodiméricas transmembranares presentes em quase todas as células e capazes de mediar interações célula-célula e célula-ECM (Barczyk et al. 2010). Até o momento, pelo menos 24 heterodímeros de integrinas foram identificados. Estes são formados pela combinação de 18 subunidades α e 8 subunidades β , que interagem de forma não covalente (Hynes 2002, 2004; Takada et al. 2007; Chen et al. 2013a). As subunidades α variam em tamanho de 120-180 kDa e as subunidades β de 90-110 kDa (Hunt

III et al. 1996). Cada integrina possui um domínio extracelular, um único domínio transmembranar tipo I e um domínio citoplasmático que forma conexões com o citoesqueleto (Hynes 2004). A heterodimerização ocorre antes do transporte da integrina e subunidades α e β livres não são encontradas na superfície celular (Humphries 2000). A especificidade da ligação se dá pelo domínio extracelular. Cinco grupos foram identificados: ligantes de arginina-glicina-aspartato (RGD); família $\alpha 4$, que reconhecem leucina-ácido aspártico-valina (LDV); ligante de LM; ligante de colágeno I e integrina leucocitária. Aproximadamente um terço das integrinas tem sítio de ligação a RGD, presente em muitas proteínas de ECM. As integrinas não agem somente como moléculas adesivas, podendo controlar uma variedade de funções celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência, motilidade e expressão gênica (Chen et al. 2013). As integrinas podem ser classificadas em subfamílias de acordo com as propriedades de ligação aos ligantes ou ainda pela sua composição. As integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e α_v correspondem aos três maiores grupos baseado nessa classificação (Barczyk et al. 2010). O maior, a subfamília $\beta 1$, é classicamente denominado VLA (do inglês *very late antigen*). As integrinas deste subgrupo compartilham a subunidade $\beta 1$ combinada a 12 diferentes subunidades α . Dentre essas integrinas, encontram-se expressos pelos timócitos, os receptores de FN $\alpha 5\beta 1$ (ou VLA-5) e $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4), e o receptor de LM $\alpha 6\beta 1$ (ou VLA-6), entre outros (Geutskens et al. 2004).

A FN é uma proteína extracelular glicosilada, expressa por diversos tipos celulares, em que tem diversos papéis em adesão celular, migração, crescimento e diferenciação. É comumente expressa como um dímero, composto de monômeros idênticos, com aproximadamente 250 kDa, ligados covalentemente por um par de pontes dissulfeto próximo a sua porção C-terminal (Pankov and Kenneth 2002). Cada monômero é constituído pelo arranjo de três subunidades que se repetem, denominadas FNI, FNII e FNIII e embora, as moléculas de FN sejam o produto de um único gene, o *splicing* alternativo de um único pré-mRNA resulta em múltiplas formas da proteína (Baron et al. 1990; Main et al. 1992; Pickford et al. 1997; Pankov and Kenneth 2002; White et al. 2008) (Figura 1.5).

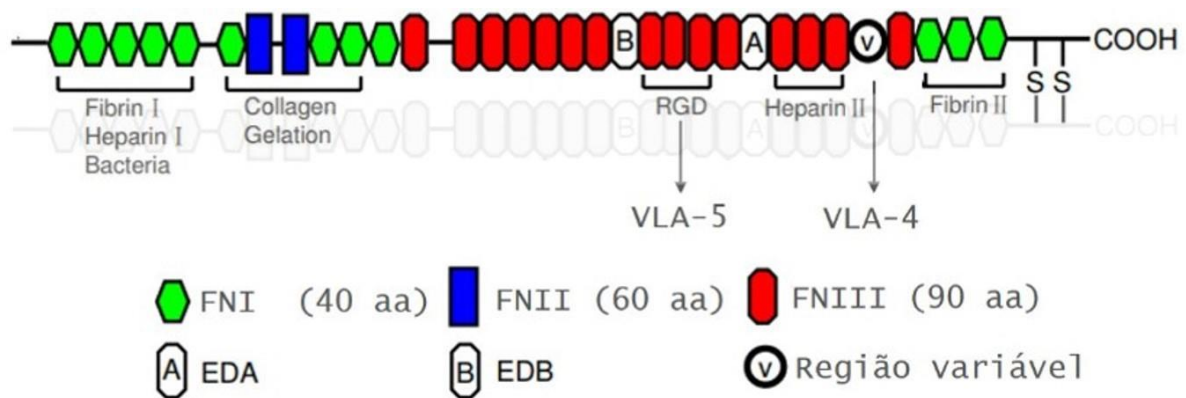


Figura 1.5 Representação esquemática de um dímero de fibronectina e seus principais sítios de ligação. Cada monômero é composto por uma combinação linear de números distintos das subunidades FNI, FNII e FNIII, além dos domínios extras EDA e EDB e da região variável (V). Os monômeros são ligados entre si por duas pontes dissulfeto entre as porções C-terminal. Os principais sítios de ligação as integrinas VLA-4 e VLA-5 no timo estão representados por setas, além de outras regiões de ligação a células e outras moléculas (adaptado de Wang et al. 2008).

Fibronectina é o principal componente estrutural no timo adulto e é comumente encontrada adjacente à mTECs, macrófagos e fibroblastos (Berrih et al. 1985; Lannes-Vieira et al. 1991; Savino et al. 2000). A isoforma clássica da FN, reconhecida através de uma sequência tripeptídica na região central, denominada RGD (arginina-glicina-aspartato), é expressa em todo parênquima tímico. Por outro lado, a forma alternativa, derivada de *splicing* do pré-mRNA e reconhecida pela integrina VLA-4 através de peptídeos contendo uma sequência consenso na região variável, denominada LDV (leucina-ácido aspártico-valina), é restrita à medula (Crisa et al. 1996; Humphries et al. 2006; Chen et al. 2013).

Timócitos expressam VLA-5 e VLA-4 diferencialmente dependendo do estágio de diferenciação, mediando adesão celular estável ou migração (Crisa et al. 1996b). VLA-4 é expressa por quase todos os timócitos, com expressão maior em timócitos DN, diminuindo durante a diferenciação, sendo discretamente e fortemente menor em células DP e SP, respectivamente, o que torna as células SP menos adesivas a células do estroma tímico (Sawada et al. 1992; Mojciak et al. 1995). VLA-5 também é expressa pela maioria dos timócitos, porém sua expressão é maior em células DN, diminui no estágio DP e aumenta novamente em timócitos maduros SP (Mojciak et al. 1995). Durante o desenvolvimento embrionário, a FN secretada por TECs e VLA-5 parecem estar envolvidas na entrada de células precursoras no timo (Savagner et al. 1986). Seguindo o processo de maturação, o bloqueio da adesão de timócitos a FN, usando inibidor de integrina $\beta 1$ no timo, anticorpo anti-FN ou peptídeos sintéticos, leva ao bloqueio parcial da diferenciação DN – DP e redução de célula SP CD4⁺ (Utsumi et al. 1991; Schmeissner et al. 2001). Timócitos imaturos usam preferencialmente o

receptor VLA-4 para aderir e migrar sobre FN, enquanto células maduras SP usam ambos VLA-4 e VLA-5, o que parece induzir migração em vez de firme adesão. Foi demonstrado que células DP aderentes e não aderentes expressam quantidades semelhantes de VLA-4, o que sugere que ocorra uma modulação funcional da integrina, uma vez que os timócitos DP são mais estacionários e menos proliferativos antes da seleção positiva, enquanto células DP positivamente selecionadas e células SP apresentam maior capacidade migratória frente a FN (Salomon et al. 1994; Crisa et al. 1996b). A menor abundância da isoforma de FN que contém a sequência LDV no córtex tímico, assim como o aumento da expressão de VLA-5 em células SP, parecem prevenir a migração precoce de células imaturas para a medula e favorecer a migração dos timócitos nas etapas mais avançadas do desenvolvimento, em que encontram uma alta concentração de FN na medula (Rothenberg 1992; Crisa et al. 1996b).

A LM é uma glicoproteína formada pela combinação de três cadeias geradas pela transcrição de genes distintos. Pelo menos 18 isoformas de LM já foram descritas, com 5 cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ caracterizadas (Savino et al. 2015a). Diferentes isoformas de LM também são encontradas no timo, como a LM-111, LM-211 e LM-332. Estas estão heterogeneamente distribuídas pelo parênquima tímico, produzidas por TECs, TNCs, células fagocíticas e fibroblastos (Anderson et al. 1997; Savino et al. 2000; Suniara et al. 2000). O desenvolvimento anormal de timócitos foi visto em animais que não expressam essas isoformas de LM, sugerindo que essas moléculas têm participação na progressão da diferenciação intratímica (Savino et al. 2004). Da mesma forma, os timócitos expressam constitutivamente os receptores de LM, sendo a integrina VLA-6 a mais estudada, além de VLA-3 e $\alpha\beta 4$ (Wadsworth et al. 1992; Chang et al. 1993; Savino et al. 1993; Ocampo et al. 2008). Essa expressão leva a interações entre TEC e timócitos e migração em timo murino e humano. Foi demonstrado que integrinas $\alpha 6$ presentes no endotélio vascular participam no *homing* de progenitores de células T para o timo durante a embriogênese e que a isoforma LM-111 é relevante nesse processo (Ruiz et al. 1995; Savino et al. 2004; Stimamiglio et al. 2010). Por outro lado, o modelo murino mutante *dy/dy*, que não expressa LM-211, apresenta desenvolvimento anormal de timócitos. Observa-se atrofia e desorganização tímica com redução da região cortical nesses animais devido a redução dos números de células DP e defeito na progressão DN – DP, sugerindo que essa isoforma seja crítica durante os estágios iniciais do desenvolvimento de células T (Magner et al. 2000). A isoforma LM-332 é principalmente expressa na medula por mTECs e células SP CD8⁺ são capazes de aderir a essa isoforma através da integrina $\alpha\beta 4$. Essa isoforma também foi capaz de inibir a proliferação celular induzida por anti-CD3 e IL-2 e induzir migração celular, *in vitro* (Vivinus-Nebot et al. 1999; Kutleša et al. 2002).

As proteínas de ECM formam uma ponte entre os timócitos e as células do microambiente tímico que também expressam seus receptores. Essa interação é crucial, uma vez que a migração celular é resultado da adesão e de-adesão dos timócitos ao substrato, além de direcionar a migração e diferenciação dessas células. O tratamento com anticorpos bloqueadores de integrinas, anti-ECM ou inibidores da integrina $\beta 1$, levam a diminuição da adesão a proteínas de ECM e, conseqüentemente, a defeitos ou interrupção da diferenciação de timócitos (Savino et al. 2002).

1.1.3 O papel das quimiocinas no desenvolvimento de células T

Além das moléculas de ECM, diferentes quimiocinas são produzidas pelas células do microambiente tímico, como CCL25, CCL19 e CXCL12. Da mesma forma, timócitos em desenvolvimento mudam a expressão de receptores de quimiocinas de acordo com seu estágio de maturação, o que parece ter importante papel no seu tropismo por diferentes compartimentos correspondente à expressão das diferentes quimiocinas no microambiente tímico (Savino et al. 2003). Em camundongos, diversas quimiocinas estão presentes no timo fetal, porém as sinalizações via CCR7 e seus ligantes CCL21 e CCL19, além de CCR9 e seu ligante CCL25 parecem ser as duas principais responsáveis pela entrada de precursores no timo, com alguma participação de CXCR4, receptor de CXCL12 (Bleul and Boehm 2000; Liu et al. 2005; Jenkinson et al. 2007). As primeiras parecem ser de grande importância na primeira onda de colonização tímica antes da vascularização, ao passo que a sinalização via CXCR4/ CXCL12 parece ser de grande contribuição na segunda onda de colonização pós-vascularização (Ara et al. 2003). No timo adulto, a quimiocina CCL25 juntamente com a P-selectina são de grande importância para o recrutamento de progenitores, uma vez que a expressão de ambas é aumentada quando a ocupação no timo é baixa (Rossi et al. 2005; Gossens et al. 2009). Além disso, a frequência de células DN1 e DN2 diminui em animais *knockout* para CCR9 (Krueger et al. 2010). Alguns estudos também sugerem a participação de CCR7, além de CXCR4 e CCR5, nessa fase (Robertson et al. 2006).

No parênquima tímico, as principais quimiocinas expressas no córtex são CCL25 e CXCL12 e na medula CCL19, CCL21, CCL17 e CCL22 (Bunting et al. 2011). Timócitos mais imaturos expressam baixos níveis de CXCR4, CCR7 e CCR9 e são responsivos a CXCL12 e CCL25; dessa forma, se afastam da junção córtico-medular e iniciam o processo de maturação no córtex (Plotkin et al. 2003; Ueno et al. 2004). Antes da seleção positiva, timócitos DP apresentam pouca ou nenhuma expressão de CCR7, altos níveis de CXCR4 e CCR9 e baixos níveis de CCR8, sendo altamente responsivos a CXCL12 e CCL25 (Schabath et al. 1999).

Timócitos que sobrevivem à seleção positiva sofrem mudança na expressão dos receptores de quimiocinas. Há redução da expressão de CXCR4 (Suzuki et al. 1999) e indução de CCR4, CCR7 e CCR9, levando ao aumento da capacidade migratória frente à CCL19, CCL21, CCL25 e CCL22 (ligante de CCR4); dessa forma, células DP se tornam responsivas a quimiocinas expressas na porção medular (Ueno et al. 2004). É possível que a sinalização via CCR9/CCL25 aja de forma repulsiva nesse processo. A maioria dos timócitos SP CD4⁺ e CD8⁺ expressam CCR7, uma fração de timócitos SP CD4⁺ e, principalmente SP CD8⁺, expressam CCR9 e ambos expressam baixos níveis de CXCR4 (Kim et al. 1998). Um papel para CCR7 foi sugerido no processo de seleção negativa, uma vez que ausência de sinal via CCR7 leva a uma interação menos estável de timócitos com mTECs e DCs e ao desenvolvimento de autoimunidade nesses animais (Davalos-Misslitz et al. 2007).

Finalmente, o receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1), expresso em timócitos maduros, e seu ligante, a esfingosina-1-fosfato (S1P) são os principais envolvidos na saída de células T maduras do timo (Drennan et al. 2009). Porém, acredita-se que algumas quimiocinas possam ter um papel suplementar nesse processo. Células SP maduras apresentam altos níveis de CCR7, o que sugere que CCL19 e CCL21 possam participar da saída das células do timo. CCL19 parece manter as células maduras próximas ao endotélio, facilitando a responsividade a S1P (Campbell et al. 1999) e, ainda, CXCL12 pode agir como quimiorrepulsor em altas concentrações, facilitando a saída dos timócitos do timo (Poznansky et al. 2002).

Assim, os mecanismos moleculares que governam a migração dos timócitos e sua diferenciação são complexos e envolvem diferentes tipos de interações celulares. A migração dessas células deriva de um balanço entre essas interações e diferentes estímulos simultâneos e/ou sequenciais, envolvendo quimiocinas e proteínas de ECM adesivas e de-adesivas (Savino et al. 2003). As quimiocinas podem se ligar e ser apresentadas por componentes da ECM que ajudam na manutenção dos gradientes de concentração dessas proteínas solúveis e potencializam seus efeitos (Savino et al. 2002, 2004). A figura 1.6 mostra um esquema de alguns tipos de interações que podem ocorrer no microambiente tímico durante o processo de diferenciação de timócitos.

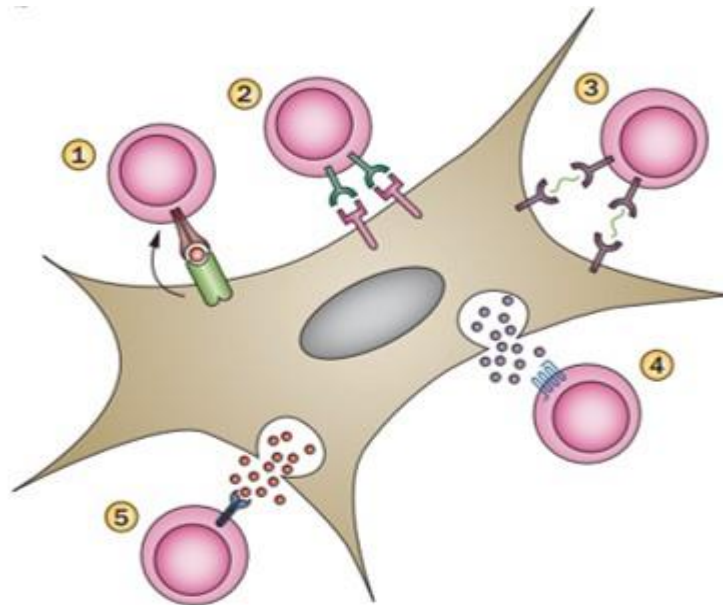


Figura 1.6 Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer durante a diferenciação dos timócitos. (1) Interação TCR/ peptídeo endógeno-MHC, que ocorre no contexto das seleções positiva e negativa; (2) interação direta célula-célula; (3) interação entre ECM-integrina, que forma pontes entre os timócitos e as células do microambiente tímico; (4) típica interação quimiocina/ receptor de quimiocina; (5) citocinas e hormônios, como IL-7 e prolactina (adaptado de Savino et al. 2015b).

1.2 A esfingosina-1-fosfato e o receptor 1 de esfingosina-1-fosfato

A S1P é um esfingolípido bioativo que se comporta como segundo mensageiro intracelular de algumas citocinas e como mediador extracelular autócrino e parácrino. Estimula uma variedade de eventos de sinalização intracelular, como ativação de fosfolipase C, aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, regulação da adenilato ciclase, ativação da via das MAPK e da cascata de Rho (Murata et al. 2000).

Esfingolípídios são uma das maiores famílias de lípidios presentes em eucariotos e diferem dos fosfolípídios, que são mais abundantes, pela cabeça de serina em vez de glicerol, na qual sua cauda hidrofóbica está ligada. Esfingolípídios tendem a se associar mais firmemente uns aos outros do que os fosfolípídios na membrana celular, modulando a fluidez da membrana e formando, juntamente com o colesterol, a base das regiões conhecidas como *lipid rafts* (Don et al. 2014). Esses lípidios podem ser rapidamente metabolizados quando estimulados por receptores presentes na membrana plasmática (Rivera et al. 2008). Ceramida, ceramida-1-fosfato (Cer1P), esfingosina e S1P são metabólitos de abundância relativamente baixa. A S1P é derivada de duas etapas enzimáticas, a partir do metabólito central, a ceramida, e o balanço entre esses dois metabólitos é conhecido como *sphingolipid rheostat* (Cuvillier et al. 1996).

A síntese dos esfingolipídios se inicia no retículo endoplasmático (RE), em que a dihidroesfingosina (ou esfinganina) é formada pela condensação de serina e palmitoil-coenzima A, catalisada pelo complexo enzimático serina-palmitoiltransferase, seguida da redução da 3'-cetodihidroesfingosina formada. A dihidroesfingosina é substrato para a formação da dihidroceramida, através da transferência de uma cadeia de ácidos graxos de tamanho variável ao grupamento amina livre, reação catabolizada por uma família de 6 ceramida sintases (CERS1-6). A ceramida é então formada pela dessaturação da dihidroceramida pelas dihidroceramida dessaturases (DEGS1 e 2). A formação de ceramida pode ser estimulada por diversos fatores, como TNF- α , hipóxia e alguns agentes quimioterápicos (Watterson et al. 2003a). A ceramida é então transportada para o complexo de Golgi, pela proteína transportadora de ceramida (CERT), em que grupamentos funcionais são transferidos para o hidroxil primário, formando esfingomiéline, Cer1P ou glicolipídios. Diferentes esfingomiélinases e ceramidases catabolizam o metabolismo da esfingomiéline ou da ceramida em diferentes compartimentos celulares. A degradação da esfingomiéline ocorre pela ação da esfingomiélinase que hidrolisa o substrato à ceramida nos lisossomos, nos endossomos ou na membrana plasmática em resposta a fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, ácido araquidônico e ao estresse celular. A enzima ceramidase catalisa a deacetilação da ceramida, seja ela produzida pela via de síntese ou de degradação da esfingomiéline, levando à formação da esfingosina. A esfingosina pode ser reciclada para a síntese de novos esfingolipídios ou servir de substrato para fosforilação por esfingosina quinases (SPHK1 e 2), formando S1P. A S1P pode ser convertida a esfingosina novamente pela ação das esfingosina-1-fosfato fosfatases (SGPP1 e 2) ou ser degradada de forma irreversível pela enzima S1P liase (SGPL), produzindo fosfoetanolamina e 2-hexadecenal, que podem ser reciclados para a síntese de novos lipídios (Watterson et al. 2003a; Don et al. 2014).

Acredita-se que todas as células sejam capazes de gerar S1P como um metabólito intermediário do metabolismo de esfingolipídios (Hannun and Obeid 2008), sendo este lipídio capaz de agir diretamente em alvos intracelulares (Liu et al. 2012). A concentração intracelular da S1P é controlada pela ativação das enzimas envolvidas no seu metabolismo, como as SPHK1 e 2 e a SGPL (Brinkmann 2007) e alguns alvos intracelulares da S1P são a histona deacetilase (HDAC), o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2) e a proibitina 6 (Liu et al. 2012). Já a concentração extracelular, parece ser mantida principalmente por plaquetas ativadas e eritrócitos no sangue (Pappu et al. 2007), além de células endoteliais, mastócitos (Brinkmann 2007), macrófagos, neutrófilos (Thuy et al. 2014) e pericitos (Zachariah and Cyster 2010) que também a produzem. Foi demonstrado que as concentrações de S1P no plasma se correlacionam com a contagem de eritrócitos (Ohkawa et al. 2008; Bode et al. 2010; Ono et al. 2013).

Eritrócitos são a principal fonte de S1P no sangue, pois não possuem a enzima SGPL que a degrada irreversivelmente, além de serem capazes de importar, estocar e manter altas concentrações de S1P (Spiegel and Milstien 2011; Thuy et al. 2014). Na linfa, as células endoteliais linfáticas parecem ser a principal fonte de S1P (Pham et al. 2010; Spiegel and Milstien 2011).

A produção, metabolismo e transporte de S1P para fora da célula mantêm um gradiente entre os compartimentos vasculares (plasma/soro) e os compartimentos extravasculares (tecidos). Muitos métodos foram utilizados para quantificar a concentração de S1P no espaço extracelular e, embora os números exatos variem, sua concentração no plasma e na linfa alcança a ordem de micromolar. Por outro lado, é muito difícil determinar a quantificação exata da concentração de S1P no fluido intersticial dos órgãos linfoides, devido à dificuldade em se obter volume de amostra suficiente sem romper as células e causar a liberação da S1P intracelular e inflamação. Uma forma de obter uma quantificação aproximada é avaliar a expressão do S1P1 em células T *naïve*, uma vez que o receptor é internalizado quando exposto a S1P (Schwab and Cyster 2007). A dessensibilização de receptores acoplados à proteína G (GPCR) ocorre rapidamente após exposição ao agonista (Pierce et al. 2002). Timócitos são altamente sensíveis e internalizam o receptor S1P1 após incubação com 1 nM de S1P por 20 minutos, *ex vivo* (Schwab and Cyster 2007). Embora o S1P1 não seja detectado na superfície de células T circulantes na linfa e no sangue, o mesmo é detectado em células T no baço e nos linfonodos. Essas observações sugerem que a concentração de S1P nos órgãos linfoides seja menor que na circulação e a validação deste método é suportada por estudos que mostram que quando a concentração de S1P aumenta nos órgãos linfoides, não há expressão de S1P1 na superfície celular; e quando a concentração de S1P na circulação diminui, a expressão de S1P1 pode ser observada na superfície celular (Schwab et al. 2005; Pappu et al. 2007). Assim, foi demonstrado que a concentração de S1P no plasma e no soro (aproximadamente 330 ng/g ou 0,1-1 μ M) é significativamente maior que no timo, linfonodos e baço (aproximadamente 30, 40 e 150 ng/g, respectivamente), em camundongos (Schwab et al. 2005). Em humanos, a concentração no plasma e no soro está entre 200 e 900 nM, respectivamente, o que ocorre devido a liberação de S1P por plaquetas (Murata et al. 2000; Okajima 2002). A concentração de S1P nos órgãos linfoides em humanos não é conhecida.

A S1P gerada intracelularmente não é capaz de atravessar a membrana plasmática de forma passiva, uma vez que possui um grupamento polar. Alguns estudos sugerem a modulação da liberação de S1P através de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), embora essa hipótese se mantenha controversa (Bode et al. 2010). Esses transportadores também são conhecidos como transportadores dependentes de ATP porque utilizam a energia proveniente

da hidrólise do ATP para transportar diversos substratos através da membrana celular (Liu et al. 2012). Alguns membros da família de transportadores ABC foram envolvidos no transporte de S1P, como ABCC1 em mastócitos (Mitra et al. 2006), ABCA1 em astrócitos (Sato et al. 2007) e ABCG2 em células de câncer de mama (Takabe et al. 2010). Porém, nenhum desses transportadores fornecem quantidades significativas de S1P no plasma, contradizendo sua função como seus transportadores (Tukijan et al. 2018). Recentemente, um membro da superfamília de transportadores não dependentes de ATP, a proteína homóloga de spinster 2 (Spns2) foi descrito como importante transportador de S1P. Spns2 é um transportador da família Spinster com doze domínios transmembranares e que foi originalmente descrito em *Drosophila*. Seu papel fisiológico foi elucidado em modelo *zebrafish* durante estudo de reguladores do desenvolvimento cardíaco (Kawahara et al. 2009; Hisano et al. 2011). Estudos mostraram que animais knockout para Spns2 apresentam redução dos níveis plasmáticos de S1P e aumento da concentração de S1P na linfa e linfonodos, além de diminuição da saída de linfócitos dos linfonodos (Nagahashi et al. 2013; Blaho and Hla 2014). Spns2 promove a exportação de S1P das células endoteliais linfáticas e contribui com aproximadamente 25-50 % da S1P plasmática, porém não é o transportador em células hematopoiéticas, que são a principal fonte de S1P (Fukuhara et al. 2012; Mendoza et al. 2012; Nagahashi et al. 2013). Outro transportador foi recentemente identificado; o Mfsd2b, pertencente a *major facilitator superfamily* (MFS), expresso em eritrócitos e plaquetas, fornece aproximadamente 50 % da S1P plasmática, como demonstrado em animais Mfsd2b^{-/-}, que apresentam diminuição de linfócitos circulantes. Esse percentual é condizente com a determinação prévia da fonte de S1P por células hematopoiéticas (Vu et al. 2017; Kobayashi et al. 2018).

No plasma, lipoproteínas parecem funcionar como carreadoras de S1P, principalmente lipoproteínas de alta densidade (HDL) e albumina (Okajima 2002), nas quais a S1P se encontra acessível aos seus receptores e enzimas do metabolismo (Bode et al. 2010). Um estudo sugere que a liberação de S1P dos eritrócitos se inicia através de moléculas ligantes de S1P, como HDL e albumina (Bode et al. 2010), sendo sua liberação mais eficiente ao HDL do que a albumina (Christensen et al. 2017). A apolipoproteína M (ApoM), encontrada em pequenas quantidades (aproximadamente 5 %) em partículas de HDL, foi descrita como ligante específico e principal de S1P, embora sua habilidade específica em iniciar a exportação de S1P dos eritrócitos independa de sua ligação a partículas de HDL (Christensen et al. 2017). O efluxo de S1P dos eritrócitos ocorre de forma tempo e concentração dependentes e uma participação do transportador ABCC1 foi demonstrada (Sutter et al. 2014; Christensen et al. 2017). Aproximadamente 35 % do S1P plasmático está ligado à albumina e 65 % à ApoM em um complexo capaz de ativar seus receptores (Christoffersen et al. 2011; Blaho et al. 2015; Galvani

et al. 2016; Ruiz et al. 2016). Parece que a ApoM do complexo ApoM-S1P interage com S1PRs para liberar a S1P e que essa interação é bloqueada por um excesso de ApoM descarregada, o que não é provável que aconteça *in vivo*, uma vez que a maior parte da ApoM no plasma se encontra ligada à S1P (Ruiz et al. 2016). Camundongos deficientes em ApoM apresentam redução dos níveis plasmáticos de S1P, embora sua produção não seja afetada (Christoffersen et al. 2011).

A figura 1.7 mostra um esquema resumido da síntese e transporte de S1P.

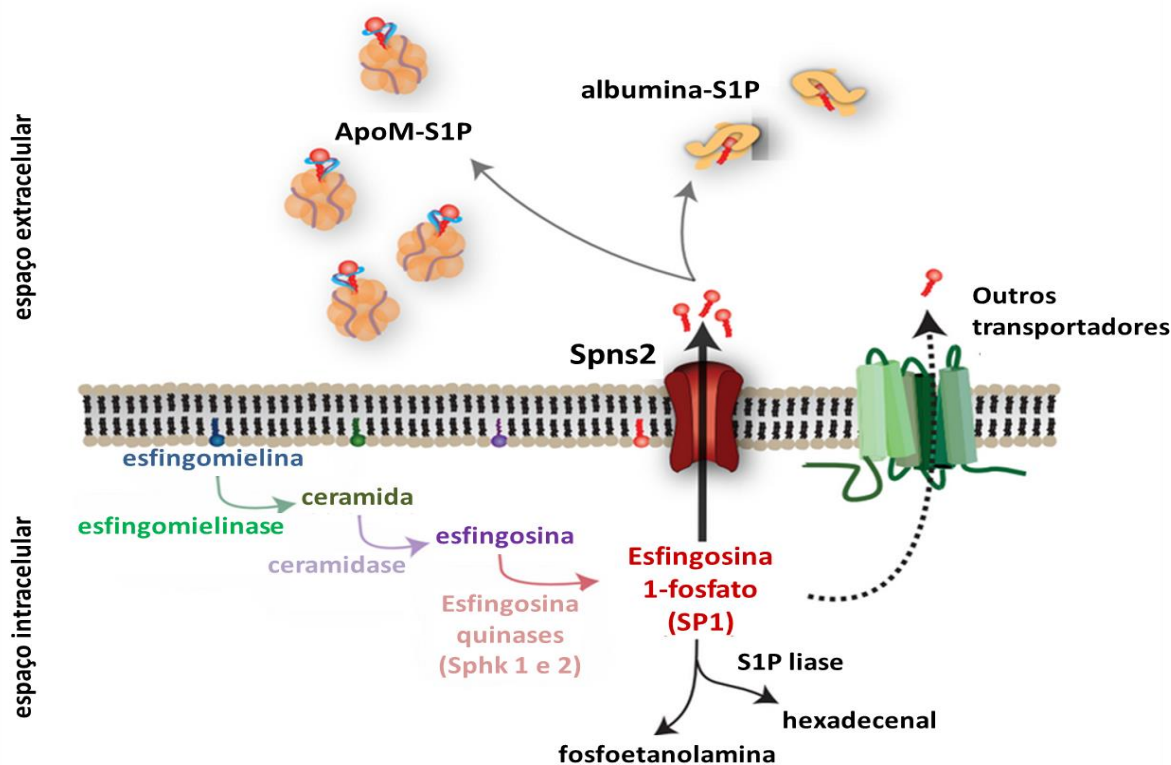


Figura 1.7 Representação esquemática da via de síntese e transporte de S1P. A produção de S1P pode ser iniciada por sinais internos ou externos, que levam à ativação da via de biossíntese que se inicia com o metabolismo da esfingomielina de membrana a ceramida por esfingomielinas. A ceramida pode ser metabolizada por ceramidases a esfingosina. A esfingosina é então fosforilada por uma das esfingosinas quinases, resultando na formação de esfingosina-1-fosfato (S1P). Uma vez sintetizada, a S1P pode ser degradada irreversivelmente a fosfoetanolamina e hexadecenal pela S1P liase ou transportada ativamente para fora da célula, se ligando a albumina ou ApoM. Spns2: spinster 2; ApoM: apolipoproteína M (adaptado de Blaho and Hla 2014).

Ao se ligar a um de seus cinco receptores, denominados S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 e S1P5, a S1P participa de diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, adesão, motilidade, angiogênese, apoptose, migração, morfogênese e mudanças no citoesqueleto (Okajima 2002; Allende et al. 2004).

Os receptores de S1P (S1PR) possuem sete domínios transmembranares, com a porção N-terminal voltada para a região extracelular e a porção C-terminal voltada para o interior da célula (Watterson et al. 2003). Os receptores são acoplados a proteínas G (GPCRs) (proteína Gi/0, Gs, Gq, G12/13), através das quais regulam diversos processos fisiológicos. O padrão de expressão dos 5 receptores de S1P varia entre os tecidos e durante o desenvolvimento. S1P1, S1P2 e S1P3 são essencialmente expressos de forma ubíqua, enquanto a expressão de S1P4 e S1P5 está restrita a alguns tipos celulares (Blaho and Hla 2014). Os S1PRs são expressos em diversos tipos celulares e tecidos como células endoteliais, células vasculares da musculatura lisa (Okajima 2002), cérebro, coração e células do sistema imune (Allende et al. 2004). A tabela 1.1 mostra o tipo de proteína G a qual está acoplado cada receptor, sua expressão nos diferentes órgãos e tecidos e algumas de suas principais funções.

Tabela 1.1 Expressão dos receptores de S1P nos diferentes órgãos e tecidos, o tipo de proteína G as quais estão acoplados e suas principais funções.

Nome do receptor	Nome do Gene		Proteína G acoplada	Expressão	Funções
	Humanos	Camundongos			
S1P1	S1PR1 (EDG1)	S1pr1 (EDG1)	G _{i/0}	Amplamente distribuídos	Angiogênese, neurogênese, tráfego de linfócitos e de outras células hematopoiéticas e manutenção da permeabilidade vascular
S1P2	S1PR2 (EDG5)	S1pr2 (EDG5)	G _{i/0} , G _s , G _q , G _{12/13}	Amplamente distribuídos	Proliferação e motilidade (geralmente atua em oposição aos efeitos de S1P1), angiogênese, audição e equilíbrio
S1P3	S1PR3 (EDG3)	S1pr3 (EDG3)	G _{i/0} , G _q , G _{12/13}	Amplamente distribuídos	Mobilização Ca ²⁺ , regulação do ritmo cardíaco, da organização de células endoteliais linfoides, da perfusão miocárdica, proteção na injúria da isquemia/reperfusão, papel no vasorelaxamento, na fibrose cardíaca e na coagulação
S1P4	S1PR4 (EDG6)	S1pr4 (EDG6)	G _s , G _q , G _{12/13}	Tecidos linfoides	Inibe proliferação e secreção de citocinas efetoras
S1P5	S1PR5 (EDG8)	S1pr5 (EDG8)	G _s , G _q , G _{12/13}	Cérebro e baço	Regula tráfego/saída de células NK de compartimentos linfoides

Edg: gene de diferenciação endotelial (adaptado de Chun et al. 2010).

Linfócitos T expressam predominantemente o S1P1 e o S1P4, mas a função do S1P4 nessas células não é bem conhecida (Graeler et al. 2002). Acredita-se que participe da polarização Th17 e do tráfego de células T CD8⁺ para os linfonodos (Blaho and Hla 2014). Além de mediar efeitos imunossupressores de S1P, inibindo a proliferação e secreção de citocinas efetoras e aumentar a liberação de IL-10 em linhagens de células T (Wang 2005). Camundongos *knockout* para o gene S1pr4 que sofreram indução de trombocitopenia apresentam células T e DCs capazes de migrar mais que as de camundongos normais. Estes animais apresentam ainda resposta Th2 exacerbada e Th1 reduzida em diferentes modelos de inflamação, possivelmente devido a uma interação defeituosa entre as células T e DCs ou à

menor capacidade das DCs de produzirem IL-17 (Schulze et al. 2011). Ensaios de imunoprecipitação usando células CHO, demonstraram que os receptores S1P1 e S1P4 podem estar associados na membrana plasmática e que juntos regulam a resposta migratória de células T frente a S1P (Matsuyuki et al. 2006). A migração induzida por S1P4 parece dependente do membro da família Rho de pequenas GTPases, Cdc42 (Kohno et al. 2003).

O S1P1 foi o primeiro dos receptores de S1P a ser descrito e se encontra acoplado unicamente à proteína G_i . O receptor murino apresenta 94 % de similaridade com o receptor humano, que contém 381 aminoácidos e 42,8 kDa (Chun et al. 2010). Está altamente expresso no sistema vascular durante o desenvolvimento embrionário, em que participa da formação de uma rede vascular estável. De fato, animais *knockout* para S1P1 ou SPHK1 e 2 não são viáveis, morrendo na fase embrionária (Allende et al. 2004; Sanna et al. 2004; Mizugishi et al. 2005), entre o dia gestacional 12.5 e o 14.5, devido a hemorragias graves causadas por defeitos na cobertura dos vasos sanguíneos em formação pelas células musculares lisas vasculares e pericitos (Liu et al. 2000). Em adultos, está amplamente expresso particularmente nas células endoteliais, no cérebro, no coração e nas células do sistema imune (Goetzl and An 1998; Zhang et al. 1999). A sinalização de S1P1 em linfócitos T regula a migração celular, promovendo quimiotaxia ou fugotaxia, dependendo da concentração de S1P, suprime a proliferação e a produção de citocinas (Graeler and Goetzl 2002; Brinkmann 2007; Messias et al. 2016). A inativação gênica do S1P1 em células T suprime a habilidade destas células apresentarem fenótipo Th17 *in vitro*, e quando a encefalomielite autoimune experimental (EAE) é induzida em camundongos que possuem S1P1 com defeito de internalização, ocorre um aumento na polarização para o fenótipo Th17 (Garris et al. 2013). Sinais induzidos por S1P1 suprimem ainda o desenvolvimento de células T reguladoras e induzem a polarização para o fenótipo Th1 (Liu et al. 2010).

O entendimento de como a circulação de linfócitos é regulada começou com a caracterização de um agente imunossupressor sintético, o FTY720 (Suzuki et al. 1996). O FTY720 é fosforilado *in vivo* por esfingosina quinases e liberado no espaço extracelular de forma muito eficiente por plaquetas, que parecem ser a principal fonte de sua forma ativa (Anada et al. 2007). A forma ativa, FTY720P, é capaz de ativar quatro dos cinco receptores de S1P, S1P1, S1P3, S1P4 e S1P5 (Mandala et al. 2002). Diferente dos agentes imunossupressores clássicos, que agem impedindo a proliferação de células T e B via interleucina-2 (IL-2), o FTY720P altera o padrão de migração celular, inibindo a emigração de órgãos linfoides e levando à depleção de células T e B da periferia ou linfopenia (Pinschewer et al. 2000). Logo, o FTY720P age como um antagonista funcional, uma vez que inibe a sinalização via S1P1 e diminui sua expressão na superfície celular (Graeler and Goetzl 2004), através da internalização

endossomal do receptor, que promove sua dessensibilização através de poliubiquitinação e degradação lisossomal, ao contrário da reciclagem endossomal para a membrana celular observada após sinalização pelo ligante endógeno, S1P (Gonzalez-cabrera et al. 2007; Lin Oo et al. 2007).

O papel essencial na saída dessas células dos órgãos linfoides foi atribuído ao S1P1 em um estudo com quimeras que mostrou que células progenitoras *knockout* para S1P1 conseguem entrar no timo e se diferenciar normalmente, porém as células T maduras ficam retidas no órgão e não são vistas no sangue ou nos órgãos linfoides periféricos (Matloubian et al. 2004). Outro trabalho mostrou que timócitos DP apresentam menor expressão de S1P1 comparados a timócitos mais maduros SP e que estes migram mais frente à S1P (Allende et al. 2004). Logo, os timócitos aumentam a expressão do receptor S1P1 durante a diferenciação. Timócitos SP CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}, ou seja, que expressam altos níveis de CD62L na membrana celular, correspondendo ao fenótipo de timócitos maduros aptos a deixar o timo em direção à periferia, expressam maiores densidades de S1P1 e deixam o órgão seguindo o gradiente de S1P, que se encontra em maior concentração no sangue do que nos órgãos linfoides (Allende et al. 2004).

A expressão do S1P1 em timócitos é controlada pelo fator de transcrição *Kruppel-like factor* (KLF) 2, KLF2, expresso em células endoteliais, pulmões e linfócitos, essencial para a formação da integridade dos vasos e desenvolvimento pulmonar, sendo sua deficiência letal na fase embrionária (Kuo et al. 1997; Wani et al. 1998, 1999). Tem papel crítico na quiescência e sobrevivência de células T. Timócitos *knockout* para KLF2 apresentam diminuição da expressão de diversos receptores necessários para a migração celular, como S1P1, CD62L e integrina $\beta 7$ (Carlson et al. 2006; Bai et al. 2007). O KLF2 se liga e ativa o promotor de S1P1, sendo crucial para sua expressão, possibilitando que células T maduras saiam do timo e recirculem pelos órgãos linfoides periféricos (Carlson et al. 2006). Durante a diferenciação de células T, a expressão de KLF2 é observada após o processo de seleção positiva. Apesar de a deficiência de KLF2 em células T não interferir na diferenciação dessas células, um número reduzido de células SP CD4⁺ e CD8⁺ foi encontrado na periferia, enquanto um número elevado destas células foi observado no timo. O KLF2 está amplamente expresso em timócitos maduros, células T *naïve* e de memória e sua expressão diminui em células T ativadas, de forma similar ao S1P1 (Carlson et al. 2006).

Outra molécula capaz de inibir a expressão de S1P1 e, conseqüentemente, a saída de células T do timo e linfonodos, é o CD69. Quando esse é altamente expresso nas células, leva à diminuição na expressão de S1P1 e células que não expressam S1P1, através de deleção gênica, apresentam altos níveis de expressão de CD69. Esses dados levaram à observação de

que S1P1 e CD69 interagem em uma variedade de células e que a expressão de um suprime a expressão do outro (Bankovich et al. 2010; Grigorova et al. 2010). Timócitos maduros SP CD62L^{hi} apresentam altos níveis de expressão de S1P1 e baixos níveis de expressão de CD69; ao deixar o timo, na periferia, essa relação se inverte (Shiow et al. 2006; Bankovich et al. 2010).

A depleção de S1P no sangue inibe a saída de timócitos e a depleção de S1P na linfa bloqueia a saída de linfócitos dos linfonodos (Pappu et al. 2007). As concentrações de S1P nos órgãos linfoides devem se manter baixas, possibilitando a manutenção de altos níveis de S1P1 na superfície celular dos linfócitos que saem desses órgãos. Logo, o S1P1 funciona como o receptor principal, guiando a saída dos linfócitos dos órgãos linfoides sob estímulo, seguido de sua internalização, que previne uma sinalização constitutiva em um ambiente com altos níveis de S1P. Portanto, altas concentrações de S1P no sangue e na linfa juntamente com baixas concentrações nos órgãos linfoides mantêm um constante fluxo de linfócitos entre os órgãos linfoides (Lo et al. 2005; Bode and Gräler 2012). Para que isso ocorra, não só a formação de S1P pelas enzimas SPHK1 e 2 é importante, mas também sua degradação pela SGPL. A SGPL mantém as concentrações de S1P nos tecidos constantes, devido a sua degradação (Saba and Hla 2004). Camundongos que não possuem SGPL morrem aproximadamente 1 mês após o nascimento com uma variedade de defeitos no desenvolvimento que incluem desregulação severa na homeostasia dos lipídios no fígado e inflamação sistêmica (Don et al. 2014).

No timo, a enzima SGPL é expressa ao redor dos espaços perivasculares (PVS) por células estromais não linfoides, como TECs, fibroblastos reticulares, DCs, pericitos e células endoteliais, além de linfócitos T maduros e B (Zamora-Pineda et al. 2016a). Essa expressão mantém a concentração de S1P baixa ao redor dos vasos, permitindo o aumento da expressão de S1P1 e saída dos timócitos do timo. A inibição da SGPL, por sua vez, leva ao aumento da concentração de S1P e inibição da expressão de S1P1, e conseqüentemente, ao acúmulo dos timócitos maduros na medula e aumento dos PVSs (Maeda et al. 2013a). Embora as DCs presentes na medula e região cortico-medular pareçam ser as principais responsáveis por manter os baixos níveis de S1P no timo, a diminuição da expressão de SGPL em timócitos também foi relacionada ao aumento da concentração de S1P no plasma e no timo, à diminuição da expressão de S1P1 em células maduras SP e à retenção de timócitos maduros no timo (Zamora-Pineda et al. 2016a).

Em resumo, pericitos e células endoteliais produzem S1P próximo aos vasos sanguíneos, na região medular do timo, sendo o transporte da S1P produzida pelas células endoteliais para o meio extracelular mediado por Spns2 (Hisano et al. 2012a). A S1P atua nos receptores S1P1 e S1P2 presentes nas células endoteliais e o balanço na resposta entre estes receptores regula a permeabilidade vascular, que é inibida por S1P1 (Garcia et al. 2001; Sanna

et al. 2006) e aumentada por S1P2 (Sammani et al. 2010). Por fim, a S1P age diretamente no S1P1 presente nos timócitos maduros, induzindo a migração destas células através dos vasos sanguíneos para o sangue, onde este lipídio é encontrado em elevadas concentrações (Hisano et al. 2012b). A figura 1.8 resume os processos que podem facilitar e os que podem impedir a saída de timócitos do timo.

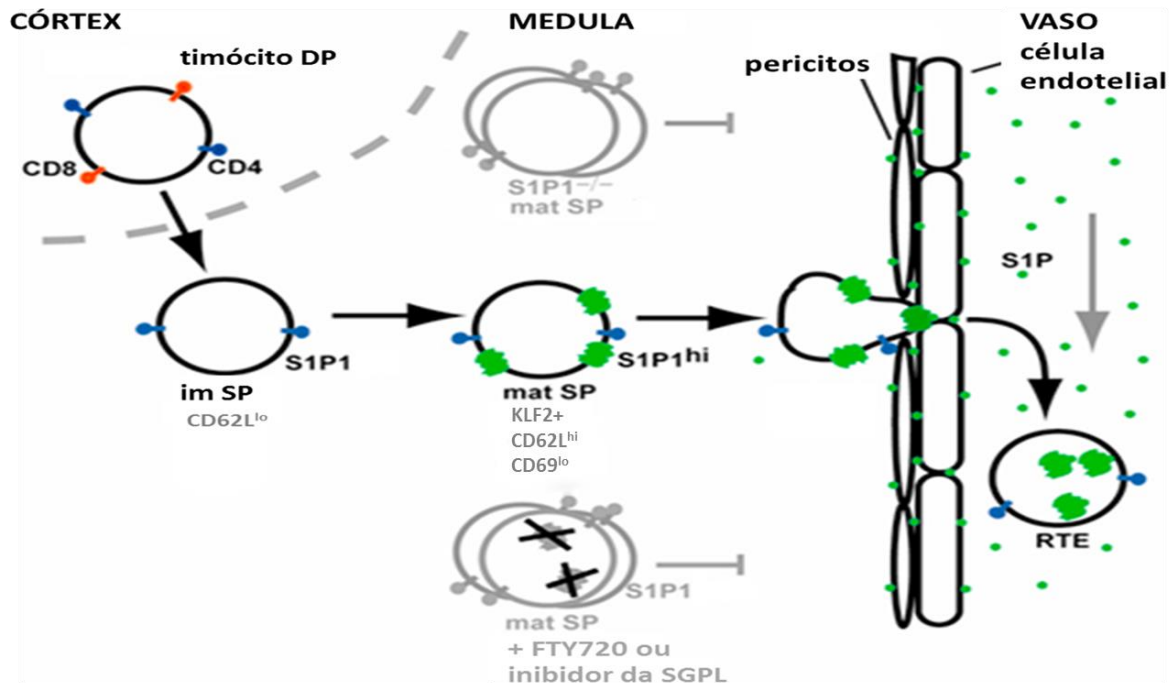


Figura 1.8 Esquema representativo da expressão de S1P1 e saída de células T do timo. Timócitos aumentam a expressão de S1P1 durante o processo de diferenciação. Timócitos maduros SP CD62L^{hi} apresentam maior densidade de expressão de S1P1 em relação aos timócitos mais imaturos DP ou CD62L^{lo} e dessa forma, saem do timo através do endotélio seguindo o gradiente de S1P, que se encontra em maior concentração no sangue. A ausência ou diminuição da expressão do receptor, tanto por antagonismo como por inibição da SGPL, levam a diminuição da migração e retenção dos timócitos no timo. DP = duplo-positivo; SP = simples-positivo; lo = em baixas densidades; hi = em altas densidades; SGPL = esfingosina liase; KLF2 = *Kruppel-like factor 2*; RTE= *recent thymic emigrant* (adaptado de Zachariah and Cyster 2009).

A sinalização via S1P1 afeta também outras populações de células T, como as células T reguladoras (Treg), que têm papel importante no controle de respostas imunes e geração de células T de memória. S1P1 suprime o desenvolvimento intratímico, a manutenção periférica e a atividade supressora de Tregs via AKT/ mTOR, afetando a tolerância imune mediada por Treg (Liu et al. 2009). Também regula a localização nuclear do fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box protein 3*), que é necessário para o desenvolvimento e função de células Treg (Ishimaru et al. 2012). Camundongos que superexpressam S1P1 desenvolvem lesões autoimunes devido a diminuição do número de células Treg no timo. Por outro lado, células

Treg com defeito na expressão de S1P1 têm defeito na saída do timo para a periferia (Liu et al. 2009). Ainda, a deleção específica permanente de S1P1 em células Treg levou ao aumento da autoimunidade e inflamação sistêmica e a sua deleção aguda tornou camundongos mais suscetíveis a encefalomielite autoimune. Nesses animais, tanto as células CD4⁺ quanto CD8⁺ no sangue, nos órgãos linfoides e não-linfoides apresentaram um fenótipo ativado e as células CD4⁺ ativadas produziram grandes quantidades de IL-4 e IFN- γ em diversos órgãos, inclusive nos linfonodos. Na lâmina própria do intestino, as células T CD4⁺ produziram mais IL-17A, comparadas as células dos animais WT. O S1P1 foi capaz de regular a saída das células Treg de órgãos linfoides e sua distribuição em órgãos não-linfoides. Sua deleção foi capaz de provocar aumento da frequência das células Treg no timo, assim como nos linfonodos e sua diminuição no sangue, cólon e pulmão (Eken et al. 2017).

As principais vias de sinalização *downstream* a S1P1 incluem a ativação da cascata de quinases envolvendo Ras-Erk e fosfatidilinositol 3-quinase (PI(3)K)-Akt, mobilização de cálcio e rearranjo do citoesqueleto de actina. A ativação de S1P1 leva à diminuição da concentração intracelular de AMP cíclico (AMPc), ao estímulo de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), ao aumento da concentração intracelular de cálcio e à ativação da via de fosfatidilinositol 3 (PI3K)/ Akt (proteína quinase 3), levando à ativação de eNOS (*endothelial nitric-oxide synthase*) ou à ativação de Rac, uma pequena GTPase da família Rho, através de um mecanismo exclusivamente acoplado à proteína Gi (Cuvillier 2012). Dessa forma, está classicamente associado a proliferação, sobrevivência e migração celulares. A estrutura dos receptores de S1P e as principais vias de sinalização ativadas por eles estão demonstradas na Figura 1.9.

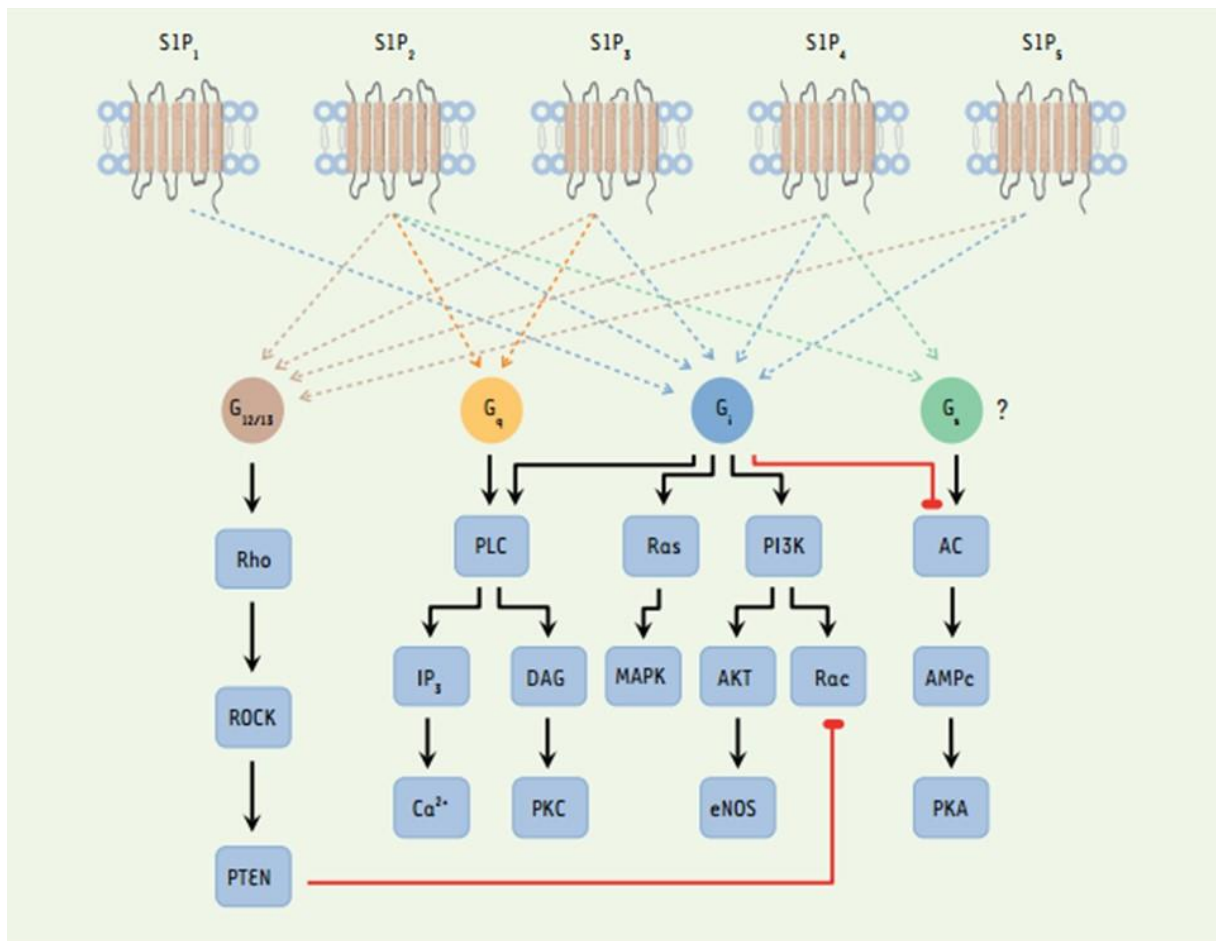


Figura 1.9 Principais vias de sinalização ativadas pelos receptores de S1P. O S1P1 se liga exclusivamente à proteína Gi, levando a ativação da via das MAPK, ativação de eNOS ou de Rac (Cuvillier 2012).

Alguns estudos demonstraram que a sinalização mediada por S1P1 é capaz de interferir na ativação e localização de integrinas e, conseqüentemente, na adesão e migração celulares mediadas por seus ligantes. O pré-tratamento de células endoteliais com S1P impediu a adesão de monócitos a estas células independentemente da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. Monócitos aderem ao endotélio através das integrinas $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) e $\alpha v\beta 3$ expressas na superfície apical das células endoteliais. O tratamento com S1P mudou a localização dessas integrinas da superfície basal para a superfície apical das células endoteliais, através de sinalização via S1P1 e ativação de proteínas da família Src, PI3K e Rac, inibindo a adesão dos monócitos às mesmas (Aoki et al. 2007). Outro estudo demonstrou que S1P é capaz de ativar a integrina $\alpha v\beta 3$ na região do lamelipódio de células endoteliais, aumentando a migração dessas células em substratos de vitronectina. A S1P foi capaz de induzir a associação de proteínas do citoesqueleto a $\alpha v\beta 3$, bem como a associação das subunidades αv e $\beta 3$, através de sinalização via S1P1/Gi/ Rho GTPases (Wang et al. 2008a). García Bernal e colaboradores (2013) observaram que S1P aumenta a adesão de células de mieloma a $\alpha 4\beta 1$ e a migração transendotelial mediada por CXCL12. A adesão celular dependente da integrina $\alpha 4\beta 1$

é crucial para a progressão do mieloma múltiplo e essa adesão é otimizada pela quimiocina CXCL12. S1P promoveu a expressão e ligação de alta afinidade de $\alpha 4\beta 1$ a VCAM-1, através da ativação de Rac1 (García-Bernal et al. 2013). Logo, a regulação da expressão e/ou ativação de S1P1 em células de mieloma múltiplo pode se mostrar positiva e ter consequências importantes na progressão da doença.

De fato, o uso de agonistas e antagonistas de S1P1 vem sendo avaliado no contexto de diferentes doenças. O imunomodulador já mencionado, FTY720, já é utilizado no tratamento de esclerose múltipla, uma doença autoimune em que há comprometimento do sistema nervoso central, através da destruição da bainha de mielina dos axônios mediada por uma resposta imune celular. O uso oral do FTY720 leva à diminuição da circulação de linfócitos autorreativos, tendo como consequências a diminuição de recaídas, bloqueio da progressão da doença, das lesões e da perda de volume cerebrais, em pacientes com esclerose múltipla (Sanford 2014). O uso do FTY720 também aumentou a sobrevivência de transplante de córnea, através da ativação de S1P1, levando a diminuição de células T CD4⁺ e aumento de células Treg e de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β 1 no transplante (Gao et al. 2014). O S1P1 também é expresso em células T CD4⁺ isoladas de paciente com artrite reumatoide (Takeshita et al. 2012). Em um modelo de artrite reumatoide induzida, o tratamento com antagonista específico para S1P1 preveniu e amenizou a doença através do aumento da expressão de CD69 que leva à diminuição da expressão de S1P1 e saída das células do timo (Shiow et al. 2006). Diversos trabalhos também correlacionam o S1P1 ao contexto das neoplasias. Uma vez que a S1P é um fator angiogênico essencial, a angiogênese em tumores de camundongos pode ser bloqueada com o uso de anticorpos contra S1P ou através da diminuição da expressão de S1P1. Dessa forma, alguns estudos têm avaliado o efeito de inibidores das enzimas SPHK1 e 2 na tumorigênese (Chae et al. 2004; Visentin et al. 2006; Anelli et al. 2010). Uma elevação significativa na concentração plasmática de S1P foi observada em pacientes com câncer de mama, ovário e pâncreas (Don et al. 2014). Ainda não está claro se a concentração de S1P aumenta em tumores sólidos. Essas observações são de grande relevância no contexto da migração e saída das células neoplásicas do tumor e formação de metástases. Nosso grupo observou que células provenientes de pacientes com leucemia/ linfoma linfoblástico agudo de células T expressam S1P1 e migram frente à S1P, sugerindo que ambos podem ter influência no padrão migratório também nessas doenças (Mendes-da-Cruz et al. 2014). Ainda, linhagens celulares de leucemia e linfoma, apresentam diferentes padrões de expressão de S1P1 e diferentes respostas migratórias frente a S1P, que dependem tanto da expressão do receptor, quanto da concentração do ligante (Messias et al. 2016).

O papel do S1P1 também tem ganhado importância no contexto do diabetes tipo 1 (DT1), uma doença autoimune mediada por uma resposta imune celular, que leva à destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina. A S1P e seus análogos apresentaram efeitos protetores contra a morte celular induzida por citocinas nas células beta. Tratamentos de camundongos NOD (do inglês *non-obese diabetic*, ou diabéticos não obesos), um modelo murino da doença, com FTY720 demonstraram que este pode prevenir o início da doença e reverter o quadro de diabetes. Essas observações dependem da fase em que o tratamento tem início e da continuação do mesmo, uma vez que em geral a doença se desenvolve abruptamente após a interrupção do tratamento (Maki et al. 2005; Morris et al. 2011). Não se sabe ao certo quais subtipos de células T são afetados pelo tratamento com FTY720; em camundongos normais tanto células T CD4⁺ quanto CD8⁺ têm seu número reduzido na periferia, porém células recentemente ativadas e de memória constituem uma porcentagem significativa das células T que permanecem no sangue. FTY720 também diminuiu o número de linfócitos no sangue periférico de camundongos NOD, porém em menor escala, o que pode ser consistente com as diferentes taxas de células *naïve*, ativadas e de memória, bem como com a menor expressão de S1P1 e maior concentração de S1P encontradas nos animais utilizados (Morris et al. 2011). Além disso, células T CD4⁺ de camundongos NOD diabéticos são superativadas e secretam duas vezes mais interferon- γ (IFN- γ) e IL-17 em comparação a camundongos NOD não diabéticos. A S1P ou outros agonistas de S1P1 reduzem a ativação das células T CD4⁺ nos animais diabéticos, através da regulação da isoforma α do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α), um regulador negativo da ativação de linfócitos, resultando em diminuição da produção de citocinas (Srinivasan et al. 2008). Em pacientes com DT1, foi demonstrado que o complexo ApoM-S1P tem menor capacidade anti-inflamatória, com menor capacidade de inibir a expressão de VCAM-1 induzida por TNF- α em células endoteliais da aorta, o que pode contribuir ao aumento do risco de doenças cardiovasculares secundárias ao DT1 (Frej et al. 2017).

Sabe-se ainda que em camundongos NOD diabéticos o tratamento com S1P reduz a adesão de monócitos ao endotélio, prevenindo o surgimento da aterosclerose; isso se dá através da inibição da expressão de VCAM-1 no endotélio pela ativação de Akt/ eNOS e inibição de NF κ B (Whetzel et al. 2006a). Porém, pouco se sabe sobre o papel de S1P1 e S1P no timo desses animais, principalmente nos eventos que antecedem o quadro de DT1.

1.3O diabetes tipo 1

O diabetes mellitus corresponde a um grupo de doenças metabólicas resultante da quebra da homeostasia do metabolismo da glicose, mantida pelo hormônio insulina, produzida por células especializadas no pâncreas. Seu desequilíbrio leva à hiperglicemia e ao quadro de diabetes. O aumento da glicose no sangue pode levar a doenças graves afetando o coração e os vasos sanguíneos, os rins, os olhos e nervos. Dentre as complicações decorrentes do diabetes, podem-se destacar doenças cardiovasculares, cegueira, falência renal e amputação dos membros inferiores, além do maior risco do desenvolvimento de infecções (World Health Organization 2016; IDF Diabetes Atlas, 8ª edition 2017).

Estima-se que a doença atinja cerca de 425 milhões de pessoas no mundo, sobretudo em países de média e baixa renda (4 entre 5 pessoas), sendo responsável por 4 milhões de mortes entre adultos de 20 a 79 anos, em 2017. Estima-se que metade das pessoas com diabetes não saibam que estão doentes, sendo aproximadamente 210 milhões de casos não diagnosticados. No Brasil, são aproximadamente 13 milhões de casos de diabetes, sendo o quarto país no ranking mundial de incidência da doença (IDF Diabetes Atlas, 8ª edition 2017).

Existem três tipos principais de diabetes: diabetes tipo 1 (DT1), diabetes tipo 2 (DT2) e diabetes gestacional. O tipo mais comum é o DT2 (cerca de 87 a 91 % dos casos), no qual se desenvolve uma resistência à insulina, tendo como principais causas maus hábitos alimentares, tabagismo, sedentarismo e obesidade, além da idade, etnia e histórico familiar. Geralmente ocorre em adultos mais velhos, porém o número de casos vem aumentando em crianças, adolescentes e jovens adultos, devido à obesidade, pouca atividade física e dieta. Estima-se que 352 milhões de pessoas no mundo estejam sob risco de desenvolver DT2. A doença pode se manter sem diagnóstico por muito tempo, já que os sintomas podem levar anos para aparecerem ou serem reconhecidos, o que ocorre quando as complicações decorrentes do diabetes já se desenvolveram (IDF Diabetes Atlas, 8ª edição, 2017). Os sintomas incluem aumento da sede e boca seca, micção frequente, cansaço, dificuldade em curar feridas, infecções recorrentes e formigamento ou dormência nas mãos, dentre outros.

O diabetes gestacional é o quadro de hiperglicemia com início ou reconhecimento durante a gravidez, em decorrência do desenvolvimento de resistência à insulina, devido aos hormônios produzidos pela placenta. Pode ocorrer em qualquer mulher, geralmente entre os segundo e terceiro trimestres, embora alguns casos possam apresentar maior risco, como idade materna mais avançada, sobrepeso ou obesidade, síndrome dos ovários policísticos, histórico familiar de diabetes em parentes de 1º grau, hipertensão arterial sistêmica na gestação, gestação múltipla, entre outros (Sociedade Brasileira de Diabetes 2015). Geralmente existe como um

distúrbio transiente, se resolvendo ao final da gravidez. Porém, há aumento do risco de desenvolver diabetes gestacional em gestações subsequentes, assim como de desenvolver DT2 posteriormente em aproximadamente metade das mulheres. Mulheres com discreto aumento da glicemia são classificadas como tendo diabetes gestacional e mulheres com aumento substancial são classificadas como mulheres com hiperglicemia na gravidez. Estima-se que 75-90 % dos casos de glicose alta no sangue durante a gravidez seja diabetes gestacional. Para os bebês, há aumento do risco de obesidade e desenvolvimento do DT2. Atualmente são aproximadamente 21 milhões de nascidos vivos afetados (IDF Diabetes Atlas, 8º edição, 2017).

O DT1 compreende cerca de 7 a 12 % dos casos de diabetes, sobretudo em crianças e adultos jovens. É uma das enfermidades crônicas mais frequentes em crianças, representando um importante fator de risco de mortalidade precoce por acidente cardiovascular. Estima-se que mais de 90 mil crianças, com menos de 15 anos, desenvolvem DT1 por ano e que um total de mais de 500 mil vivem com DT1 no mundo, principalmente na Europa. O Brasil é o terceiro país no *ranking* mundial, com quase 90 mil casos entre crianças e adolescentes com menos de 20 anos, em 2017 (IDF Diabetes Atlas, 8ª edition 2017). A DT1 é uma doença autoimune, resultante da destruição de células beta produtoras de insulina no pâncreas, sendo esta destruição mediada principalmente por células T autorreativas (Bach 1994). Suas causas incluem fatores genéticos e ambientais, como infecções virais, toxinas e hábitos alimentares. O número de casos de DT1 vem aumentando provavelmente devido a mudanças nos fatores de risco externos, como dieta, composição da microbiota intestinal e infecções virais. Seu diagnóstico é feito pela glicose elevada no sangue, em combinação com outros sintomas, como sede anormal e boca seca, micção frequente, fadiga, fome constante, perda de peso abrupta, sudorese noturna e visão borrada. Porém, exames adicionais podem ser necessários para diferenciar entre o diabetes tipo 1 ou 2. Pessoas com DT1 devem monitorar os níveis de glicose no sangue e manter doses diárias de insulina exógena, além de manter uma dieta saudável e praticar exercícios físicos (IDF Diabetes Atlas, 8º edição, 2017).

O pâncreas é um órgão glandular, situado na parte superior da cavidade abdominal. É uma glândula mista exócrina e endócrina, pois produz enzimas digestivas que são levadas para o intestino delgado, além de hormônios, como o glucagon e a insulina. A porção exócrina é uma glândula acinosa composta, em que são armazenadas e secretadas as enzimas. O ácino pancreático exócrino é constituído por várias células serosas polarizadas, com núcleo esférico, secretoras de proteínas, que circundam um lúmen. A maioria das enzimas é armazenada na forma inativa (zimogênios) nos grânulos de secreção das células acinosas, sendo ativadas no lúmen do intestino delgado após a secreção, de forma que o lúmen do pâncreas fica protegido contra a atividade dessas enzimas (Junqueira and Carneiro 2013). O pâncreas endócrino é

composto pelas ilhotas de Langerhans. As células beta representam aproximadamente 70 % da população de células das ilhotas e ocupam a sua porção central. Essas células produzem e secretam insulina, hormônio necessário para o metabolismo da glicose. Células alfa, produtoras de glucagon, representam aproximadamente 15-20 % das células da ilhota e as células delta produtoras de somatostatina, aproximadamente 10 %. Ambas se encontram na região periférica das ilhotas de Langerhans (figura 1.10). Essas células liberam suas secreções em pequenos capilares sanguíneos adjacentes. Um pequeno gânglio nervoso é encontrado constantemente associado à ilhota, contendo diversas células nervosas e algumas fibras (Fujita et al. 1982).

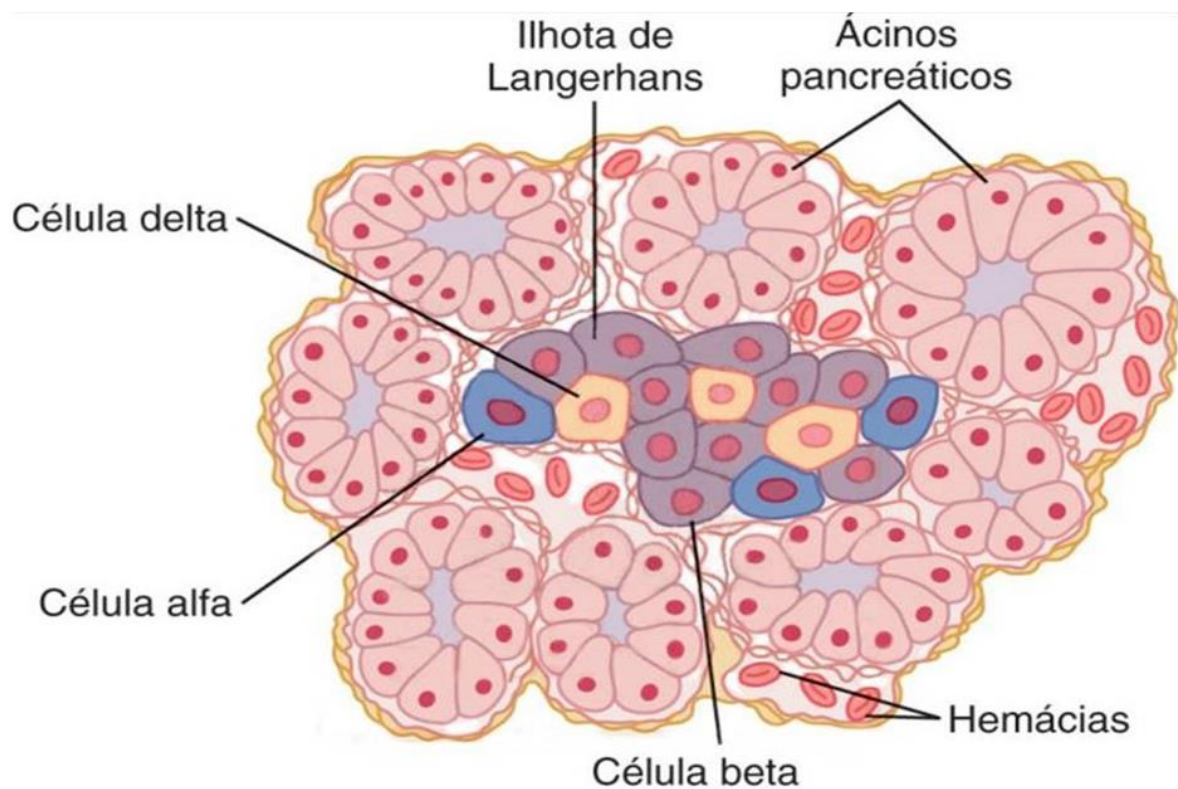


Figura 1.10 Esquema ilustrativo do pâncreas mostrando as porções exócrina e endócrina. O ácino pancreático exócrino é constituído por várias células serosas polarizadas, com núcleo esférico, que circundam um lúmen. O pâncreas endócrino é composto pelas ilhotas de Langerhans. As células beta representam maioria da população de células da ilhota e ocupam a sua porção central. As células alfa e as células delta encontram-se na região periférica das ilhotas de Langerhans (Guyton and Hall 2011).

A destruição das células beta leva à manifestação do DT1 em poucos meses em crianças e jovens, enquanto que outros indivíduos podem ser assintomáticos por anos (Knip and Siljander 2008).

Ainda na fase assintomática do DT1, pode-se observar um infiltrado de células mononucleares nas ilhotas de Langerhans. Em humanos, este infiltrado é composto principalmente por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, além de macrófagos, linfócitos B, células *natural*

killer (NK) e DCs (Thayer et al. 2010). Os sintomas clínicos da doença aparecem quando cerca de 70 % das ilhotas de Langerhans estão destruídas.

Como dito anteriormente, a incidência do DT1 pode ser influenciada por fatores ambientais como infecções virais. Foi demonstrado, que o risco de autoimunidade em crianças com predisposição genética é significativamente maior quando elas sofreram de infecção viral severa do trato respiratório baixo e infecções virais frequentes do trato respiratório no primeiro semestre de vida foi associado ao desenvolvimento de DT1 até os 8 anos de idade (Principi et al. 2017). Ainda, estudos epidemiológicos indicam que enterovírus, principalmente membros da família Coxsackievirus B, são capazes de causar DT1 pela destruição direta das células beta ou indução de respostas inflamatórias (Hyöty 2004). As células beta possuem receptores específicos que facilitam a ligação e internalização dos vírus, além de fatores do hospedeiro utilizados pelos vírus de forma a facilitar o sucesso da infecção, sua replicação e persistência (Richardson and Morgan 2018). Além disso, foi reportada homologia molecular entre antígenos virais e autoantígenos presentes nas células beta, o que poderia levar ao aparecimento de respostas de reação cruzada de células T através da apresentação de antígenos beta no contexto da inflamação (Bettini and Vignali 2011). Além desses, vírus Epstein-Barr e citomegalovírus também já foram associados a casos de DT1. O vírus Epstein-Barr pode permanecer em indivíduos infectados por anos e sua reativação ou infecção primária em pacientes imunodeficientes já foram associadas a casos raros de DT1 (Principi et al. 2017). Por outro lado, alguns patógenos são capazes de inibir o início da DT1 através de efeitos em numerosos tipos celulares e indução de mediadores que suprimem a patologia no hospedeiro, como expansão de células supressoras, mudança para uma resposta Th2 ou alteração dos autoantígenos apresentados pelas DCs (Lehuen et al. 2010).

O uso de modelos animais é fundamental no avanço do conhecimento acerca dos mecanismos biológicos por trás de doenças e no desenvolvimento de terapias. No caso do DT1, os camundongos NOD têm se mostrado um modelo útil e promissor da doença humana. Desde a sua criação há mais de trinta anos, têm proporcionado uma riqueza de conhecimentos dos complexos processos envolvidos na etiologia de doenças autoimunes (Anderson and Bluestone 2005).

1.3.1 O camundongo NOD

Camundongos NOD correspondem a uma linhagem *inbred* criada por Sumusu Makino e colaboradores em 1980 a partir de uma sublinhagem de camundongos suíços (Swiss) *outbred* durante a seleção de uma linhagem que desenvolvesse catarata; após repetitivos cruzamentos

entre irmãos, os camundongos apresentaram índice glicêmico alterado e a linhagem NOD foi estabelecida (Makino et al. 1980; Anderson and Bluestone 2005).

Os camundongos NOD são o modelo animal mais utilizado no estudo do DT1, pois desenvolvem a doença espontaneamente, apresentando diversas características semelhantes à doença humana, além do envolvimento genético. A doença acomete cerca de 60-80 % das fêmeas com 30 semanas de idade, podendo chegar a 90 % em algumas colônias, enquanto nos machos esse índice é significativamente inferior, de 20 a 30 % ou até mesmo menos de 20 % (Fujita et al. 1982; Anderson and Bluestone 2005).

O entusiasmo em utilizar camundongos NOD para entender a patogênese do DT1 aumentou com a observação de que como em humanos, genes específicos ligados ao MHC de NOD (designado H2g7) estão envolvidos na suscetibilidade à doença e que a cadeia I-A β do MHC de classe II apresenta a mesma substituição diabetogênica de aminoácidos encontrada no alelo DQ*0302 de humanos (substituição de um ácido não aspártico no resíduo 57 da cadeia β) (Atkinson & Leiter, 1999). Em adição ao *locus* do MHC, outros *loci* contribuem para o desenvolvimento da doença. Mais de 20 *loci* diabetogênicos (genes *Idd*) foram identificados em NOD, incluindo polimorfismos nos genes do CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), IL-2 e Ptpn22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (Lehuen et al. 2010).

Como em humanos, os camundongos NOD desenvolvem o DT1 em decorrência da destruição das células beta produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas. Nestas, pode-se observar, a partir de 4 a 5 semanas de idade, um infiltrado inflamatório linfocitário que destrói as células beta de forma seletiva e progressiva (Fujita et al. 1982). Inicialmente, o infiltrado, proveniente de vasos e vênulas pós-capilares, envolve as ilhotas de Langerhans, constituindo o estágio de peri-insulite, que dura até aproximadamente 8 a 12 semanas. Nesse momento, a morfologia das células beta ainda não foi modificada. De forma similar, há um intervalo sem doença aparente por anos em pacientes humanos após a detecção de autoanticorpos (Bettini and Vignali 2011). Em um segundo estágio, há invasão das ilhotas pelo infiltrado inflamatório e somente as células beta são destruídas. Nessa fase, a ilhota diminui de tamanho, há perda da polaridade das células e a insulina fica dispersa no citoplasma. Observam-se células beta que não foram destruídas entrando em mitose, enquanto células alfa e delta não são afetadas (Fujita et al. 1982). Em um mesmo pâncreas, podem ser encontradas ilhotas com diferentes graus de insulite ou até mesmo ilhotas intactas (Fujita et al. 1982). A doença se instala quando há destruição de aproximadamente 70 a 80 % das ilhotas, geralmente por volta de 12 a 14 semanas de idade, podendo variar dependendo das condições da colônia e do biotério (Pozzilli et al. 1993; Cnop et al. 2005). Nessa fase, há grande redução do número de células beta e perda de membrana celular, que resulta em uma massa de células. Há poucas células reativas para

insulina, de tamanho reduzido, substituídas por um massivo agregado linfocitário, caracterizando um quadro de insulite. Aproximadamente 2 semanas após o aparecimento da doença, pode-se observar pequenas ilhotas pancreáticas com ausência de células beta e basicamente sem linfócitos, sugerindo que estes desaparecem após a destruição das células beta (Fujita et al. 1982).

O infiltrado inflamatório é constituído principalmente por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, além de linfócitos B, macrófagos e DCs (Thayer et al. 2010). Macrófagos e DCs são importante iniciadores da resposta autoimune e são as primeiras a se acumular ao redor das ilhotas de Langerhans. Após o processamento do antígeno, essas células migram para os linfonodos pancreáticos e ativam os linfócitos T; os linfócitos T autorreativos migram para o pâncreas, iniciando o processo de insulite (figura 1.11) (Bach et al. 1997; Geutskens et al. 2004).

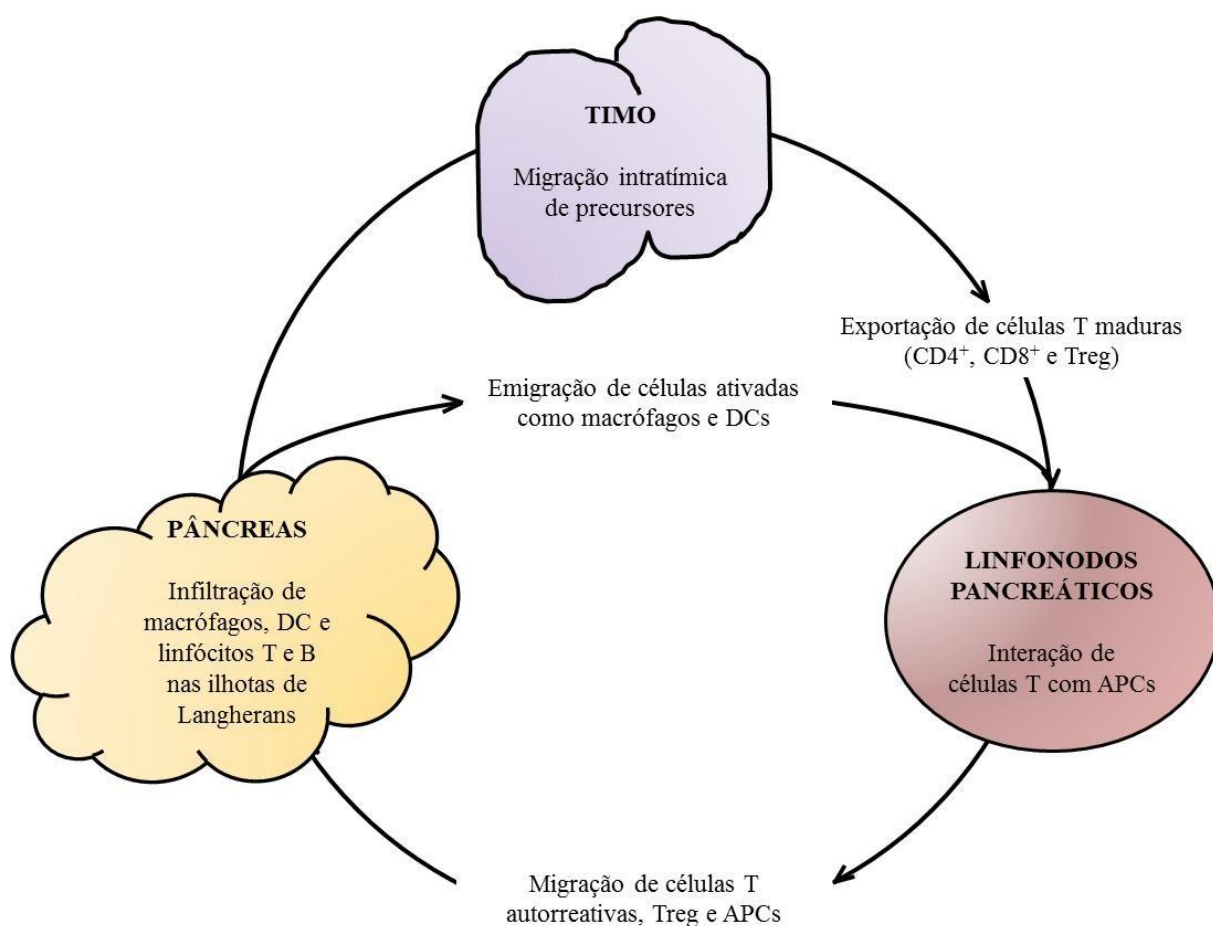


Figura 1.11 Esquema da cinética de ativação e migração de células T e sua chegada ao pâncreas. Macrófagos e células dendríticas (DCs) ativados no pâncreas migram para os linfonodos pancreáticos e apresentam o antígeno a linfócitos T autorreativos provenientes do timo. As células ativadas migram para o pâncreas, constituindo o infiltrado inflamatório (adaptado de Geutskens et al. 2004).

Tanto as células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicas, quanto as células B são necessárias para o desenvolvimento do DT1. No entanto, embora altos títulos de anticorpos anti-insulina e anti-GAD65 (*glutamic acid decarboxylase* de 65KDa), antígeno presente nas células beta, sejam encontrados em camundongos NOD pré-diabéticos e pacientes diabéticos, o soro de animais diabéticos não é suficiente para a transferência da doença, sugerindo que não haja uma participação crucial de anticorpos na patogênese do DT1 e que as células B devem contribuir mais como apresentadoras de antígenos (Bettini and Vignali 2011), uma vez que a depleção de células B em camundongos NOD foi capaz de atrapalhar o desenvolvimento da doença. A doença pode ser transferida para animais singênicos através de uma combinação de células T CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas, mas não dessas células sozinhas (Phillips et al. 2009). Células T CD8⁺ podem destruir as células beta através de citotoxicidade mediada pelo reconhecimento do complexo peptídeo-MHC de classe I e, juntamente com as células T CD4⁺, produzir citocinas como IFN- γ , que induz a expressão de receptores de morte como Fas (ou CD95) e a produção de citocinas pelas células beta. Essas quimiocinas atraem células mononucleares, que aumentam a inflamação. Além disso, o IFN- γ pode ativar outros macrófagos e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF (*tumor necrosis factor*). Células beta expressam altos níveis de receptor de IL-1 e parecem ser mais sensíveis a apoptose induzida por IL-1 β que as outras células presentes na ilhota. IFN- γ , IL-1 β e TNF também induzem a expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS), como óxido nítrico (NO), que têm grande potencial para induzir apoptose (Lehuen et al. 2010).

Ainda, pacientes com síndrome IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) que apresentam mutações no fator de transcrição Foxp3 podem desenvolver DT1, o que atenta para a importância das células Treg no controle do desenvolvimento da doença (Wildin and Freitas 2005; Van Der Vliet and Nieuwenhuis 2007). Camundongos NOD deficientes em CD28, que não possuem células Treg, têm o desenvolvimento da doença acelerado (Salomon et al. 2000).

Visto que o timo é um órgão essencial para o desenvolvimento e formação do repertório de células T, bem como para o estabelecimento da tolerância central, tornam-se relevantes estudos sobre este órgão em camundongos NOD.

1.2.2 O timo dos camundongos NOD

O timo de camundongos NOD sofre diversas alterações no curso do DT1. Foi demonstrado que a timectomia neonatal em camundongos NOD previne o aparecimento do DT1, bem como o tratamento *in vivo* com anticorpo anti-CD4. Se a timectomia é realizada após

o desmame, por volta de três semanas de idade, o aparecimento e incidência da doença são agravados, sugerindo que nesse intervalo haja a saída de células supressoras importantes para o controle da autoimunidade (Dardenne et al. 1989; Savino et al. 1991). Além disso, o início da doença pode ser atrasado com a injeção intratímica de antígenos da ilhota de Langerhans, sugerindo um papel regulador do timo na patogênese do DT1 (Charlton et al. 1994).

Devido ao envolvimento das células T no processo de destruição das células beta pancreáticas e o papel do timo na incidência da doença, como demonstrado nos trabalhos de timectomia e injeção intratímica, diversos estudos buscaram caracterizar o microambiente tímico e o processo de diferenciação dos timócitos de camundongos NOD. Esses estudos foram planejados como uma forma de se compreender os eventos que podem levar à saída de células T autorreativas para a periferia ou um defeito nos mecanismos reguladores da autoimunidade.

Em 1991, Savino e colaboradores identificaram uma série de alterações imunohistológicas no microambiente tímico de camundongos NOD. Tanto machos quanto fêmeas exibiram uma redução no peso do timo dependente da idade; essa diminuição foi mais pronunciada em machos do que em fêmeas. Foi observada a presença de PVS até dez vezes maiores que de animais normais, tanto em camundongos machos quanto em fêmeas com seis semanas de idade. Esses espaços foram vistos na região medular do timo e contêm grande depósito de FN com perfil de expressão distinto do restante do órgão. Animais de 2 a 3 semanas de idade apresentaram padrão de expressão de FN normal, porém em animais mais velhos houve um aumento do depósito de FN tanto na porção cortical quanto na porção medular, assim como de colágeno tipo I. Além de moléculas de ECM (colágeno tipos I e IV, FN e LM), esses espaços encontraram-se cheios de células T maduras $CD3^+$, $SP CD4^+$ ou $CD8^+$ e algumas células B. Alguns clusters de células B foram observados no parênquima cortical (figura 1.12) (Savino et al. 1991).

Outra característica observada foi a mudança progressiva, dependente da idade, na rede de células epiteliais tímicas. Além da identificação de regiões ausentes de TEC na região medular, observou-se que, com aproximadamente 6 semanas de idade, as células epiteliais passaram a apresentar um perfil compactado diferente daquele observado em animais controle. Essas células com perfil diferenciado encontravam-se em volta dos PVS gigantes, sugerindo que o aumento destes poderia levar à compressão das células epiteliais (figura 1.12) (Savino et al. 1991).

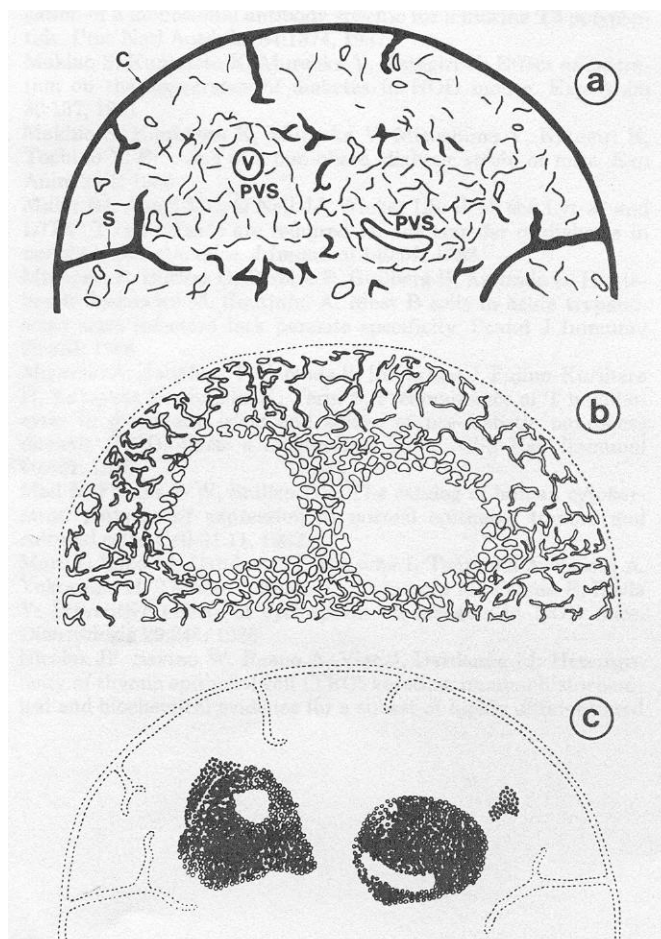


Figura 1.12 Esquema das alterações observadas no timo de camundongos NOD. (a) Espaços perivasculares (PVS) gigantes contendo moléculas de ECM com perfil de expressão diferenciado; (b) Mudanças no perfil da rede de células epiteliais tímicas (TECs) na região medular em volta dos PVS gigantes; (c) alta concentração de células T no interior dos PVS gigantes, embora células B também possam ser encontradas; clusters de células B podem ser encontrados no parênquima cortical (Savino et al. 1991).

A formação dos PVS gigantes no timo de camundongos NOD é dependente das células de origem hematopoiética, embora uma participação do componente epitelial não possa ser descartada. Camundongos NOD irradiados e reconstituídos com medula óssea de animais singênicos apresentaram anormalidades nos PVS 4 semanas após a reconstituição, o que não ocorreu quando os animais foram reconstituídos com células hematopoiéticas de camundongos normais (Colomb et al. 1996). A formação desses espaços é independente do MHC de NOD, H2g7, assim como de Idd1, definido como o principal contribuinte para a suscetibilidade a doença, uma vez que a integração de H2g7 em outro background genético não foi suficiente para a formação dos PVS gigantes (Colomb et al. 1996). Além disso, experimentos de transferência adotiva mostraram que o acúmulo de células T nos PVS não resulta de uma reentrada de células maduras da periferia no timo e estudos de cinética utilizando BrdU mostraram que as células marcadas no interior dos PVS aparecem tardiamente, de forma

simultânea aos timócitos medulares e que esses permanecem de forma transitória nessas estruturas. Logo, a cinética de reconstituição dos PVS foi compatível com a diferenciação progressiva dos precursores de células T vindos do córtex (Savino et al. 1993a).

Levantou-se a hipótese de um defeito na migração dos timócitos de camundongos NOD, que poderia levar ao acúmulo parcial das células T no interior dos PVS gigantes. Dada a importância das moléculas de ECM e integrinas na migração de timócitos, avaliou-se a expressão dos receptores de moléculas de ECM, VLA-4, VLA-5 e VLA-6. Foi observado que timócitos de camundongos NOD apresentam menor expressão do receptor de FN, VLA-5, quando comparado a diversas linhagens de camundongos normais e mesmo linhagens de camundongos que apresentam outras doenças autoimunes (Cotta-de-Almeida et al. 2004). Além disso, no interior dos PVS gigantes não se observa timócitos VLA-5⁺; estes são encontrados em grande quantidade ao redor dos PVS gigantes em outras porções do timo, sugerindo que o acúmulo dessas células possa estar ligado ao defeito na expressão do receptor, apesar do aumento do depósito de FN nesses espaços. Em paralelo, observou-se que timócitos de NOD aderem menos a células epiteliais e a FN (Cotta-de-Almeida et al. 2004). O defeito na expressão do receptor VLA-5 é mais pronunciado em timócitos maduros SP, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ (Cotta-de-Almeida et al. 2004; Mendes-da-Cruz et al. 2008).

Apesar do acúmulo de timócitos no interior dos espaços perivasculares no timo de camundongos NOD, ensaios *in vivo* demonstraram que algumas células são capazes de deixar o órgão, sugerindo que outras interações entre moléculas e seus receptores possam estar envolvidas nesse processo (Savino et al. 1993a). A análise dos receptores de ECM e seus ligantes e do receptor da quimiocina CXCL12, CXCR4, revelou que há aumento da deposição das moléculas de ECM FN e LM e da quimiocina CXCL12, bem como de sua colocalização no timo de camundongos NOD (Mendes-da-Cruz et al. 2008). Além disso, timócitos de NOD apresentam maior expressão do receptor de LM, VLA-6. Não foram observadas alterações importantes na expressão de VLA-4 e a expressão do receptor de CXCR4 é discretamente menor, em especial nos estágios mais maduros de diferenciação (Mendes-da-Cruz et al. 2008).

A expressão das integrinas nos timócitos de camundongos NOD reflete na sua capacidade migratória. Ensaio funcional de migração transendotelial *ex vivo* em câmaras de *transwell* mostraram que timócitos de camundongos NOD transmigram menos através do endotélio quando entram antes em contato com a FN, quando comparados a timócitos de camundongos C57BL/6. Essa diferença não foi observada na migração frente à LM, CXCL12 ou a monocamada de endotélio sozinha, sugerindo que o encontro dos timócitos com a FN antes de alcançar o endotélio pode interferir negativamente na sua migração. A menor capacidade

migratória frente à FN é mais pronunciada em timócitos SP, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ (Mendes-da-Cruz et al. 2008).

Em ensaios de migração em câmaras de transwell *ex vivo*, timócitos de NOD migraram menos frente à FN quando comparado ao controle C57BL/6, e migraram mais frente à LM e à CXCL12. Quando CXCL12 foi colocada simultaneamente às moléculas de ECM, o perfil de migração frente à ECM prevaleceu. Apesar de maior em comparação com a migração frente à FN sozinha, a migração de timócitos de NOD frente à FN em associação com CXCL12 também foi menor quando comparada ao controle. O mesmo é válido para a migração frente à LM em associação com CXCL12 que permaneceu maior (Mendes-da-Cruz et al. 2008).

É importante ressaltar que as alterações fenotípicas observadas em timócitos de camundongos NOD também são observadas em células T com fenótipo regulador CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺; estas também apresentam menor expressão de VLA-5. Consistente com o defeito na expressão VLA-5, as células Treg também se encontram retidas no interior dos PVS gigantes de camundongos NOD (Mendes-da-Cruz et al. 2008), o que pode explicar sua diminuição na periferia do sistema imune desses animais. A retenção das células T reguladoras pode ser de grande importância no desenvolvimento da doença, uma vez que as células capazes de regular as células T patogênicas na periferia podem estar seletivamente presas no timo.

Juntas, essas descobertas demonstram uma capacidade migratória alterada de timócitos de NOD e indicam que o defeito de VLA-5 é parte de um complexo mecanismo multivetorial, que compreende hipo e hiperresponsividade a determinados estímulos. Nosso laboratório propôs a hipótese de migração multivetorial intratímica, na qual a direção e velocidade de migração dos timócitos seria uma resultante dependente do balanço das interações mediadas por diferentes vetores, isto é, da interação de diferentes moléculas e seus receptores, como ligantes e receptores de ECM, citocinas, quimiocinas, entre outras. Conseqüentemente, alterações nos vetores individuais em condições patológicas, como no DT1, poderiam alterar o vetor resultante final, alterando a capacidade migratória dos timócitos (figura 1.13) (Mendes-da-Cruz et al. 2008).

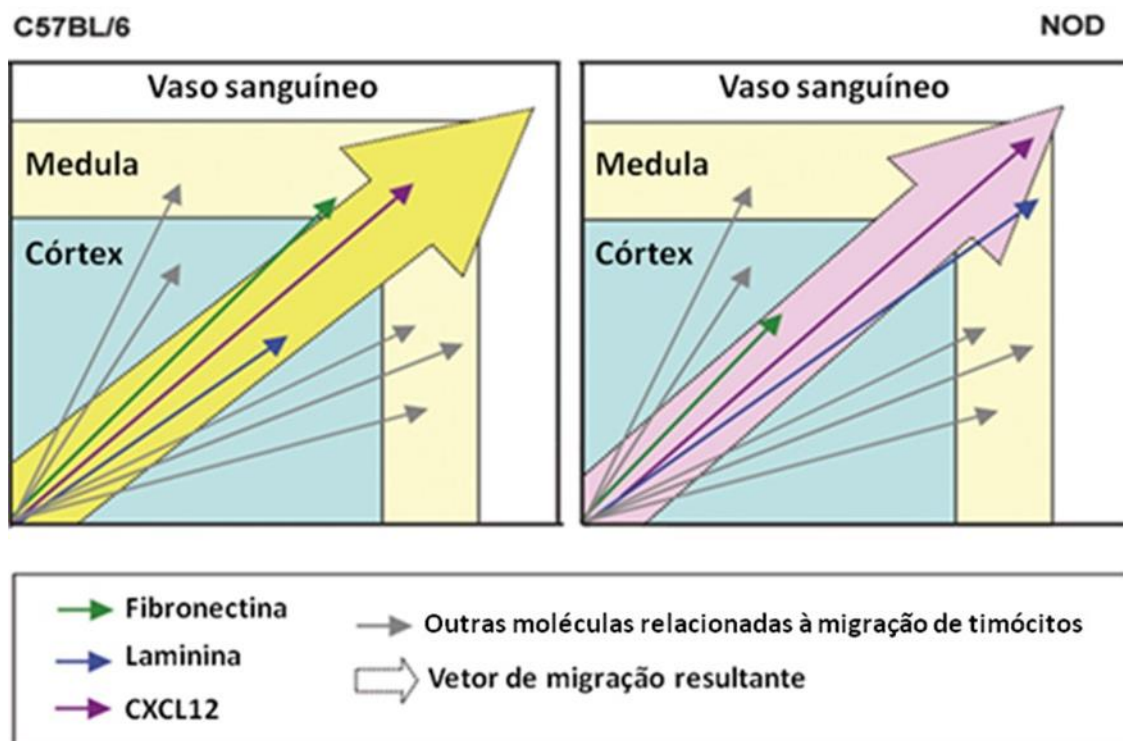


Figura 1.13 O modelo de migração multivetorial de timócitos. A migração e saída de células T do timo dependem de um balanço entre diferentes interações entre moléculas e seus receptores, aqui denominados vetores individuais (setas finas), que agem de forma atrativa ou repulsiva, determinando o vetor resultante (setas largas) que compreende a velocidade e a direção dessas células. Alterações ou defeitos em cada um desses vetores individuais são capazes de alterar a migração celular resultante, podendo modificar o perfil da periferia do sistema imune e levar a condições patológicas (adaptado de Mendes-da-Cruz et al. 2008).

Dentre as diversas moléculas envolvidas na migração e saída de timócitos do timo em condições fisiológicas e patológicas, o receptor S1P1 e seu ligante fisiológico, a S1P, têm sido amplamente estudados. Visto que camundongos NOD apresentam distúrbios migratórios que podem ser de grande importância no contexto do DT1, julgamos fundamental o conhecimento da participação dessas moléculas enquanto potenciais vetores relevantes nesse processo.

2. OBJETIVO

2.1 Hipótese e objetivo do trabalho

Camundongos NOD apresentam diversos distúrbios migratórios intratímicos que podem ser de grande relevância no contexto do DT1, dada a importância do timo no desenvolvimento da doença. Interações mediadas por S1P/ S1P1 são essenciais na migração e saída de células T do timo em condições fisiológicas e patológicas. Nós acreditamos que essas moléculas possam ter papel importante no acúmulo de timócitos observado no timo de camundongos NOD e, conseqüentemente, na patogênese do DT1. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão e papel do S1P1 e sua correlação com a expressão de VLA-5, em camundongos NOD pré-diabéticos, isto é, nos eventos que antecedem o aparecimento da doença.

2.1.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo principal do nosso trabalho, tivemos como 3 grandes objetivos específicos:

1. Caracterizar a incidência do DT1 na colônia de camundongos NOD utilizada;
2. Avaliar a expressão e função de S1P1 timo de camundongos NOD pré-diabéticos;
3. Avaliar a expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T nos linfonodos pancreáticos e no pâncreas de camundongos NOD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos NOD e C57BL/6 fêmeas de 9 a 12 semanas de idade, que compreende o estágio de pré-diabetes da colônia ou de 4 semanas, quando indicado. Os animais foram mantidos em condições SPF no ICTB (Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos) da Fiocruz. Os procedimentos para uso dos animais foram aprovados pelo comitê de ética em uso de animais do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/ Fiocruz (Licença número L-024/2015 válida até 31/05/2019).

3.2 Dosagem da glicemia

Para avaliar a incidência do DT1 na colônia de camundongos NOD utilizada em nosso trabalho, foi realizada a dosagem da glicemia dos animais machos e fêmeas semanalmente. A glicemia foi dosada uma vez por semana através de tiras de teste de glicose no sangue (Prestige Smart System), tendo início quando os animais completaram 10 semanas até que estes completassem 30 semanas ou ficassem diabéticos. Animais que apresentaram glicemia igual ou acima de 250 mg/dL (Posgai et al. 2017) por duas semanas consecutivas, foram considerados diabéticos.

3.3 Expressão de S1P1, SGPL1 e VLA-5 em células T

A expressão de S1P1, SGPL1 e VLA-5 nas células de NOD foi avaliada através das técnicas de citometria de fluxo, imunofluorescência *in situ* e RT-PCR quantitativa.

3.3.1 Citometria de fluxo

Foram realizadas marcações intracelulares para S1P1 e SGPL1, uma vez que o anticorpo anti-S1P1 utilizado se liga a porção intracelular do receptor e a enzima SGPL se encontra no citoplasma da célula, e marcações extracelulares para as moléculas VLA-5, CD62L, CD4 e CD8. Nos experimentos de expressão de S1P1 em células Treg, o S1P1 e o Foxp3 foram marcados na porção intracelular, após permeabilização celular, enquanto as moléculas VLA-5, CD4 e CD8, na porção extracelular. As marcações foram feitas de acordo com o protocolo do kit de marcação intracelular da BD – Becton & Dickinson. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo em U (BD Falcon), em que foram adicionadas 10^6 células em cada poço completando

para o volume final de 150 μ L com RPMI 1640 (Gibco), seguido de centrifugação a 300 g por 5 minutos, a 4 °C. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos, 4 °C, ao abrigo da luz com 10 μ L de um mix dos anticorpos para a porção extracelular ou com o controle de isotipo correspondente, diluídos em RPMI. Após lavagem com RPMI, as células foram incubadas por 20 minutos com 100 μ L de solução de fixação e permeabilização (BD – Becton & Dickinson) ou 40 minutos nos experimentos de marcação de células Treg. Após nova lavagem com solução de permeabilização e lavagem (BD – Becton & Dickinson), as células foram incubadas por 30 minutos, 4 °C, ao abrigo da luz com 10 μ L do anticorpo primário anti-S1P1 (Thermo Fisher Scientific), anticorpo primário anti-SGPL1 (Bioss Antibodies) ou anti-Foxp3 PE-Cy7 (BD – Becton & Dickinson), diluído em solução de permeabilização e lavagem. Após lavagem com solução de permeabilização e lavagem, as células foram incubadas por 30 minutos, 4 °C, ao abrigo da luz com 10 μ L do anticorpo secundário anti-coelho FITC (Molecular Probes) diluído em solução de permeabilização e lavagem. Como controle, foi utilizado o próprio anticorpo S1P1 bloqueado com o seu peptídeo neutralizante (ABR – Affinity BioReagents) também diluído em solução de permeabilização e lavagem ou anticorpo secundário sozinho. Após nova lavagem com solução de permeabilização e lavagem, as células foram ressuspensas em 200 μ L de formaldeído 2 % (Merck) e armazenadas a 4 °C até a análise por citometria de fluxo em um FACSCanto II™ (BD – Becton & Dickinson) através do software BD FACSDiva™ versão 8.1.3.

3.3.2 Imunofluorescência *in situ*

A análise da expressão de S1P1, SGPL1, fibronectina e citoqueratina no timo foi feita por imunofluorescência indireta *in situ*. Foram feitos cortes seriados em criostato (Leica CM1850) dos timos congelados em Tissue-Tek® OCT™ Compound. Após o corte, o tecido foi fixado em acetona (Merck) gelada por 10 minutos. Foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos com PBS/ BSA 1 % (Sigma-Aldrich) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-S1P1 (Thermo Fisher Scientific), anti-SGPL1 (Bioss Antibodies) anti-citoqueratina (CK) (Dako) e anti-fibronectina (FN) (Novotech ou Sigma Aldrich), os dois primeiros diluídos em solução PBS/ BSA 1 %/ Saponina 0,1 % (Sigma-Aldrich) e os últimos em PBS. Foram feitas marcações simples e os cortes foram mantidos a 4 °C *overnight*. Em seguida, foram feitas lavagens de 5, 10 e 5 minutos em PBS e adicionado o anticorpo secundário anti-coelho Alexa 488 (Molecular Probes) ou anti-coelho Alexa 546 (Molecular Probes) diluído em PBS/ BSA 1 %/ Saponina 0,1 % ou PBS. Os controles negativos foram feitos com uso do anticorpo secundário sozinho e não geraram

nenhuma marcação significativa. Após nova lavagem, foi feita montagem da lâmina com meio de montagem Fluoroshield™ (Sigma Aldrich) e os cortes foram mantidos a 4 °C, ao abrigo da luz até análise em microscópio de fluorescência Axio Imager A2 usando o software Axio Vision Rel 4.8 (Zeiss). Os campos selecionados compreendem as regiões corticais, medulares e PVS dos lóbulos tímicos. A análise quantitativa da fluorescência foi realizada transformando a marcação específica em uma imagem cinza de 8-bits. O *Mean Gray Value* foi usado para quantificar a expressão de S1P1 ou SGPL1, usando o software ImageJ (Rasband, WS ImageJ). Para a expressão de S1P1, nós examinamos 23 regiões corticais, 8 regiões medulares e 11 PVS gigantes no timo de NOD e 33 regiões corticais e 24 regiões medulares no timo de C57BL/6. Para a expressão da SGPL1, nós avaliamos 11 regiões corticais, 7 regiões medulares e 4 PVS gigantes no timo de NOD e 12 regiões corticais e 9 regiões medulares no timo de C57BL/6.

3.3.3 RT-PCR quantitativo

Para avaliar a presença de RNA mensageiro do receptor S1P1 em timócitos, bem como das enzimas SPHK1, SPHK2, SGPP1, SGPP2 e SGPL, nós realizamos RT-PCR quantitativo. Primeiramente, foi feita a extração do RNA mensageiro dos timócitos. As células foram lavadas em 1 mL de PBS/ DEPC e centrifugadas a 300 g por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS/ DEPC e transferidas para um tubo *epENDORF RNase free*. Foi adicionado 1 mL de trizol e após homogeneização, as células foram incubadas por 5 minutos para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Foi adicionado, 200 µL de clorofórmio e os *epENDORFs* foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados à temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação das amostras por 15 minutos a 12000 g e 4 °C, a fase aquosa superior, em que se encontra o RNA foi transferida para outro tubo *epENDORF RNase free* e adicionado álcool 100 % no mesmo volume obtido. A solução foi então transferida para colunas de extração de RNA do RNeasy® mini kit (Qiagen) e a extração foi feita seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade e pureza do RNA foram determinadas 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) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Foi preparado um mix contendo volume suficiente para 2 µg de RNA, 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 10 µL. A mistura foi incubada a 65 °C por 5 minutos. Ao final da incubação as amostras foram colocadas diretamente no gelo e foram adicionados 9 µL de um mix contendo 4 µL de 5x RT buffer, 2 µL

de DTT a 0,1 M, 2 uL de MgCl₂ a 50 mM e 1 µL de RNase OUT 10U/µL em cada amostra, que foram então incubadas 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. Para as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, um *pool* de timócitos de 4 timos foi ressuspenso em 1 mL de RPM1 com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 por 30 minutos a 4 °C, seguido de separação celular em um FACS Aria (BD). Após a separação celular, o RNA foi extraído usando o mesmo protocolo descrito acima. A síntese de cDNA foi feita com 1 ng de RNA. Após a síntese do cDNA foi realizado um RT-PCR quantitativo. Foram adicionados 12,5 µL do Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de cada primer, 3 µL a amostra de cDNA e 7,5 µL de H₂O nuclease *free*. Os ciclos de amplificação foram realizados em um StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95 °C por 20 segundos e 95 °C por 2 segundos, 60 °C por 30 segundos com um total de 40 ciclos. Para checar a especificidade dos *primers*, curvas de *melting* foram geradas após os 40 ciclos. A expressão gênica foi calculada por quantificação relativa, usando o método comparativo Ct ($\Delta\Delta C_t$) com *threshold* fixado em 0,2. Como genes de referência, utilizamos os genes constitutivos HPRT e GAPDH. A expressão gênica foi expressa como *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), com relação às amostras do camundongo controle C57BL/6, usadas como calibradoras. Para validação da expressão constitutiva dos genes de referência e análise da expressão gênica, foi utilizado o Expression Suite Software (Life Technologies) e a análise estatística foi feita com valores de ΔC_t . Os primers utilizados e outras informações sobre a padronização são encontrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Primers e parâmetros da curva padrão para amplificação gênica nos timos de C57BL/6 e NOD.

Gene alvo (camundongo)	Sequência do primer (5'-3')	Slope	Intercept	Coefficiente de linearidade (r ²)	Eficiência de amplificação (%)
SPHK1	FW - CCTTCTTATCTGGGTTTCGTTTTCC	-2,66	25,61	0,98	137,51
	RV - TGTGTGAGCGCCCTCGT				
SPHK2	FW - GCCCGAGATGGTCTAGTCT	-3,28	17,42	0,99	101,8
	RV - GTGGGTAGGTGTAGATGCAGA				
SGPP1	FW - GGGTGCTGGTCATGTACCTG	-2,83	15,61	0,99	125,6
	RV - CCCGTAGATAAGAGGATAGTGCC				
SGPP2	FW - CCCACTGGAATATCGACCCCT	-3,09	18,81	0,99	110,6
	RV - TCTCACAACGGGAGGAAAGG				
SGPL1	FW - CCTGTGACTCTGCTGATAGTCT	-3,32	23,09	0,99	100,085
	RV - CTGTTGTTTCGATVVTACGTCCA				
S1P1	FW - GTGTAGACCCAGAGTCTGCG	-3,06	15,9	0,99	112,4
	RV - AGCTTTTCCTGGCTGGAGAG				
HPRT	FW - TCCAGCGTCTGATTAGCGATG	-2,89	13,96	0,98	121,8
	RV - GGCCACAATGTGATGGCCTCCC				
GAPDH	FW - CCACTCACGGCAAATCAACGGC	-3,16	9,62	0,98	107,2
	RV - CCACCCTCAAGTGGGCCCCG				

3.4 Migração celular em câmara de *transwell*

A capacidade migratória dos timócitos frente a S1P foi analisada em ensaios de transmigração *ex vivo* em câmaras de Transwell® de poros de 5,0 µm (Corning Costar). Foi feito o bloqueio das membranas com PBS/BSA *fatty-acid free* 1 % (Sigma-Aldrich) durante 45 minutos à 37 °C, em estufa de CO₂. Após o bloqueio, 600 µL de RPMI/BSA 1 % com ou sem S1P nas concentrações de 10 nM e 100 nM foram adicionados a câmara inferior, enquanto 2x10⁶ células foram adicionadas a câmara superior em 100 µL de RPMI/ BSA 1 %. A placa foi incubada em uma estufa de CO₂ por 4 horas à 37 °C. Terminada a incubação, o meio de cultura da câmara inferior, contendo as células que migraram foi recolhido e centrifugado por 5 minutos a 300 g. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas para posterior contagem em câmara de Neubauer. As células que migraram foram posteriormente marcadas para VLA-5, CD62L, CD4 e CD8 e analisadas por citometria de fluxo em um FACSCanto II™ (BD – Becton & Dickinson) através do software BD FACSDiva™ versão 8.1.3. Para os experimentos de bloqueio de VLA-5, as células foram previamente incubadas com anticorpo bloqueador de VLA-5 na concentração de 200 µg/mL diluído em PBS 1 x, por 30 minutos a 4 °C e em seguida lavadas com PBS e centrifugadas por 5 minutos a 300 g, paralelo ao bloqueio da membrana. Uma vez que a análise de resposta quimiotática a S1P utilizando-se timócitos totais por quantificação das células migrantes não demonstrou sensibilidade e tendo em vista que as principais células responsivas a S1P são os timócitos maduros, definimos como forma de analisar a resposta migratória, a razão entre o percentual de *input* dos timócitos maduros em relação aos timócitos imaturos DP ou percentual de *input* para populações muito minoritárias.

3.5 Efeito da ativação de S1P1 na expressão e função da integrina VLA-5

O efeito da ativação de S1P1 pelo seu ligante endógeno, S1P, sobre a expressão e adesão promovidas por VLA-5 foi avaliado através de citometria de fluxo e do ensaio de adesão celular.

Para análise da expressão, o timo dos animais foi macerado em PBS 1 x, centrifugados a 300 g por 5 minutos, para lavagem e mantidos em *starving* em RPMI puro na estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse período, 2 x 10⁶ células foram colocadas em placas de 24 poços com 600 µL de RPMI puro ou com S1P nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 nM por 30 minutos e, a seguir, lavadas e marcadas para citometria de fluxo, com anticorpos para CD4, CD8, CD62L e VLA-5, como já descrito.

3.5.1 Adesão celular

Para análise da adesão celular, placas de 6 poços foram previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), utilizada como proteína controle, ou FN a 10 µg/mL. 500 µL de poli-L-lisina foram adicionados aos poços correspondentes no dia anterior e a placa foi mantida na estufa para secagem. Para formação do coating de FN, 900 µL de FN a 10 µg/ mL foram adicionados a placa, que foi mantida em estufa a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, foi removido o excesso de FN e plaqueados 10⁷ timócitos por poço em 1 mL de RPMI puro ou com SIP a 10 e 100 nM, seguido de incubação em estufa a 37 °C por 1 hora para permitir a adesão celular. Após esse período, o sobrenadante com as células não aderentes foi retirado, mantendo a placa inclinada. As células aderentes foram obtidas após sucessivas lavagens e homogeneizações com PBS gelado e contadas em câmara de Neubauer.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student* e 2way ANOVA através do *Tukey's Multiple Comparison Test*, com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 ou ****p < 0,0001.

4. RESULTADOS

4.1 Incidência do diabetes tipo 1

Na primeira etapa do nosso trabalho, avaliamos o aparecimento e incidência do DT1 na colônia de camundongos NOD utilizada, uma vez que o interesse nesse estudo foi avaliar o timo dos animais em fase de pré-diabetes. Para isso, foram realizadas semanalmente dosagens da glicemia dos animais de 10 a 30 semanas de idade. Como observado na tabela 4.1, das 20 fêmeas avaliadas, 14 ficaram diabéticas até 30 semanas, correspondendo a 70 % do total e dentre os 20 machos utilizados na avaliação, 8 ficaram diabéticos, correspondendo a 40 % do total. Consideramos a incidência do DT1 na nossa colônia satisfatória para nosso estudo e observamos que a maior parte dos animais avaliados ficaram diabéticos após 12 semanas. Esses resultados sugerem que o estágio pré-diabético na nossa colônia deva ser considerado para a idade máxima de 12 semanas. Utilizamos então o período de 9 a 12 semanas de idade em nosso trabalho como correspondente ao estágio de pré-diabetes da nossa colônia.

Tabela 4.1 Taxa de incidência do DT1 na colônia de camundongos NOD mantida no ICTB da Fiocruz/ RJ.

Incidência do diabetes tipo I na colônia de camundongos NOD utilizada neste trabalho		
	Fêmeas	Machos
Total	20	20
Diabéticos até 30 semanas	14	8
%	70	40

4.2 Expressão do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato no timo de camundongos NOD

Com o objetivo de avaliarmos a expressão de S1P1 nas diferentes subpopulações de tímócitos e no microambiente tímico de camundongos NOD, realizamos experimentos de citometria de fluxo, com os quais foi avaliada também a expressão das moléculas CD4, CD8, CD62L e do receptor VLA-5, além de RT-PCR quantitativa e de imunofluorescência *in situ*,

em que fizemos marcação para citoqueratina (CK) e fibronectina (FN). A figura 4.1 mostra o esquema representativo das subpopulações de timócitos e dos marcadores utilizados na maior parte das nossas análises.

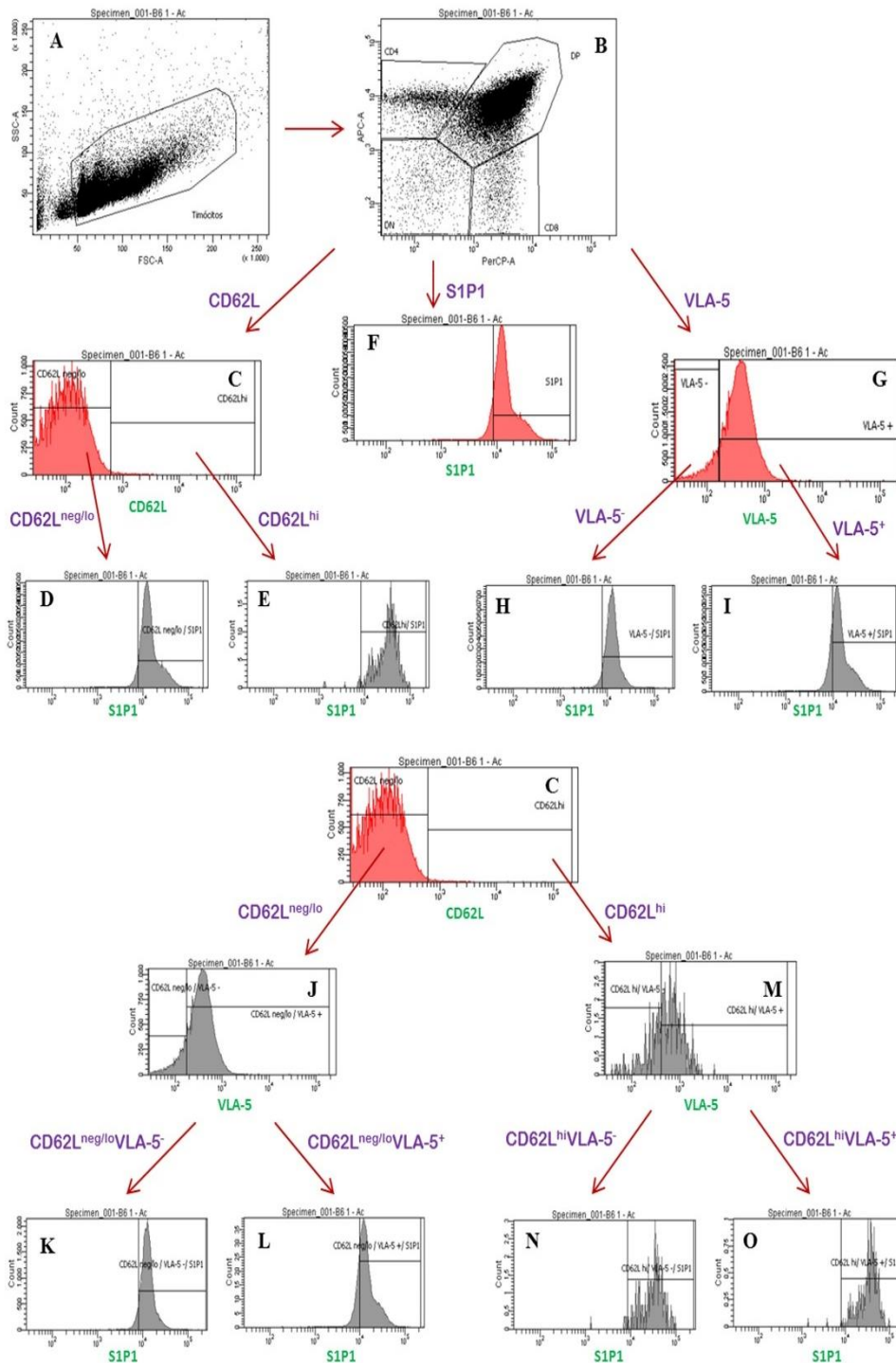


Figura 4.1 Esquema representativo da estratégia de regiões para análise das subpopulações de timócitos por citometria de fluxo. (A) Delimitação da população de timócitos no *dot plot* tamanho (FSC) x granulosidade (SSC); (B) *dot plot* CD4 APC x CD8 PerCP feito a partir da população de timócitos definida em A, mostrando as diferentes subpopulações de timócitos, em que DN= duplo-negativo $CD4^-CD8^-$; DP = duplo-positivo $CD4^+CD8^+$; CD4= simples-positivo $CD4^+CD8^-$; CD8= simples-positivo $CD4^-CD8^+$; (C)

Histograma da expressão de CD62L em timócitos totais, em que $^{neg/lo}$ = negativo/ em baixas densidades; hi = em altas densidades; (D) Histograma da expressão de S1P1 na população CD62L $^{neg/lo}$ definida pelo marcador no histograma C; (E) Histograma da expressão de S1P1 na população CD62L hi definida pelo marcador no histograma C; (F) Histograma da expressão de S1P1 em timócitos totais; (G) Histograma da expressão de VLA-5 em timócitos totais; (H) Histograma da expressão de S1P1 na população VLA-5 $^{-}$ definida pelo marcador no histograma G; (I) Histograma da expressão de S1P1 na população VLA-5 $^{+}$ definida pelo marcador no histograma G; (J) Histograma da expressão de VLA-5 na população CD62L $^{neg/lo}$ definida pelo marcador no histograma C; (K) Histograma da expressão de S1P1 na população CD62L $^{neg/lo}$ VLA-5 $^{-}$ definida pelo marcador no histograma J; (L) Histograma de expressão de S1P1 na população CD62L $^{neg/lo}$ VLA-5 $^{+}$ definida pelo marcador no histograma J; (M) Histograma da expressão da expressão de VLA-5 na população CD62L hi definida pelo marcador no histograma C; (N) Histograma da expressão de S1P1 na população CD62L hi VLA-5 $^{-}$ definida pelo marcador no histograma M; (O) Histograma da expressão de S1P1 na população CD62L hi VLA-5 $^{+}$ definida pelo marcador no histograma M. Histogramas semelhantes foram feitos a partir de cada subpopulação a ser analisada, definidas pelas regiões representadas no dot-plot B. Cada marcador foi determinado pelo seu respectivo controle negativo.

Primeiramente, avaliamos a expressão do receptor S1P1 nas diferentes subpopulações de timócitos de camundongos NOD. Como esperado, observamos que a densidade de expressão de S1P1 em células SP é maior comparada a células menos maduras DP, tanto em camundongos C57BL/6, como em camundongos NOD (figura 4.2). Observamos ainda que há uma diminuição importante na expressão do receptor nas células SP CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$, quando comparado aos controles. Essa diminuição é melhor evidenciada quando analisamos a densidade de expressão do receptor pelos timócitos, como podemos observar pela mediana de intensidade de fluorescência (figura 4.2). Ainda avaliando esse parâmetro, podemos observar que as diferenças na densidade de expressão do receptor se dão nos timócitos maduros SP CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$, mas não nos timócitos DP e que essa redução é mais evidente em células SP CD8 $^{+}$ (51,3 %) que em células SP CD4 $^{+}$ (36,7 %) (figura 4.2).

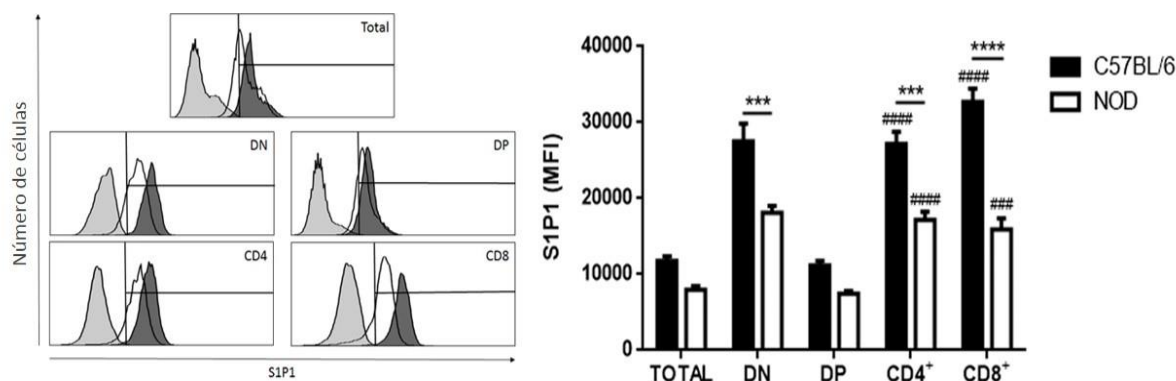


Figura 4.2 Expressão de S1P1 em timócitos de camundongos NOD. Os histogramas mostram a marcação representativa nos timócitos de NOD (curvas brancas) e C57BL/6 (curvas pretas). As curvas cinza representam o controle negativo da marcação e as regiões definem a marcação positiva. O painel mostra a expressão de S1P1 nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8 em C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisadas por citometria de fluxo. Total = timócitos totais; DN = duplo negativo CD4⁻CD8⁻; DP = duplo positivo CD4⁺CD8⁺; CD4⁺ = Simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *** ou #### p < 0.001; **** ou ##### p < 0.0001. Os asteriscos representam a significância estatística entre as subpopulações de C57BL/6 e NOD; *hashtags* representam a significância estatística entre as subpopulações DP e SP no mesmo animal, após avaliar o timo de 3 C57BL/6 e 4 NOD.

Esses resultados sugerem que o S1P1 possa estar envolvido nos distúrbios migratórios observados no timo de camundongos NOD e no acúmulo de timócitos maduros no timo desses animais, uma vez que sua expressão se encontra alterada nesses animais.

Dessa forma, nós avaliamos também a expressão da molécula CD62L nas subpopulações de timócitos. O CD62L pode ser considerado um marcador de maturação no timo e as células SP que o expressam em altas densidades (CD62L^{hi}) são consideradas as células mais maduras que estariam prontas para deixar o órgão. Nós observamos um aumento tanto na porcentagem de células SP CD4⁺ e CD8⁺ que expressam CD62L em altas densidades, como no número absoluto de células SP CD4⁺ e CD8⁺ que o expressam (figura 4.3 A e B). Esses resultados parecem estar relacionados ao acúmulo de timócitos no interior dos PVS de camundongos NOD, e sugerem que as células que se encontram retidas nesses espaços estão no último estágio de diferenciação.

Quando avaliamos a expressão de S1P1 nos timócitos mais maduros CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}, observamos uma diminuição na expressão do receptor em timócitos de camundongos NOD quando comparados aos controles (figura 4.3 C). Esses resultados mostram que a diminuição da expressão de S1P1 em camundongos NOD se dá também na subpopulação de timócitos mais madura que deveria deixar o órgão em direção à periferia.

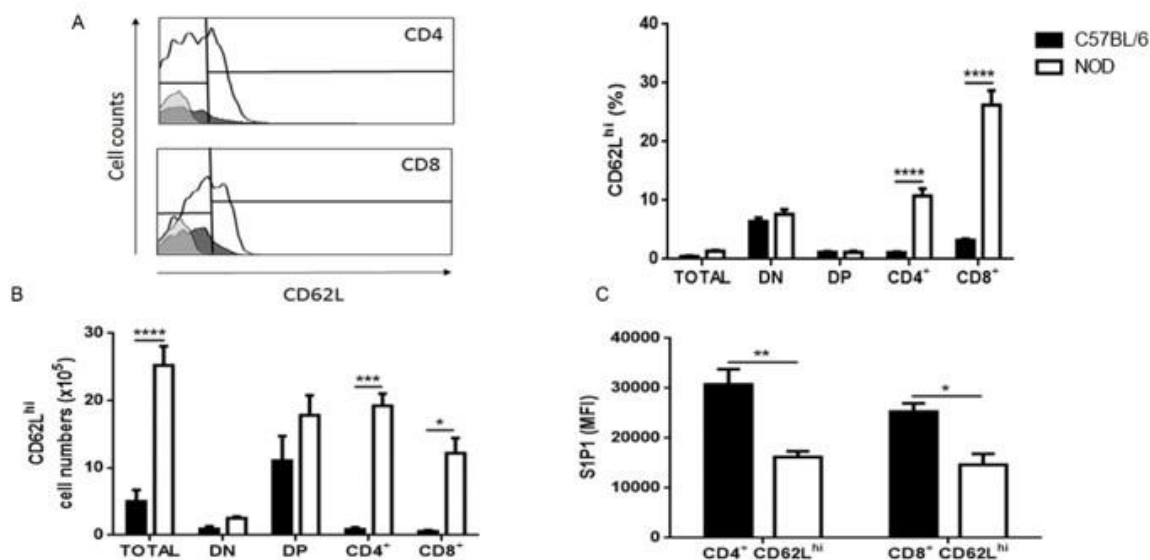


Figura 4.3 Expressão de S1P1 em timócitos maduros CD62^{hi} de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de CD62L e S1P1 nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8 em C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. (A) Expressão relativa de CD62L (%); (B) número absoluto de CD62L^{hi}; (C) expressão de S1P1 nas subpopulações CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}. Os histogramas mostram a marcação representativa nos timócitos de NOD (curvas brancas) e C57BL/6 (curvas pretas). As curvas cinza representam o controle negativo da marcação e as regiões definem a marcação positiva. Total = timócitos totais; DN = duplo negativo CD4⁻CD8⁻; DP = duplo positivo CD4⁺CD8⁺; CD4⁺ = Simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência; hi = em altas densidades. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. n = 3 C57BL/6; n = 4 NOD.

Ao avaliarmos a expressão de VLA-5 (definida pela marcação de CD49e) nas células SP CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}, observamos uma importante diminuição da expressão da integrina, quando comparado aos respectivos controles. Há diminuição tanto na porcentagem de células que expressam o receptor como na densidade de expressão do receptor nas células (figura 4.4 A e B). De forma curiosa, observamos que essa diminuição na expressão do receptor S1P1 se dá nas células mais maduras VLA5⁻ de camundongos NOD quando comparados aos controles. Por outro lado, as células VLA-5⁺ não apresentam diferença significativa na expressão do receptor (Figura 4.4 C e D). Esses resultados sugerem que a expressão de S1P1 e a da integrina VLA-5 possam estar relacionadas, resultando no envolvimento de ambas as moléculas no acúmulo dos timócitos maduros no timo de camundongos NOD.

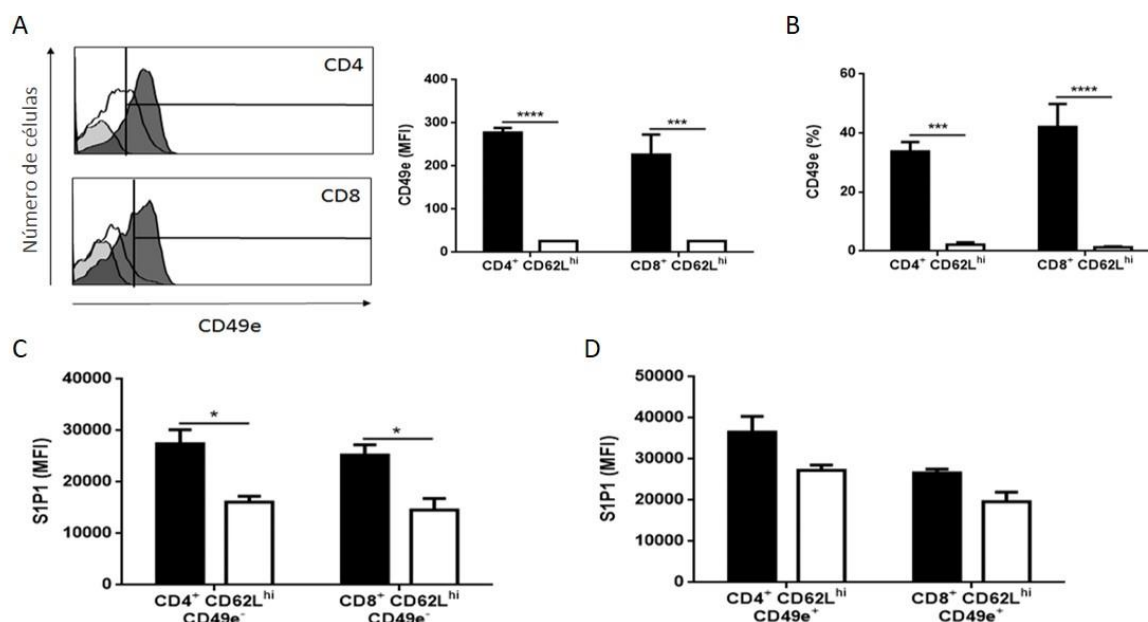


Figura 4.4 Expressão de VLA-5 e SIP1 em timócitos maduros CD62L^{hi} de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de VLA-5 e SIP1 nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8 em C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. (A) expressão de VLA-5 (definida pela marcação de CD49e) em timócitos maduros CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}, em mediana de intensidade de fluorescência (B) expressão relativa de VLA-5 (%) em timócitos maduros CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}; (C) expressão de SIP1 nas subpopulações CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ e CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (D) expressão de SIP1 nas subpopulações CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ e CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺. Os histogramas mostram a marcação representativa nos timócitos de NOD (curvas brancas) e C57BL/6 (curvas pretas). As curvas cinza representam o controle negativo da marcação e as regiões definem a marcação positiva. CD4⁺ = Simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência; hi = em altas densidades. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * p < 0.05; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. n = 3 C57BL/6; n = 4 NOD.

Interessantemente, quando nós analisamos as subpopulações menos maduras SP CD4⁺CD62L^{neg/lo} e CD8⁺CD62L^{neg/lo}, nós observamos que tanto as células VLA-5⁻ quanto as células VLA-5⁺ têm menor expressão de SIP1 (figura 4.5 A e B), sugerindo que a maturação de células VLA-5⁺ do fenótipo CD62L^{neg/lo} a CD62L^{hi} pode ser observada pelo aumento na expressão de SIP1, embora esse perfil tenha sido observado somente nas células SP CD4⁺ de NOD (figura 4.5 C e D).

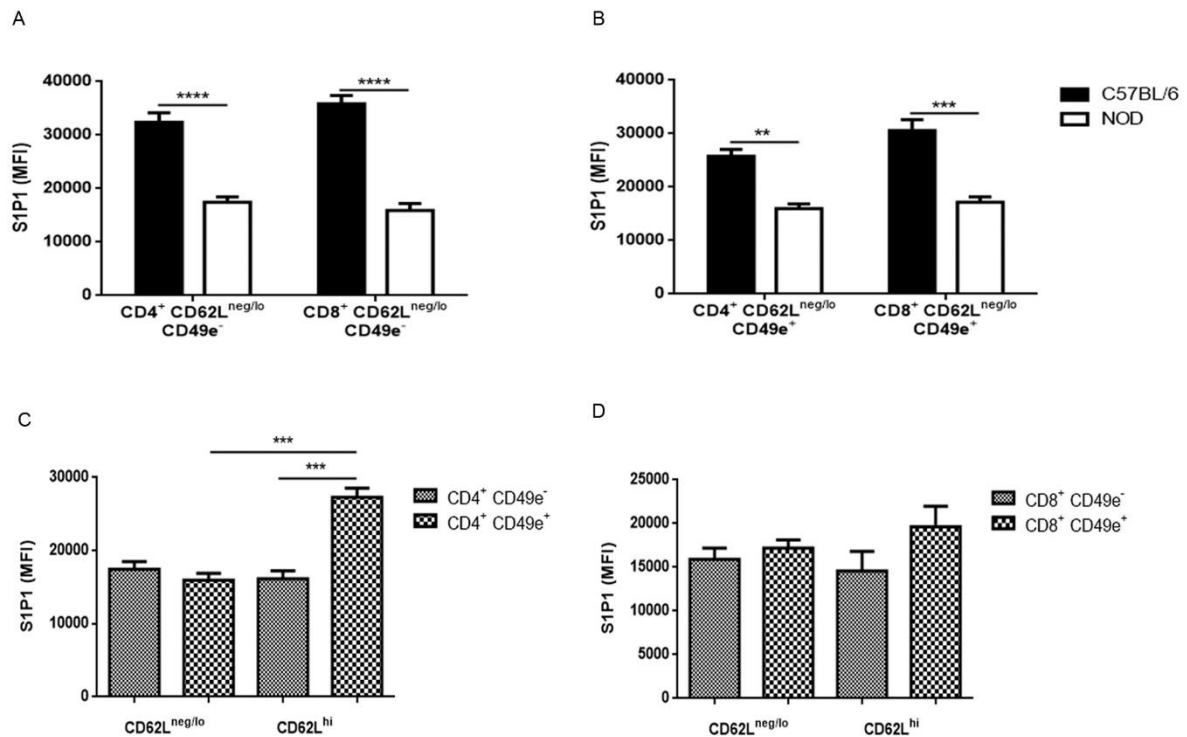


Figura 4.5 Expressão de VLA-5 e S1P1 em timócitos maduros $CD62L^{neg/lo}$ de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de VLA-5 e S1P1 nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8 em C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. (A) expressão de S1P1 nas subpopulações $CD4^+CD62L^{neg/lo}CD49e^-$ e $CD8^+CD62L^{neg/lo}CD49e^-$; (B) expressão de S1P1 nas subpopulações $CD4^+CD62L^{neg/lo}CD49e^+$ e $CD8^+CD62L^{neg/lo}CD49e^+$; (C) comparação de expressão de S1P1 em $CD4^+CD62L^{neg/lo}CD49e^-$, $CD4^+CD62L^{neg/lo}CD49e^+$, $CD4^+CD62L^{hi}CD49e^-$ e $CD4^+CD62L^{hi}CD49e^+$; (D) comparação de expressão de S1P1 em $CD8^+CD62L^{neg/lo}CD49e^-$, $CD8^+CD62L^{neg/lo}CD49e^+$, $CD8^+CD62L^{hi}CD49e^-$ e $CD8^+CD62L^{hi}CD49e^+$. $CD4^+$ = Simples positivo $CD4^+CD8^-$; $CD8^+$ = simples positivo $CD4^-CD8^+$; MFI = mediana da intensidade de fluorescência; hi = em altas densidades; neg/lo = negativo/ em baixas densidades. Resultados são expressos como média \pm EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 3$ C57BL/6; $n = 4$ NOD.

Posteriormente, nós avaliamos a expressão de S1P1 em camundongos de 4 semanas de idade, que corresponde a idade em que diversas alterações começam a aparecer no timo de camundongos NOD, incluindo a formação dos PVS gigantes (Makino et al. 1980, 1981; Colomb et al. 1996; Chen et al. 2001; Brimnes et al. 2002). Curiosamente, nós não observamos diferença em nenhuma das populações investigadas (figura 4.6), sugerindo que a menor expressão de S1P1 apareça tardiamente e depois do defeito de VLA-5, que tem início ainda na fase embrionária (Cotta-de-Almeida et al. 2004).

Juntos, os resultados mostrados acima indicam que a menor expressão de S1P1, juntamente com o defeito de VLA-5 nas subpopulações de timócitos SP maduros de

camundongos NOD, pode modular a capacidade migratória dos timócitos e contribuir para o acúmulo dessas células nos PVS.

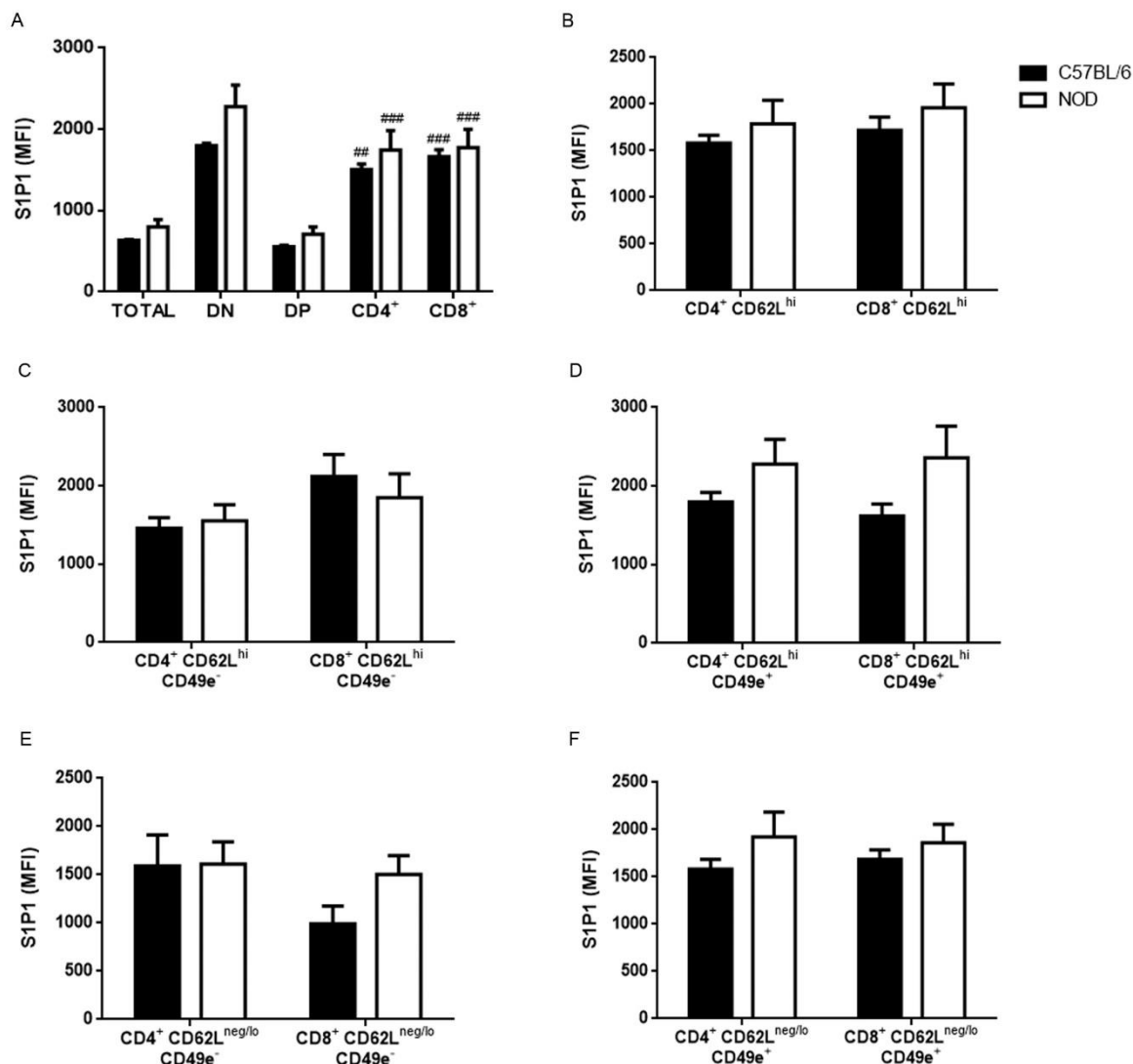


Figura 4.6 Expressão de S1P1 em timócitos de NOD com 4 semanas de idade. Os gráficos mostram a expressão de S1P1 nas subpopulações (A) total, DN, DP e SP; (B) CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}; (C) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ e CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (D) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ e CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺; (E) CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ e CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻; (F) CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ e CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺, definidas por CD4 e CD8 em C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. Total = timócitos totais; DN = duplo negativo CD4⁻CD8⁻; DP = duplo positivo CD4⁺CD8⁺; CD4⁺ = Simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência; hi = em altas densidades; neg/lo = negativo/ em baixas densidades. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. n = 4 C57BL/6; n = 4 NOD.

De acordo com os resultados de citometria de fluxo, a imunofluorescência *in situ* revelou uma maior expressão de S1P1 na região medular do timo de C57BL/6 (figura 4.7 A e

B, painel direito), assim como no timo de NOD e no PVS gigante (figura 4.7 A e B, painel esquerdo), quando comparados a região cortical. Não houve diferença significativa comparando a intensidade de fluorescência de S1P1 na medula e no PVS gigante (figura 4.7 B, painel esquerdo).

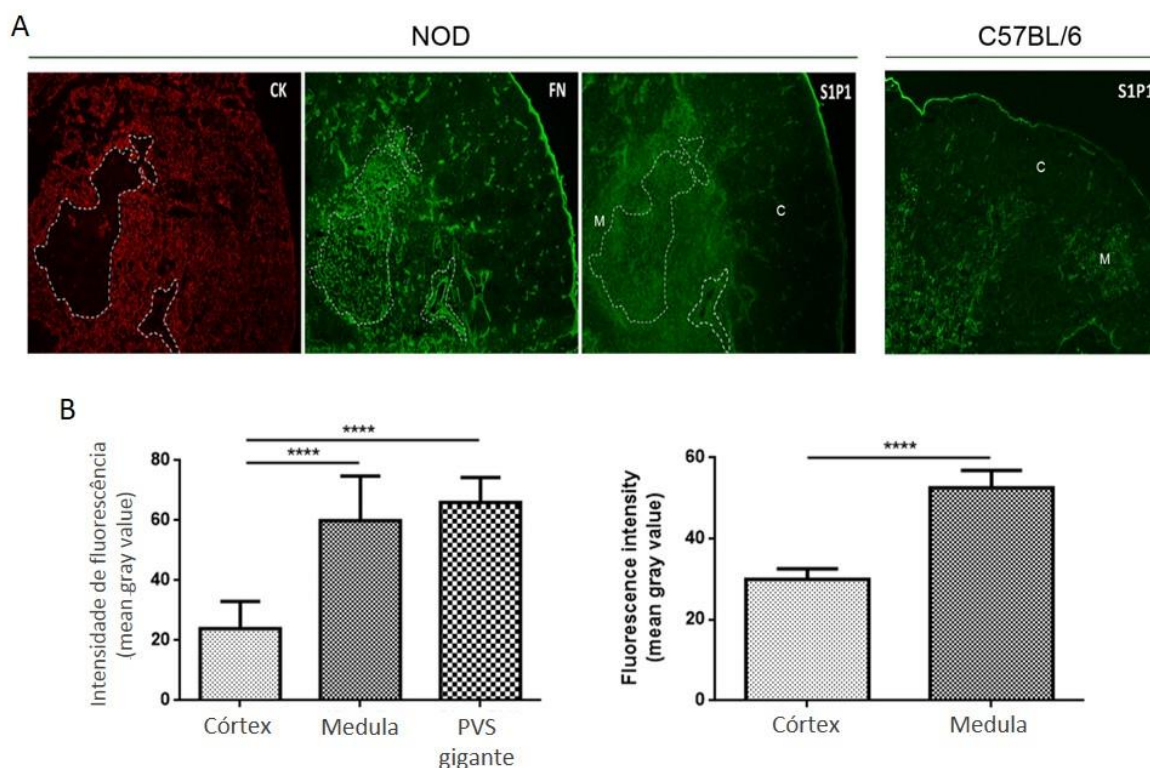


Figura 4.7 Expressão de S1P1 no microambiente tímico de camundongos NOD. (A) Imunofluorescência mostrando o perfil de expressão de S1P1, fibronectina (FN) e citoqueratina (CK; marcador de células epiteliais) em NOD e expressão de S1P1 em C57BL/6. As linhas brancas tracejadas delimitam o PVS gigante. C = região cortical; M – região medular. Três timos por grupo foram avaliados, com um corte analisado. Ampliação original, x100; (B) Intensidade de fluorescência de S1P1 no córtex, medula e PVS gigante de NOD (gráfico esquerdo) e no córtex e medula de C57BL/6 (gráfico direito), representada pelo *mean gray value*. Os resultados foram analisados usando teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando **** $p < 0.0001$.

Nós investigamos também se a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de S1P1 correlaciona com a menor expressão proteica em timócitos de camundongos NOD. Apesar da menor expressão do receptor quando comparado a C57BL/6, nós encontramos uma maior expressão do RNAm em timócitos totais e SP CD8⁺ de NOD (figura 4.8 A e B), sugerindo que a menor expressão do receptor ocorre somente a nível proteico e pode levar a uma regulação transcricional positiva do gene de S1P1.

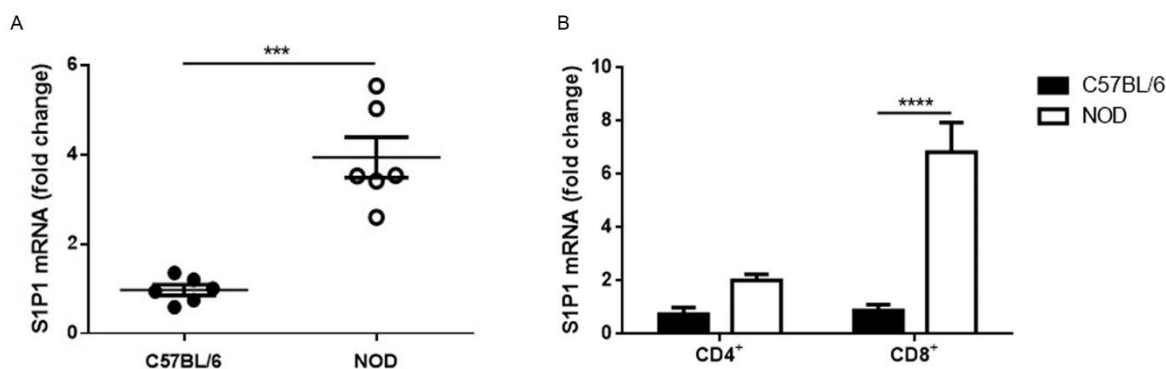


Figura 4.8 Expressão do RNAm de S1P1 em timócitos de camundongos NOD. (A) o gráfico mostra a expressão do mRNA de S1P1 nos timócitos totais de camundongos C57BL/6 (bolas pretas) e NOD (bolas brancas). (B) Expressão do mRNA de S1P1 nas subpopulações de timócitos SP CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas). CD4⁺ = simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = CD4⁺CD8⁺. A quantificação relativa foi feita pelo método comparativo Ct ($\Delta\Delta Ct$), usando C57BL/6 como calibrador (valor de *fold change* = 1). As barras horizontais representam a média \pm EPM de seis replicatas biológicas para timócitos totais (A) e dezesseis replicatas biológicas para as subpopulações SP (B). Os resultados foram analisados usando teste t de *Student* para timócitos totais e 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para as subpopulações separadas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

4.3 Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da S1P no timo de camundongos NOD

Uma vez que nós observamos uma discrepância no perfil de expressão do receptor S1P1 comparando sua expressão proteica e de seu RNAm, nós posteriormente, passamos a avaliar possíveis alterações que possam levar a uma redução pós-transcricional do receptor, como internalização devido a aumento na concentração de seu ligante, S1P. Para tal, nós realizamos RT-PCR quantitativa a fim de avaliar a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da S1P e manutenção de sua concentração tecidual.

Nós observamos diferenças significativas na expressão das enzimas SPHK2 e SGPP1 nos timócitos de NOD (figura 4.9 A e B). A expressão do RNAm dessas enzimas encontra-se maior, comparada a timócitos de camundongos C57BL/6, o que pode indicar um aumento do metabolismo de S1P, tanto na etapa de fosforilação quanto de desfosforilação do lipídio, embora uma correlação com a expressão proteica seja necessária. Não observamos diferença na expressão da enzima SGPL1 e não houve detecção de RNAm das enzimas SPHK1 e SGPP2 nos timócitos de nenhuma das linhagens analisadas (figura 4.9 C, D e E).

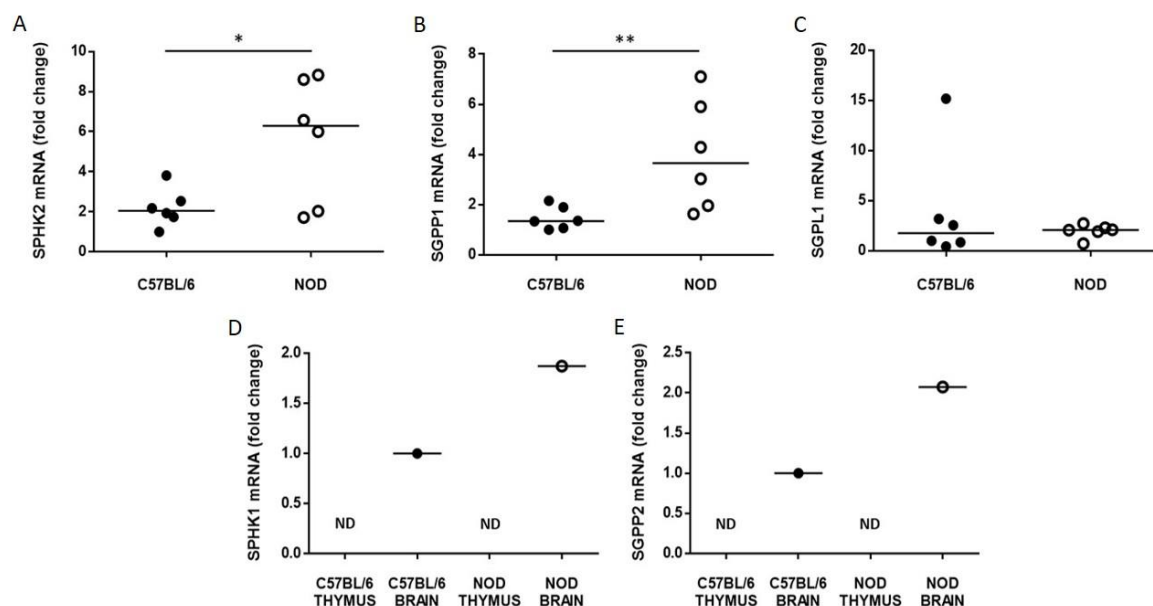


Figura 4.9 Expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da S1P em timócitos de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão do RNA mensageiro das enzimas (A) esfingosina-quinase 2 (SPHK2); (B) esfingosina-1-fosfato fosfatase 1 (SGPP1); (C) esfingosina-1-fosfato liase 1 (SGPL1); (D) esfingosina-quinase 1 (SPHK1) e; (E) esfingosina-1-fosfato fosfatase 2, nos timócitos totais de camundongos C57BL/6 (bolas pretas) e NOD (bolas brancas). A quantificação relativa foi feita pelo método comparativo Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), usando C57BL/6 como calibrador (valor de *fold change* = 1) e o cérebro foi utilizado como controle positivo de expressão. As barras horizontais representam a média \pm EPM de seis replicatas biológicas. Os resultados foram analisados usando teste t de *Student* e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ND = não detectado.

4.4 Expressão de esfingosina-1-fosfato liase nos timócitos de camundongos NOD

Em seguida, nós avaliamos a expressão da enzima SGPL nos timócitos de camundongos NOD. Embora não tenhamos observado diferença na expressão do seu RNAm em timócitos totais, resolvemos analisar sua expressão nas subpopulações separadas de timócitos, além de sua expressão proteica em timócitos maduros. A SGPL mantém as concentrações de S1P constantes nos tecidos através de sua degradação irreversível (Saba and Hla 2004). No timo, sua expressão na região medular está relacionada a baixas concentrações de S1P em torno dos vasos, possibilitando aumento da expressão de S1P1 e saída de timócitos maduros (Borowsky et al. 2012; Maeda et al. 2013b). A inibição de SGPL leva ao acúmulo de timócitos maduros no timo e formação de PVS gigantes, secundário a internalização de S1P1 (Schwab et al. 2005; Maeda et al. 2013b).

Nós observamos, através de RT-PCR quantitativo, uma maior expressão do RNAm da SGPL1 em timócitos SP CD8⁺, quando comparados a timócitos de C57BL/6 (figura 4.10).

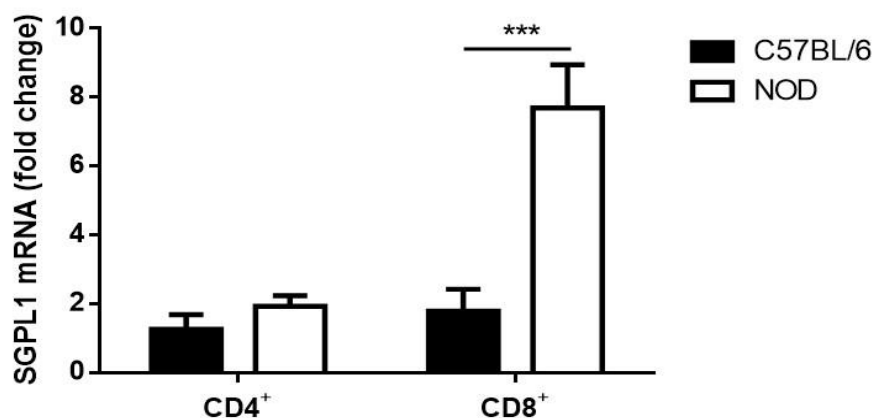


Figura 4.10 Expressão de SGPL1 nas subpopulações SP CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos NOD. O gráfico mostra a expressão do mRNA de SGPL1 nas subpopulações de timócitos SP CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas). CD4⁺ = simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺. A quantificação relativa foi feita pelo método comparativo Ct ($\Delta\Delta Ct$), usando C57BL/6 como calibrador (valor de *fold change* = 1). As barras representam a média \pm EPM de dezesseis replicatas biológicas. Os resultados foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *** $p < 0.001$.

Quando avaliamos a expressão proteica de SGPL, através de citometria de fluxo, observamos uma maior densidade de expressão nos timócitos SP CD4⁺ e CD8⁺, comparados a células DP, tanto de C57BL/6 quanto de NOD (figura 4.11 A). Embora essas diferenças tenham ocorrido em ambas as linhagens de camundongos, elas foram menos importantes nos timócitos de camundongos NOD. Curiosamente, quando nós avaliamos as subpopulações CD62L^{hi}, as células SP CD8⁺CD62L^{hi}, CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ e CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ de NOD apresentaram menor expressão de SGPL1 em comparação as de C57BL/6 (figura 4.11 B, C e D).

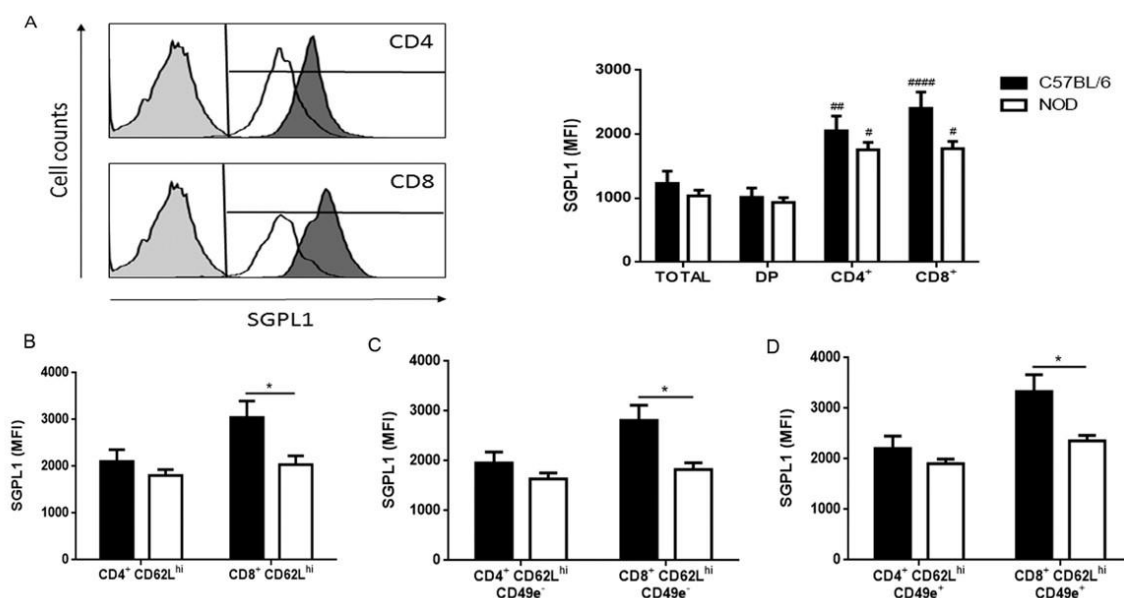


Figura 4.11 Expressão de SGPL1 em timócitos de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de SGPL1 nas subpopulações de timócitos de camundongos NOD, definidas pelos marcadores CD4 e CD8 em camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. (A) SGPL1 em timócitos totais, assim como nas subpopulações DP CD4⁺CD8⁺, SP CD4⁺ e SP CD8⁺. Os histogramas mostram a marcação de SGPL1 nas subpopulações SP CD4⁺ e CD8⁺ de NOD (curva branca) e C57BL/6 (curva preta). As curvas cinzas representam o controle de marcação negativa; (B) SGPL1 em timócitos maduros SP CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}; (D) expressão de SGPL1 em células SP CD49e⁺CD4⁺CD62L^{hi} and CD49e⁺CD8⁺CD62L^{hi}. Total = timócitos totais; DN = duplo negativo CD4⁻CD8⁻; DP = duplo positivo CD4⁺CD8⁺; CD4⁺ = simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * ou # p < 0.05; ## p < 0,01; #### p < 0.0001. Os asteriscos representam a significância estatística entre as subpopulações de C57BL/6 e NOD; *hashtags* representam a significância estatística entre as subpopulações DP e SP no mesmo animal, após avaliar o timo de 8 C57BL/6 e 8 NOD.

O mesmo aumento de expressão de SGPL1 nos timócitos SP em relação aos DP foi observado nas células VLA-5⁻ e VLA-5⁺ (figura 4.12 A e B) e quando comparamos sua expressão em timócitos menos maduros CD62L^{neg/lo}, houve uma redução significativa nas células SP CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ (figura 4.12 C e D).

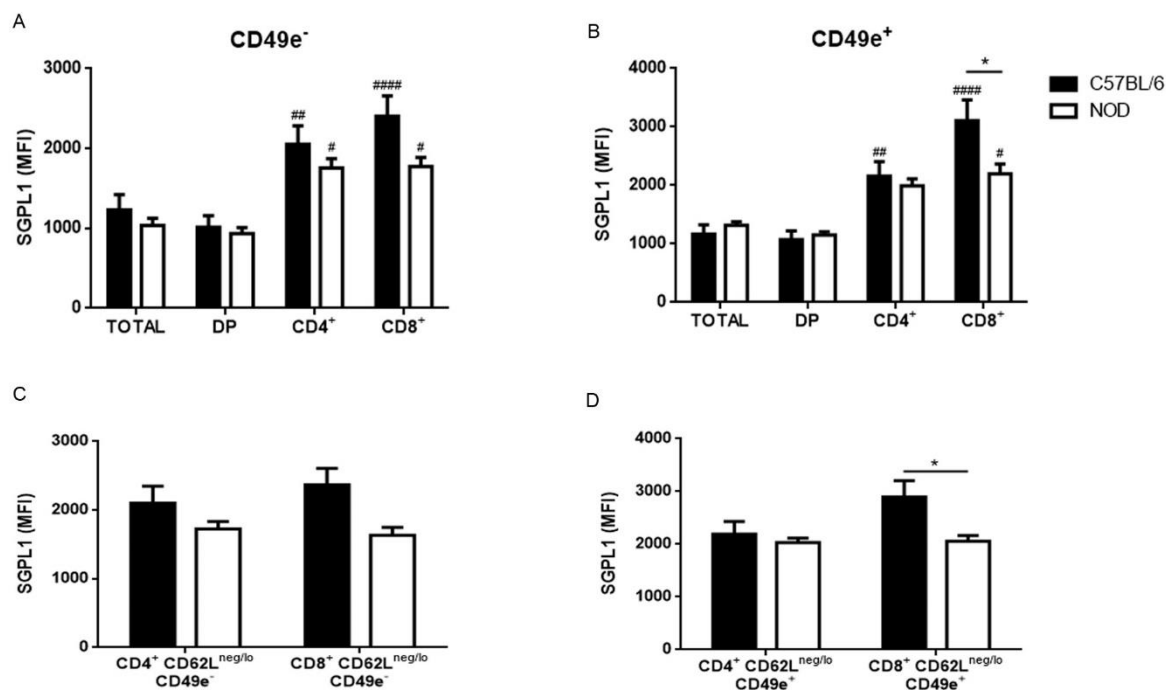


Figure 4.12 Expressão de SGPL1 em células VLA-5⁺ e VLA-5⁻ de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de SGPL1 nas subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8 em camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisadas por citometria de fluxo. (A), timócitos CD49⁺ totais e subpopulações DP, CD4⁺ e CD8⁺; (B) timócitos CD49⁻ totais e subpopulações DP, CD4⁺ e CD8⁺; (C) células SP CD4⁺ e CD8⁺ CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ e (D) células SP CD4⁺ e CD8⁺ CD62L^{neg/lo}CD49e⁺. Total = timócitos totais; DN = duplo negativo CD4⁻CD8⁻; DP = duplo positivo CD4⁺CD8⁺; CD4⁺ = simples positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positivo CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência. Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * ou # p < 0.05; ## p < 0,01; #### p < 0.0001. Os asteriscos representam a significância estatística entre as subpopulações de C57BL/6 e NOD; *hashtags* representam a significância estatística entre as subpopulações DP e SP no mesmo animal, após avaliar o timo de 8 C57BL/6 e 8 NOD.

De acordo com o aumento da expressão de SGPL1 nas células SP por citometria de fluxo, nós observamos através de imunofluorescência *in situ* um maior depósito de SGPL1 na região medular tímica, tanto de C57BL/6 quanto NOD (figura 4.13). A redução da expressão de SGPL1 nos timócitos maduros de NOD pode resultar em menor degradação e consequente acúmulo de S1P em torno dos PVS, levando a internalização de S1P1 e acúmulo de timócitos.

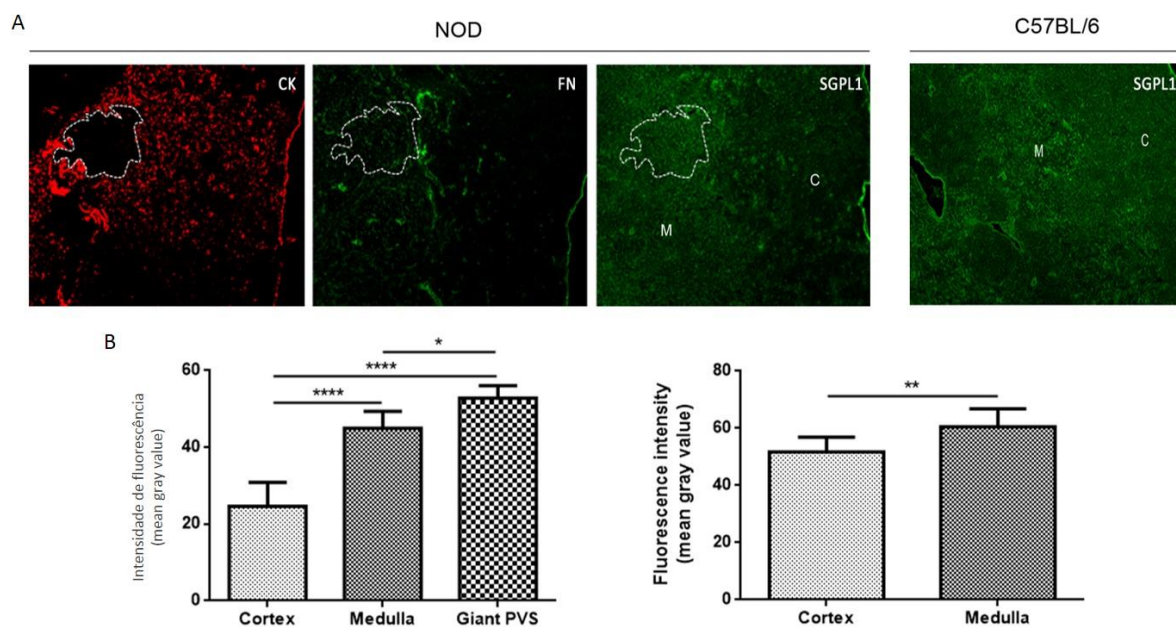


Figure 4.13 Expressão de SGPL1 no microambiente tímico de camundongos NOD. (A) Perfil de expressão de SGPL1, fibronectina (FN) e citoqueratina (CK; marcador de células epiteliais) no timo de NOD e expressão de SGPL1 em C57BL/6. As linhas brancas tracejadas delimitam o PVS gigante. C = região cortical; M = região medular. n = 3 timos por grupo. Aumento original, x100; (B) quantificação da intensidade de fluorescência de SGPL1 no córtex, medula e PVS gigante de camundongos NOD (gráfico da esquerda) e no córtex e medula de C57BL/6 (gráfico da direita), representado pelo *mean gray value*. Os resultados foram analisados usando teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05; **p < 0,01 ou ****p < 0,0001.

4.5 Migração dos timócitos de NOD frente a esfingosina-1-fosfato

Nós investigamos o papel funcional da interação S1P/ S1P1 nas subpopulações de timócitos de camundongos NOD através de ensaios de transmigração celular em câmaras de *transwell*[®]. Nós observamos que a subpopulação SP CD4⁺CD62L^{hi} tanto de C57BL/6 quanto de NOD migraram frente a 10 nM de S1P, enquanto uma resposta migratória discreta, mas não significativa, foi observada somente nas células CD8⁺CD62L^{hi} de C57BL/6 frente as concentrações de 10 nM e 100 nM de S1P (figura 4.14 A e B).

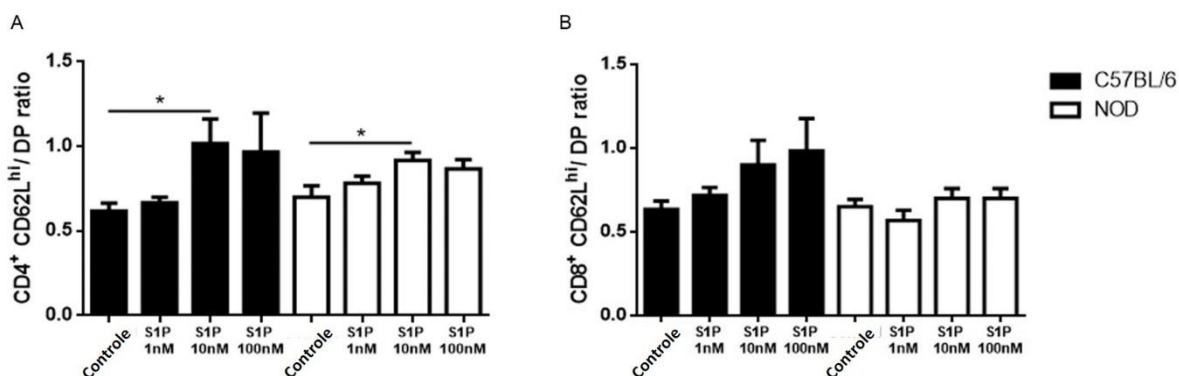


Figure 4.14 Migração dos timócitos de NOD frente a diferentes concentrações de S1P. Timócitos totais de camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas) foram adicionados ao inserto de *transwell* e estimulados com 1, 10 ou 100 nM de S1P. Os percentuais de *input* de SP (A) CD4⁺CD62L^{hi} e (B) CD8⁺CD62L^{hi} e DP foram determinados por citometria de fluxo. Resultados são representados pela razão (*ratio*) dos percentuais de *input* (timócitos SP por DP) e expressos através da média ± EPM, analisados por teste t de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * p < 0,05. n = 6 C57BL/6; n = 6 NOD.

Nós também investigamos se as diferenças na expressão de S1P1 entre as células VLA-5⁺ e VLA-5⁻ se correlacionam com mudanças na resposta migratória frente a S1P. Nós observamos que as células SP CD62L^{hi}CD49⁻ tiveram menor capacidade migratória frente a 10 e 100 nM de S1P quando comparadas aos controles (figura 4.15 A e B). Por outro lado, as células SP CD62L^{hi}CD49⁺ apresentaram maior resposta migratória frente as mesmas concentrações (figura 4.15 C e D). Quando nós tratamos as células CD62L^{hi}CD49⁺ com anticorpo bloqueador específico para CD49e, nós observamos uma capacidade migratória reduzida frente a 10 nM de S1P, enquanto a migração frente a 100 nM se manteve inalterada (figura 4.15 E e F).

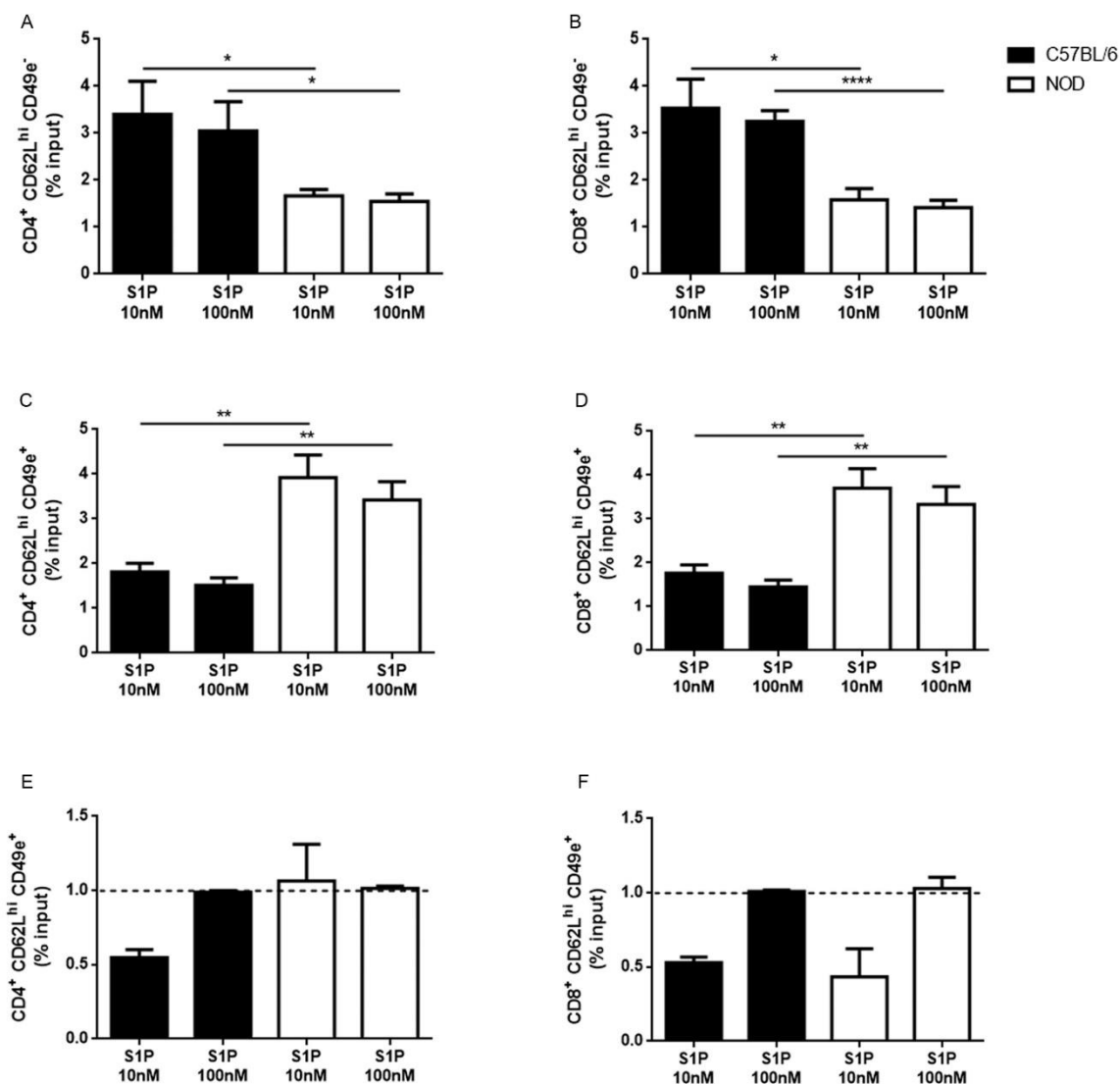


Figure 4.15 Capacidade migratória de timócitos SP CD62L^{hi} VLA-5⁺ e VLA-5⁻ de camundongos NOD. Timócitos totais de camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas) foram adicionados ao inserto de *transwell* e estimulados com 10 ou 100 nM de S1P. Os percentuais de *input* das células SP (A) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (B) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (C) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺; e (D) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ foram determinados por citometria de fluxo. Percentuais de *input* de (E) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ e (F) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ após o bloqueio de CD49e, comparado com as células tratadas com o controle de isotipo (linhas pretas tracejadas = 1). Resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados através do teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05; **p < 0,01 ou ****p < 0,0001. n = 6 C57BL/6 e 6 NOD (A-D) e n = 4 C57BL/6 e 4 NOD (E,F).

Nenhuma resposta migratória foi observada quando as subpopulações menos maduras SP CD62L^{neg/lo} de C57BL/6 e NOD foram estimuladas com as mesmas concentrações de S1P e, em alguns casos, a migração foi ainda menor que o controle (figura 4.16 A e B). Quanto as células menos maduras VLA-5⁺ e VLA-5⁻, não houve diferença na resposta migratória das células SP CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ entre NOD e C57BL/6, mas as células

CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ de NOD apresentaram menor capacidade migratória frente a 10 nM de S1P (figura 4.16 C e D). Para as células CD49e⁺, somente a subpopulação SP CD4⁺CD62L^{neg/lo} de NOD apresentou maior capacidade migratória frente a 10 e 100 nM de S1P (figura 4.16 E e F).

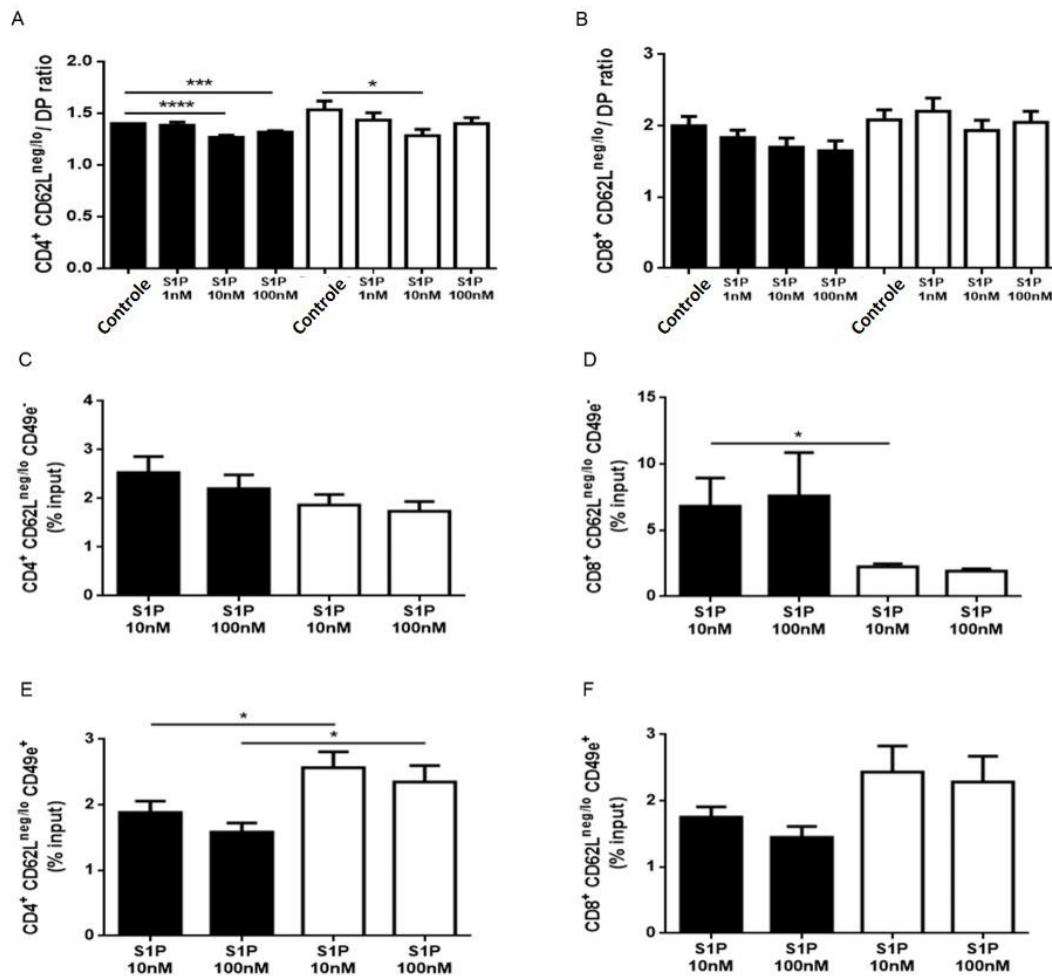


Figure 4.16 Capacidade migratória de timócitos SP CD62L^{neg/lo} de camundongos NOD. Os painéis mostram a capacidade migratória das células SP (A) CD4⁺CD62L^{neg/lo}; (B) CD8⁺CD62L^{neg/lo}; (C) CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻; (D) CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻; (E) CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ e (F) CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ frente a 1, 10 ou 100 nM de S1P, em camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas). CD4⁺ = simples positiva CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples positiva CD4⁻CD8⁺; MFI = mediana da intensidade de fluorescência. Os resultados são representados através da razão dos percentuais de *input* (timócitos SP por DP) ou pelos percentuais de *input* e são expressos como média ± EPM, após análise por 2way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ou teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05; ***p < 0,001 ou ****p < 0,0001. n = 6 C57BL/6; n = 6 NOD.

Juntos, esses resultados mostram que os níveis de expressão de VLA-5 (avaliados pela expressão de CD49e) podem influenciar a resposta migratória da célula frente a S1P, particularmente em camundongos NOD.

4.6 Expressão de S1P1 em células T reguladoras no timo

Posteriormente, nós avaliamos a expressão de S1P1 em células Treg no timo de camundongos NOD. Uma vez que essas células são importantes reguladores da resposta imune e têm papel essencial no controle de autoimunidade e se encontram retidas nos PVS gigantes de camundongos NOD (Mendes-da-Cruz et al. 2008).

Nós observamos que, assim como ocorre com VLA-5 (Mendes-da-Cruz et al. 2008), as células Treg de camundongos NOD também apresentam diminuição da expressão de S1P1 quando comparadas as células de C57BL/6. Assim como nas outras subpopulações do timo, essa diminuição é observada quando avaliamos a densidade de expressão do receptor, através da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), enquanto o percentual de células que expressam o receptor é o mesmo para ambos os animais (figura 4.17 A e C). Condizente com o acúmulo de células Treg no timo de camundongos NOD e com o percentual dessas células que expressa o receptor S1P1, há um aumento significativo no número total de células Foxp3⁺ e do número absoluto de células Treg que expressam S1P1, quando comparados aos controles (figura 4.17 B e D). Quando analisamos as células VLA-5⁺ e VLA-5⁻, observamos que as populações de timócitos de NOD apresentam menor expressão de S1P1, quando comparadas aos controles, embora essa diferença seja maior nas células VLA-5⁻ (figura 4.17 E e F).

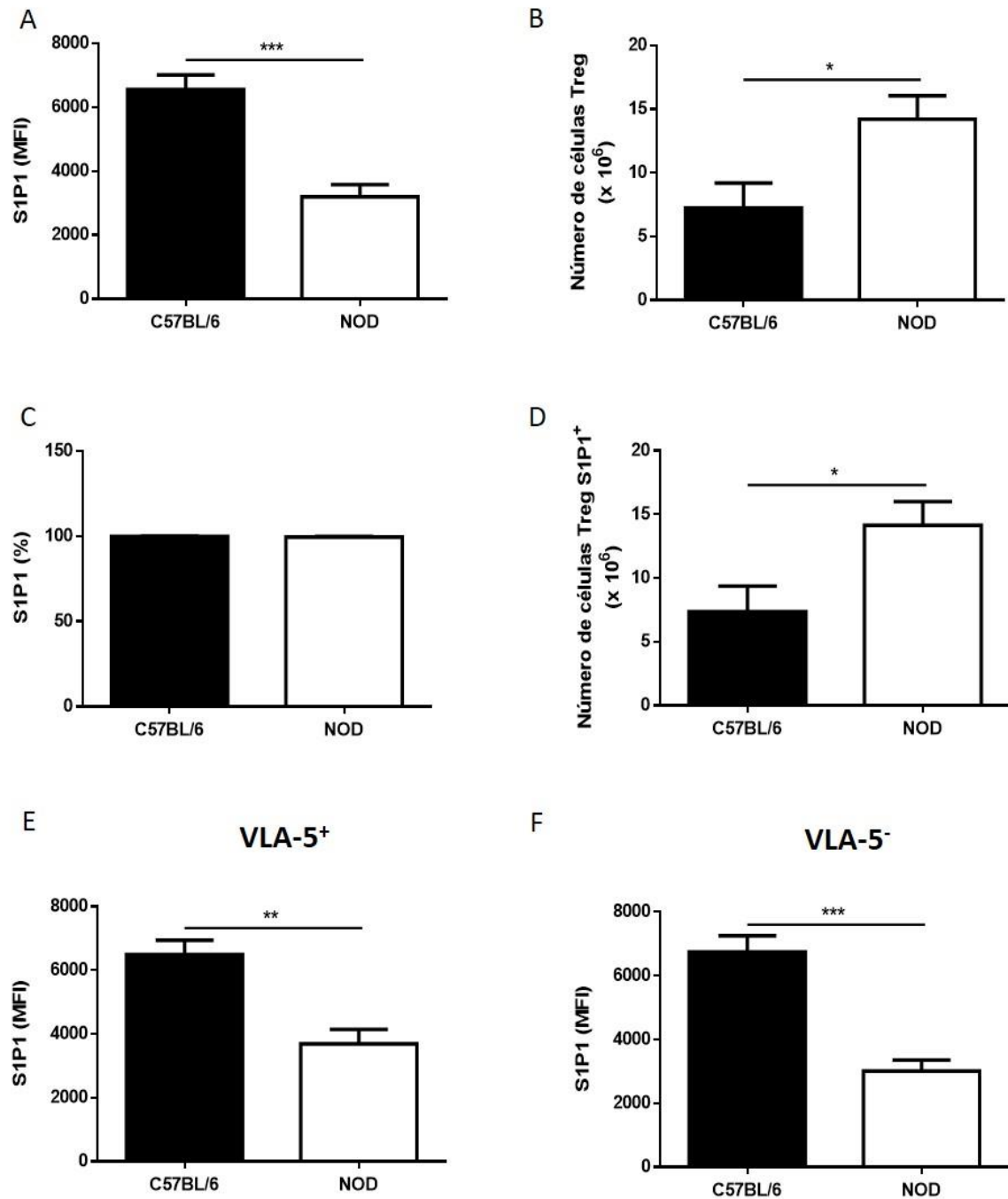


Figure 4.17 Expressão de S1P1 em células Treg SP CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de S1P1 nas células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ em camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo. (A) Densidade de expressão de S1P1 nas células Treg totais; (B) número de células Treg totais no timo; (C) expressão relativa de S1P1 em células Treg; (D) número absoluto de células Treg S1P1⁺; (E) densidade de expressão de S1P1 nos timócitos SP CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺CD49e⁺ e (F) densidade de expressão de S1P1 nas células CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺CD49e⁻. MFI = mediana da intensidade de fluorescência; % = expressão relativa. Os resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando **p < 0,01 ou ***p < 0,001. n = 6 C57BL/6; n = 6 NOD.

4.7 Efeito da ativação de S1P1 sobre a integrina VLA-5

Primeiramente, investigamos se a ativação de S1P1 através do seu ligante endógeno, S1P, é capaz de modular a expressão da integrina VLA-5 em timócitos de camundongos NOD. Para tal, estimulamos as células com diferentes concentrações de S1P e analisamos a expressão de VLA-5 através de citometria de fluxo. Como pode ser observado na figura 4.18 A-C, não houve mudança na densidade de expressão membranar de VLA-5 em nenhuma das populações celulares, dentro das condições experimentais e concentrações de S1P avaliadas. Posteriormente, analisamos se a S1P nas concentrações de 10 e 100 nM é capaz de modular a adesão celular à FN. Nós observamos que, ao contrário do que ocorre na adesão à poli-L-lisina, utilizada como controle, houve uma diminuição, embora não significativa, na adesão dos timócitos de camundongos C57BL/6 à FN. Essa diminuição não é observada em timócitos de camundongos NOD, que já apresentam menor adesão basal (figura 4.18 D e E). Essa menor adesão não se deu devido a diminuição na expressão de VLA-5, uma vez que nesse ensaio também não foi observada diferença na expressão da integrina, nem entre as células não aderentes e aderentes, nem entre as células tratadas ou não com S1P (figura 4.18 F).

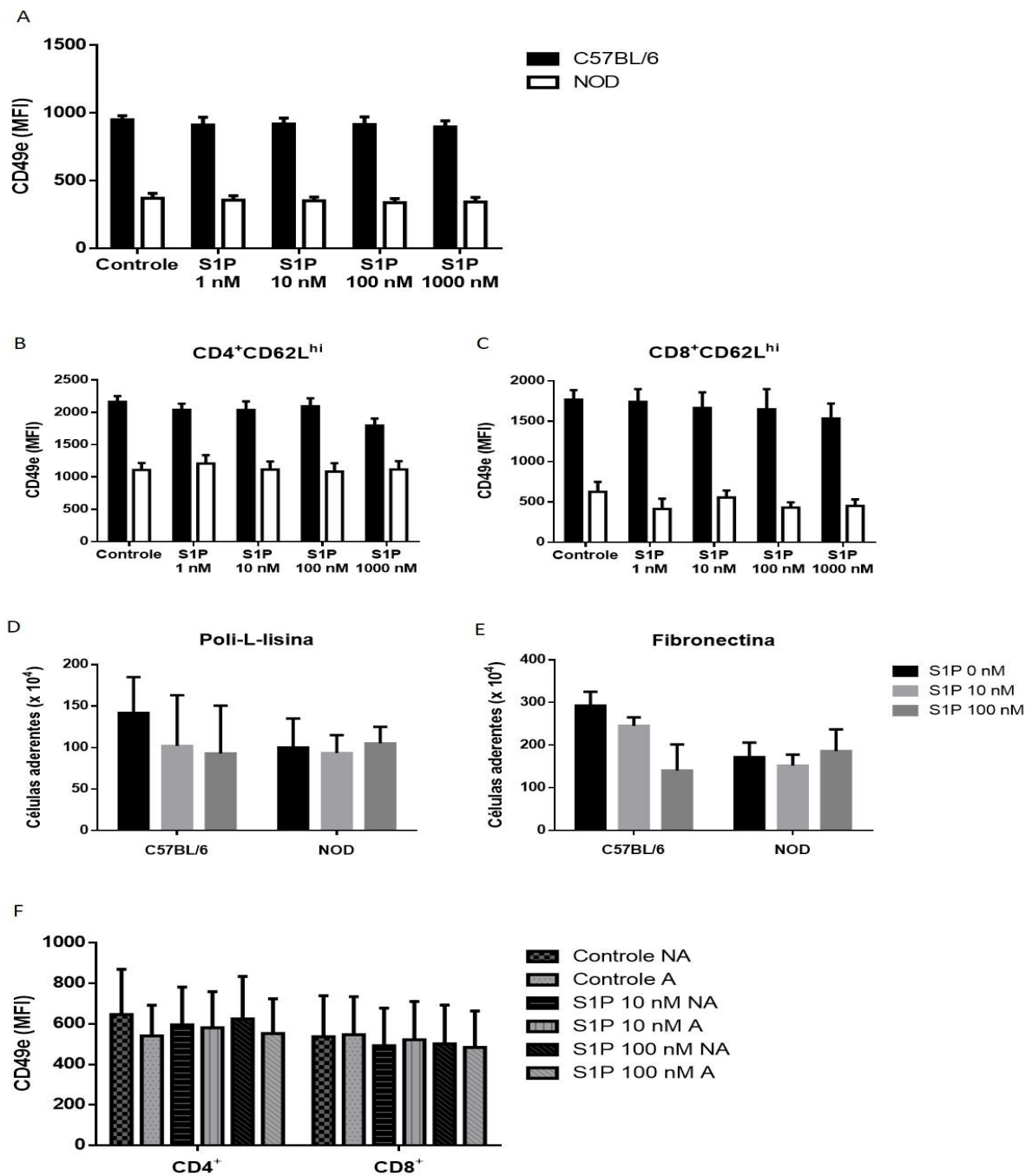


Figura 4.18 Efeito da ativação de S1P1 na expressão de VLA-5 e adesão celular à FN. Os gráficos (A-C) mostram a expressão de VLA-5, definida pela marcação de CD49e, nos timócitos de camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisada por citometria de fluxo, após estímulo com 1, 10, 100 e 1000 nM de S1P. (A) Expressão de VLA-5 em timócitos totais; (B) expressão de VLA-5 nas células SP CD4⁺CD62L^{hi}; (C) expressão de VLA-5 nas células SP CD8⁺CD62L^{hi}. Os gráficos em D e E mostram o número absoluto de células de camundongos C57BL/6 e NOD aderentes à poli-L-lisina (D) e FN (E) com estímulo de S1P nas concentrações de 10 e 100 nM; (F) densidade de expressão de VLA-5 nos timócitos não aderentes e aderentes de camundongos C57BL/6, estimulados ou não com S1P nas concentrações de 10 e 100 nM. MFI = mediana da intensidade de fluorescência; hi = em altas densidades; CD4⁺ = simples-positivo CD4⁺CD8⁻; CD8⁺ = simples-positivo = CD4⁻CD8⁺; NA = não aderente; A = aderente. Os resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. n = 3 C57BL/6; n = 3 NOD.

4.8 Expressão de S1P1 e VLA-5 nos linfonodos pancreáticos e pâncreas de camundongos NOD

Visto que tanto as células T convencionais quanto as células T reguladoras apresentam menor expressão de S1P1 e se encontram retidas no timo de camundongos NOD, nós avaliamos também a expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T na periferia do sistema imune, particularmente aquelas encontradas nos linfonodos pancreáticos (pLN), assim como no infiltrado inflamatório presente no pâncreas de camundongos NOD.

Nós não observamos diferença significativa na expressão de S1P1 quando comparamos a expressão relativa e a densidade de expressão do receptor entre os linfócitos de camundongos NOD e C57BL/6 (figura 4.19 A e B). No que diz respeito a expressão de VLA-5, nós observamos uma menor expressão relativa dessa integrina somente nas células T CD8⁺ de camundongos NOD, quando comparadas aos controles, enquanto não houve diferença na densidade de expressão do receptor em nenhuma das populações (figura 4.19 C e D). Ao contrário do que ocorre no timo, não houve diferença significativa na densidade de expressão de S1P1 nas populações de células T CD49e⁺ e CD49e⁻ dos pLN (figura 4.19 E e F).

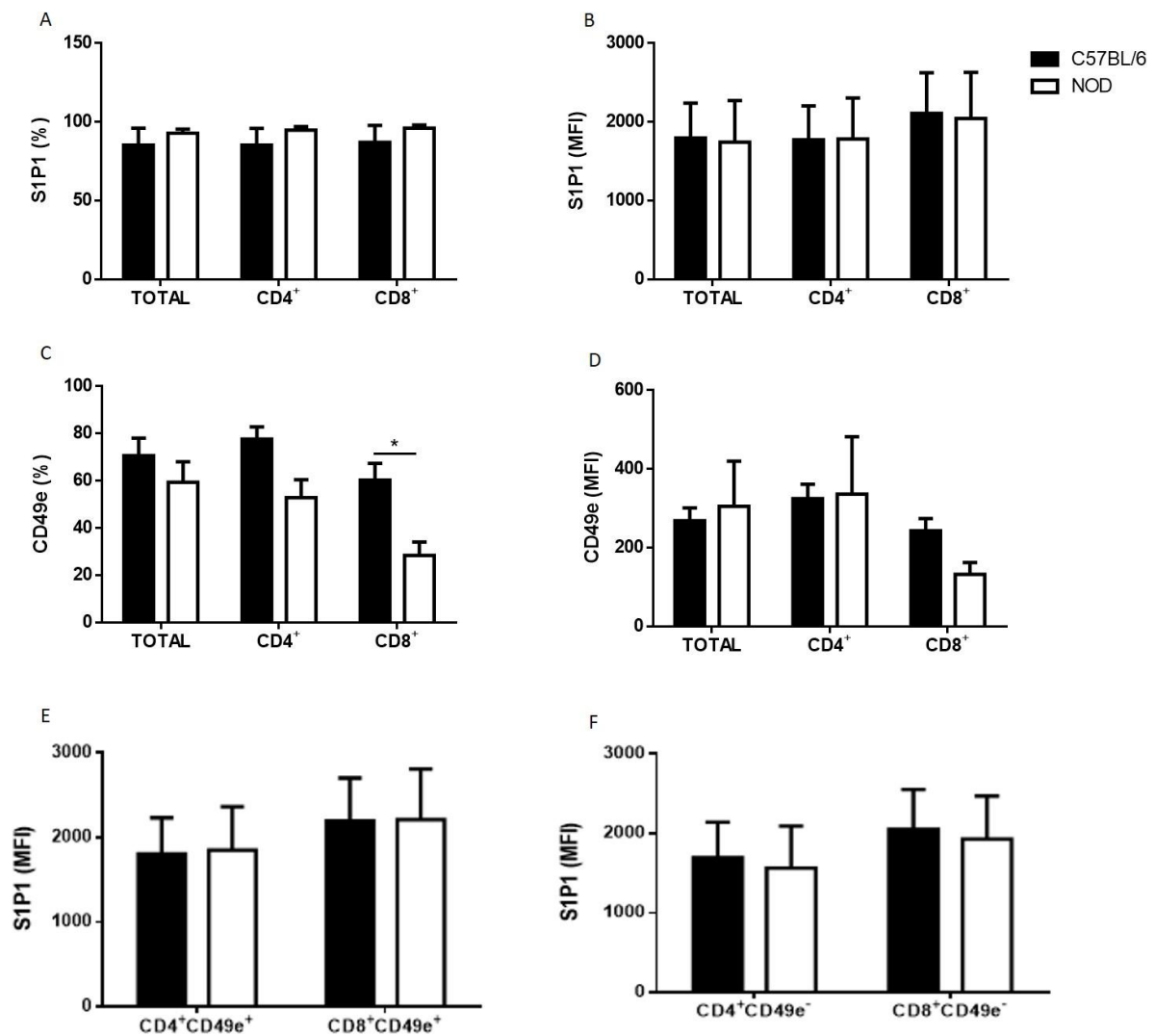


Figure 4.19 Expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T nos linfonodos pancreáticos de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T que se encontram nos linfonodos pancreáticos de camundongos C57BL/6 (barras pretas) e NOD (barras brancas), analisadas por citometria de fluxo. (A) expressão relativa de S1P1 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (B) densidade de expressão de S1P1 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (C) expressão relativa de VLA-5 (definida pela marcação de CD49e) no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (D) densidade de expressão da integrina VLA-5 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (E) expressão de S1P1 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ CD49e⁺ e (F) expressão de S1P1 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ CD49e⁻. MFI = mediana da intensidade de fluorescência; % = expressão relativa. Os resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando 2way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05. n = 9 C57BL/6; n = 12 NOD.

Quando analisamos o fenótipo das células que se encontram no infiltrado inflamatório no pâncreas de camundongos NOD, não observamos diferença significativa na expressão de S1P1 entre as diferentes populações avaliadas (figura 4.20 A, B, E e F), enquanto as células T CD8⁺ apresentam menor expressão de VLA-5 em comparação as células T totais (figura 4.20 C e D). Quando comparamos a expressão de S1P1 entre as células VLA-5⁺ e VLA-5⁻, nós

observamos uma discreta diminuição, ainda que não significativa na expressão de SIP1 pelas células VLA-5⁻ comparadas as células VLA-5⁺ (figura 4.20 G e H).

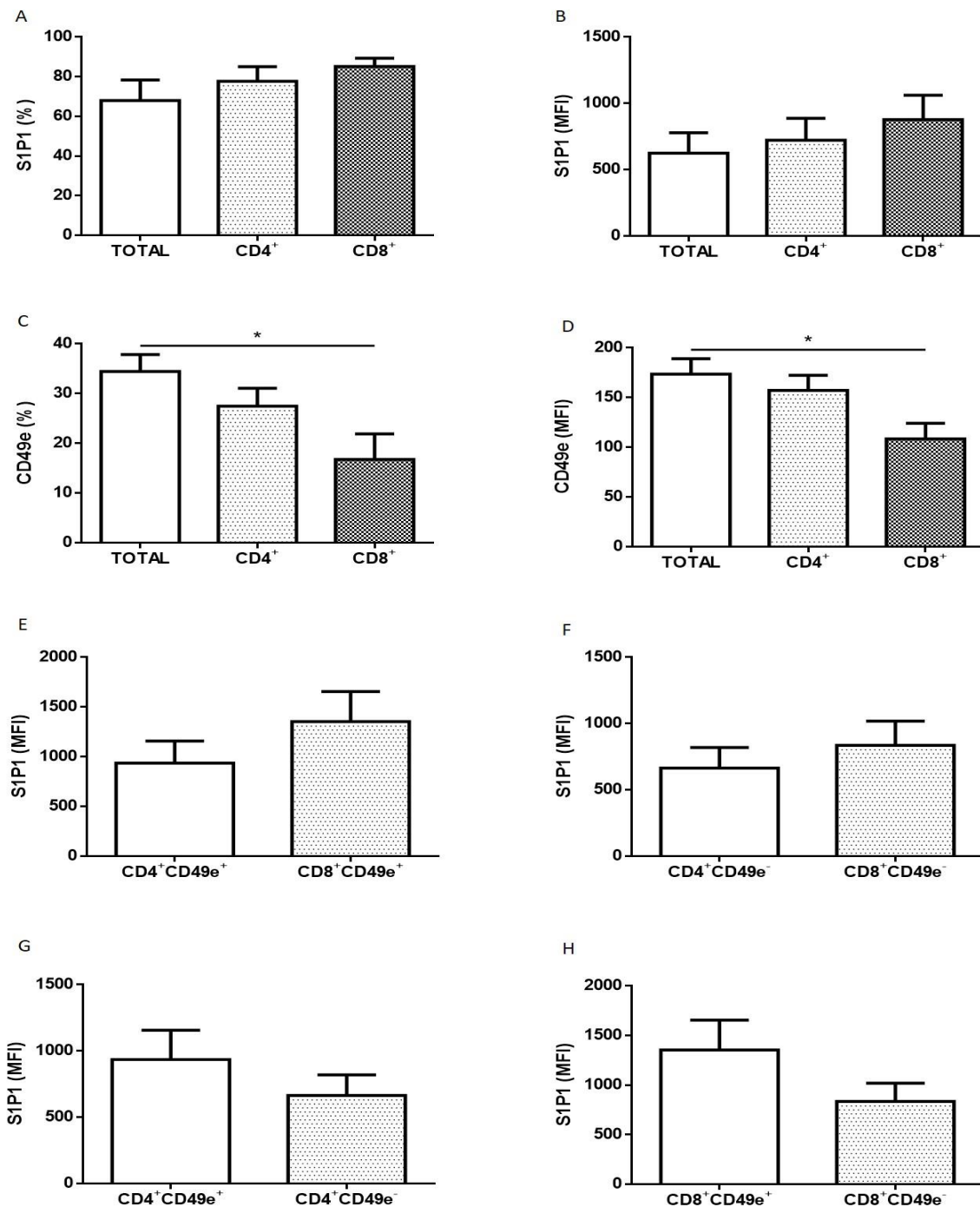


Figure 4.20 Expressão de S1P1 e VLA-5 nos linfócitos infiltrantes no pâncreas de camundongos NOD. Os gráficos mostram a expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T no pâncreas de camundongos NOD, analisadas por citometria de fluxo. (A) expressão relativa de S1P1 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (B) densidade de expressão de S1P1 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (C) expressão relativa de VLA-5 (definida pela marcação de CD49e) no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (D) densidade de expressão da integrina VLA-5 no total de células T e nas células CD4⁺ e CD8⁺; (E) expressão de S1P1 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ CD49e⁺ e (F) expressão de S1P1 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ CD49e⁻; (G) comparação da expressão de S1P1 nas células T CD4⁺ CD49e⁺ e CD49e⁻ e (H) comparação da expressão de S1P1 nas células T CD8⁺ CD49e⁺ e CD49e⁻. MFI = mediana da intensidade de fluorescência; % = expressão relativa. Os resultados são expressos como média ± EPM e foram analisados usando teste t de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p < 0,05. n = 12 NOD.

Juntos, esses resultados mostram que apesar do defeito de expressão de VLA-5 e SIP1 no timo de camundongos NOD, as células que conseguem deixar o órgão em direção a periferia, que chegam aos pLN e constituem o infiltrado inflamatório no pâncreas desses animais não apresentam diferenças significativas na densidade de expressão desses receptores.

5. DISCUSSÃO

A primeira parte do nosso trabalho envolveu a caracterização do DT1 na colônia de camundongos NOD utilizada, mantida no ICTB da Fiocruz. Nosso objetivo foi conhecer a fase de pré-diabetes, avaliar a incidência da doença e confirmar a faixa etária ideal a ser utilizada no nosso trabalho para posterior comparação com resultados previamente obtidos pelo nosso grupo com animais de outras colônias (Savino et al. 1991; Cotta-de-Almeida et al. 2004; Mendes-da-Cruz et al. 2008).

A incidência da doença em camundongos NOD é de cerca de 60-80 % das fêmeas com 30 semanas, enquanto nos machos esse índice é significativamente inferior, de 20 a 30 % (Anderson and Bluestone 2005). Porém, o desenvolvimento do DT1 em camundongos NOD é bem coreografado quando todos os fatores ambientais relevantes, como estado patogênico e dieta, são mantidos constantes e janelas de tempo específicas podem ser definidas em que um imunomodulador pode ser protetor ou destrutivo (Atkinson and Leiter 1999). A incidência da doença é maior quando os animais são mantidos em ambiente *germ-free*, reduzindo drasticamente quando estes são mantidos em condições não estéreis. A base desse efeito não é clara, mas parece refletir o ajuste fino do sistema imune que ocorre quando há exposição a proteínas exógenas e que protege o indivíduo de alergias, autoimunidade e outras doenças do sistema imune (Anderson and Bluestone 2005).

Na avaliação da taxa glicêmica na colônia de NOD utilizada neste trabalho, observamos que o índice de camundongos NOD fêmeas diabéticas, considerado a partir de 250 mg/dL, encontra-se satisfatório. Nessa avaliação, observamos também que, grande parte dos animais ficaram diabéticos a partir de 12 semanas de idade o que nos fez considerar a faixa etária de 9 a 12 semanas ideal a ser utilizada no nosso trabalho, caracterizando o estágio de pré-diabetes.

Em análises histológicas prévias de pâncreas de camundongos NOD, nós encontramos, como esperado, ilhotas de Langerhans em diferentes graus de infiltração. A doença se instala quando há destruição de aproximadamente 70 a 80 % das ilhotas, o que ocorre por volta de 12 a 14 semanas de idade, podendo variar dependendo das condições da colônia e do biotério (Pozzilli et al. 1993). Observamos então que os animais utilizados no nosso trabalho apresentam as características inerentes à linhagem, já que apresentam o infiltrado inflamatório no pâncreas que precede a doença, chegando a estágios avançados de destruição das células beta. Além disso, todos os timócitos de camundongos NOD utilizados no trabalho apresentavam menor expressão de VLA-5 quando comparados a timócitos de C57BL/6, característica que foi considerada inerente à linhagem.

A segunda parte do nosso trabalho envolveu o estudo da expressão e função de S1P1 e seu ligante fisiológico, S1P, no timo de camundongos NOD, visto que ambos estão envolvidos na migração e saída de células T do timo e que camundongos NOD apresentam distúrbios de migração que podem ser relevantes no contexto do DT1. Em camundongos NOD diabéticos, sabe-se que o tratamento com S1P reduz a adesão de monócitos ao endotélio, prevenindo o surgimento da aterosclerose, através da inibição de VCAM-1 (Whetzel et al. 2006b), e regula a ativação de células T na periferia, diminuindo a expressão de CD69 em linfócitos T CD4 (Srinivasan et al. 2008), porém pouco se sabe sobre o papel de S1P1 e seu ligante fisiológico, S1P, no timo desses animais, isto é, nos eventos que antecedem o aparecimento do DT1.

Diversos trabalhos demonstraram o papel do receptor S1P1 e seu ligante fisiológico, S1P, na saída de timócitos do timo e linfócitos T dos órgãos linfoides secundários. De fato, precursores de células T que não expressam o receptor são capazes de se diferenciar normalmente, mas não são capazes de sair do timo (Matloubian et al. 2004). Ainda, timócitos DP expressam menos S1P1 em relação a timócitos SP, indicando que, durante o processo de diferenciação no timo, a expressão de S1P1 aumenta e, dessa forma, timócitos maduros são capazes de emigrar para a corrente sanguínea em que a concentração de S1P é mais elevada (Allende et al. 2004). É importante ressaltar também que a diminuição da expressão do receptor, ou seu bloqueio com antagonistas sintéticos, é capaz de bloquear a migração dessas células e causar linfopenia (Tarrasón et al. 2011). Nós observamos que há um defeito na expressão e função de S1P1 no timo de camundongos NOD pré-diabéticos. Os timócitos de NOD apresentam menor expressão de S1P1 quando comparados com timócitos de camundongos C57BL/6 e essa diminuição é observada principalmente nas subpopulações SP CD4⁺ e CD8⁺, particularmente nas células mais maduras SP CD4⁺CD62L^{hi} e SP CD8⁺CD62L^{hi}, que, em condições normais, são aquelas que deveriam sair do órgão. Timócitos mais maduros expressam altos níveis dessa glicoproteína, que promove adesão dos timócitos ao endotélio e sua saída do timo para a periferia (Bunting et al. 2011). Essas células maduras também apresentam menor expressão de VLA-5, consistente com o acúmulo de timócitos maduros nos PVS gigantes (Savino et al. 1991; Cotta-de-Almeida et al. 2004; Mendes-da-Cruz et al. 2008). De forma interessante, nós observamos que a diminuição da expressão de S1P1 ocorre nas células maduras (SP CD4⁺CD62L^{hi} e CD8⁺CD62L^{hi}) CD49e⁻ de NOD, mas não nas células CD49e⁺; as principais diferenças foram observadas na densidade de expressão do receptor, avaliada pela mediana da intensidade de fluorescência. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão de S1P1 e da integrina VLA-5 possam estar de certa forma relacionadas, resultando no envolvimento de ambas as moléculas no acúmulo de timócitos maduros de NOD no timo. Da mesma forma, nós observamos menor expressão do receptor S1P1 em células Treg. Sabe-

se que essas células também apresentam defeito de expressão da integrina VLA-5 e se encontram retidas no timo de camundongos NOD (Mendes-da-Cruz et al. 2008). Nós observamos aumento significativo do número total de células Treg no timo de camundongos NOD e que tanto as células VLA-5⁻ quanto as células VLA-5⁺ têm menor expressão de S1P1, embora nessas últimas a diminuição seja menos significativa. Algumas colônias de camundongos NOD apresentam diminuição do número e repertório de células Treg na periferia e alguns trabalhos demonstraram que há um desbalanço entre o número de células T efectoras em relação a células reguladoras, sem prejuízo da função dessas células, responsável pelo desenvolvimento da autoimunidade, embora diminuição da frequência e da capacidade supressora de células Treg também já tenha sido observada em camundongos NOD e pacientes (Ferreira et al. 2014; Vesperas and Vignali 2016; Hull et al. 2017; Khamechian et al. 2018). É possível que ambas as células estejam seletivamente presas no timo de camundongos NOD, resultando na saída de ondas de clones autorreativos que escapam da regulação do sistema imune e promovem respostas autoimunes danosas na periferia. Diversos estudos buscam estratégias para aumentar tanto o número quanto a função de células Treg na tentativa de bloquear especificamente a atividade de células T efectoras. Essas estratégias incluem transferência adotiva de células Treg Foxp3⁺, manipulação de células Treg *in vivo*, indução de tolerância através de peptídeos tolerogênicos, entre outras, embora muitas estratégias apresentem resultados satisfatórios em modelo autoimune murino que não se reproduzem em pacientes (Reed and Herold 2015; Yu et al. 2017).

Sabe-se que a S1P é capaz de modular a expressão e localização de integrinas. Um estudo mostrou que o tratamento com S1P ativa a integrina $\alpha_v\beta_3$, induzindo a ligação das subunidades α e β , em células endoteliais (Wang et al. 2008a). Outro trabalho mostrou que o tratamento de células endoteliais com S1P é capaz de mudar a localização das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) da superfície apical da célula para a superfície basal, inibindo a adesão de monócitos (Aoki et al. 2007). É possível que a diminuição na expressão de S1P1 tenha efeito negativo na migração celular ao inibir a expressão ou localização de VLA-5, o que pode ter como consequência o acúmulo dos timócitos nos espaços perivasculares de NOD. Não sabemos, porém, o efeito da diminuição da expressão de VLA-5 nos timócitos de camundongos NOD sobre a expressão de S1P1. Sabe-se que as vias de sinalização de S1P1 e VLA-5 passam por algumas proteínas em comum, como AKT, PI3K, ERK1/2 e FAK, envolvidas tanto na regulação da expressão de integrinas como na migração celular (Chen et al. 2013b). Além disso, foi demonstrado que as interações S1P/ S1P1 aumentam a adesão de células de mieloma a FN, mediada por CXCL12 via VLA-4 (integrina $\alpha_4\beta_1$) e a migração transendotelial mediada por

VLA-4. Experimentos de sinalização intracelular com análise das principais vias ativadas por S1P1 e VLA-5 podem ajudar a responder essas questões.

Nós investigamos também a expressão do RNA mensageiro de S1P1 nos timócitos de camundongos NOD em comparação aos de C57BL/6. De forma curiosa, nós observamos que a expressão do RNAm de S1P1 é maior tanto em timócitos totais quanto em timócitos SP CD8⁺ de NOD. Esse resultado sugere que a diminuição do receptor ocorre somente a nível proteico, o que pode, por outro lado, levar a uma regulação transcricional positiva do gene do S1P1. Uma explicação pode ser a rápida dessensibilização de receptores acoplados a proteína G e a diminuição na expressão membranar desses receptores que podem ser observadas após exposição prolongada ao agonista (Pierce et al. 2002). Além disso, altas concentrações de S1P são capazes de induzir internalização, seguida de ubiquitinação e degradação de S1P1 (Lin Oo et al. 2007). Timócitos são altamente sensíveis a S1P e internalizam o receptor S1P1 após incubação com 1 nM desse lipídio (Schwab and Cyster 2007). Essa internalização em timócitos maduros pode impedir que timócitos maduros saiam do timo e o aumento da concentração de S1P na região medular (principalmente ao redor dos PVS), provocado pela inibição da enzima SGPL, por exemplo, pode levar a formação de PVS gigantes em animais normais (Maeda et al. 2013b). A enzima SGPL é predominantemente expressa na região medular do timo (Borowsky et al. 2012). Essa enzima participa do metabolismo da S1P e mantém sua concentração constantemente baixa nos tecidos ao degradar irreversivelmente a S1P a 2-hexadecenal e fosfoetanolamina (Saba and Hla 2004). No timo, essa enzima mantém a concentração de S1P baixa na região medular e ao redor dos vasos, permitindo que os timócitos maduros aumentem a expressão do receptor S1P1 e saiam do timo seguindo o gradiente de S1P que se encontra em maior concentração no sangue (Maeda et al. 2013b).

Nós não observamos, na nossa colônia, quebra no gradiente de S1P em camundongos NOD, quando comparamos sua concentração entre o timo e o soro, que foi também similar aos controles C57BL/6 (Lemos et al. 2018). No entanto, não podemos descartar a hipótese de que haja desregulação da concentração de S1P no microambiente tímico de camundongos NOD, como um aumento ao redor e dentro dos PVS gigantes. É possível que, assim como ocorre com diversas integrinas, como CXCL12 (Mendes-da-Cruz et al. 2008), haja uma colocalização e adesão de S1P a proteínas de matriz extracelular.

Camundongos NOD têm aumento de depósitos de matriz extracelular no timo, em especial no interior dos PVS gigantes, que, por sua vez, pode auxiliar no aumento da concentração de S1P ao redor dos vasos. O aumento da concentração de S1P pode levar a diminuição da expressão de S1P1 nas células CD49e⁻ que se mantêm por longos períodos nessas estruturas. Nós observamos menor expressão de SGPL1 nos timócitos maduros SP

CD8⁺CD62L⁺ de NOD, comparados aos controles. Diminuição da expressão ou inibição dessa enzima causa linfopenia através da quebra dos gradientes de S1P no timo (Schwab et al, 2005). Embora as DCs presentes nas regiões medular e córtico-medular pareçam ser as principais responsáveis pelos baixos níveis de S1P, a diminuição da expressão de SGPL1 em timócitos também foi relacionada ao aumento da concentração de S1P no timo e no plasma, diminuição da expressão de S1P1 na superfície de timócitos maduros SP e sua retenção no timo (Zamora-Pineda et al. 2016b). No entanto, outros eventos que envolvam regulação pós-transcricional da expressão do receptor não podem ser descartadas. Outra hipótese a ser investigada é a presença de microRNAs (miRNAs) que tenham o S1P1 como alvo e possam levar a mudanças pós-transcricionais na expressão desse receptor. Foi demonstrado que o aumento da concentração intra e extracelular de S1P através do *knockdown* da enzima SGPL em linhagem celular murina de mioblastos, levou a diminuição de miRNAs miogênicos e bloqueio da diferenciação em miotubos (De La Garza-Rodea et al. 2014). Ainda, o S1P1 foi apontado como um dos alvos do miRNA-148a em células de carcinoma hepático de pacientes, em que teve aumento da expressão, após desregulação da expressão de miRNA-148a (Heo et al. 2014). A expressão de miRNAs que regulam a expressão de S1P1 no timo não é conhecida. É possível que haja uma alteração na expressão desses reguladores em timócitos de camundongos NOD que levem aos distúrbios de expressão do receptor já mencionados.

Nós observamos também que a menor expressão de S1P1 se correlaciona com uma menor resposta migratória dos timócitos de NOD frente a S1P. A migração mediada por S1P das células SP CD62L^{hi}CD49^{e-} de NOD foi menor que a observada nos controles, embora a migração dos timócitos maduros SP CD62L^{hi}CD49^{e+} tenha sido maior frente as mesmas concentrações de S1P. Os timócitos maduros CD49^{e-} migraram mais frente a S1P que as células maduras CD49^{e+}, em C57BL/6, mas não em NOD. Nesse caso, as células CD49^{e+} foram mais responsivas, sugerindo que a expressão de VLA-5 pode influenciar as respostas quimiotáticas a S1P no timo de NOD de forma diferente. Observamos ainda uma menor capacidade migratória das células SP CD4⁺ e CD8⁺ CD62L^{hi}CD49^{e+} de camundongos C57BL/6 frente a 10 nM de S1P após o bloqueio de CD49e, sugerindo que essa integrina possa regular indiretamente a migração de timócitos induzida por S1P. Por outro lado, a inibição da migração foi observada somente nas células SP CD8⁺CD62L^{hi}CD49^{e+} de NOD, sugerindo que nas células SP CD4⁺CD62L^{hi}CD49^{e+} outras moléculas possam estar envolvidas. Respostas migratórias distintas entre timócitos SP CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos NOD já foram descritas, por exemplo, para LM. Nesse caso, a expressão do receptor de LM, VLA-6, está aumentada tanto nas células SP CD4⁺ quanto CD8⁺, mas a resposta migratória está aumentada somente nas células SP CD4⁺ (Mendes-da-Cruz et al. 2008). Além disso, nosso grupo mostrou que a S1P

induz quimiotaxia e quimiocinese de blastos de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) a 100 nM. Porém, altas concentrações de S1P (1000, 5000 e 10000 nM) induzem fugotaxia (ou quimiorepulsão) dessas células (Messias et al. 2016). Logo, é aceitável que diferentes subpopulações de timócitos tenham diferentes comportamentos migratórios sob estímulo de S1P, dependendo da concentração e da expressão do receptor e que a expressão de VLA-5 possa influenciar diferencialmente a resposta celular nessas condições. Além disso, nós não podemos descartar a participação de outras interações, uma vez que a sinalização via S1P/S1P1 pode alterar a resposta celular a outras moléculas, além da ativação de integrinas e resposta a quimiocinas, como já mencionado. Juntos, esses resultados mostram que os defeitos de expressão e migração dos timócitos de NOD são parte de um mecanismo complexo que envolve hipo e hiper responsividade a certos estímulos, o que está de acordo com o modelo de migração intratímica multivetorial de células T proposto pelo nosso grupo (Mendes-da-Cruz et al, 2008), em que a direção e velocidade da migração de timócitos resulta do balanço das interações mediadas por diferentes vetores individuais, como proteínas de ECM, citocinas e quimiocinas. As alterações vistas nos timócitos de camundongos NOD alteram o vetor resultante e o movimento dos timócitos no timo, modificando o comportamento migratório como um todo.

A concentração de S1P no sangue é elevada (entre 0,1 μ M e 1 μ M, em camundongos) (Yatomi et al. 2001). Apesar das concentrações utilizadas nos nossos ensaios de transmigração celular serem baixas, vale ressaltar que nossos experimentos foram realizados *ex vivo* com S1P purificada, sem a influência de nenhum outro fator. Além disso, o gradiente de S1P gerado *in vivo* entre os tecidos linfoides e o sangue é separado pelo endotélio. Dessa forma, também seria interessante realizar experimentos de migração transendotelial para mimetizar o processo de saída das células T do timo *in vivo*, além de aumentar a curva de migração até concentrações mais elevadas de S1P.

Posteriormente, analisamos se o estímulo e ativação do receptor S1P1 é capaz de modular a expressão da integrina VLA-5, bem como a adesão celular frente ao seu ligante, FN. Nós não observamos, em ambos, C57BL/6 ou NOD, diferença na expressão de VLA-5 após estímulo com nenhuma das concentrações de S1P utilizadas. Por outro lado, parece haver uma diminuição na adesão dos timócitos de C57BL/6 após o estímulo com S1P. Isso ocorre na adesão à FN e não à poli-L-lisina, que foi utilizada como controle. Essa diminuição também não foi observada em timócitos de camundongos NOD que, como esperado, apresentaram menor capacidade de adesão basal à FN (Cotta-de-Almeida et al. 2004). Uma hipótese é de que, embora não seja observada mudança na expressão da integrina após estímulo com S1P, nas condições avaliadas, possa haver alteração no perfil de ativação de VLA-5. Diferentes estados

de ativação já foram descritos para integrinas, como VLA-4, por exemplo, promovendo diferente avidéz a FN (Crisa et al. 1996a). Foi demonstrado que células DP aderentes e não aderentes apresentam a mesma densidade de expressão de VLA-4 e que a modulação funcional da integrina é capaz de determinar a diferença entre adesão firme ou maior capacidade migratória frente a FN. A adesão e migração celulares dependem tanto do padrão de expressão do receptor quanto da concentração do ligante e do estado de ativação do receptor, que inclui alterações na afinidade do receptor por mecanismos intracelulares "*Inside-Out*" (Stuiver and O'Toole 1995; Crisa et al. 1996a). É possível que, apesar de não alterar a expressão de VLA-5, a ativação de S1P1 seja capaz de modular sua função modificando seu estado de ativação. Dessa forma, experimentos de sinalização celular, em que sejam avaliadas as principais vias relacionadas à ativação de VLA-5 e sua comparação com ou sem estímulo do receptor S1P1 através de S1P, podem ajudar a elucidar essa questão. Não se pode descartar ainda, a participação da integrina VLA-4 no processo de adesão celular à FN. No timo, a adesão e migração de timócitos frente à FN depende da cooperação de ambos os receptores, VLA-4 e VLA-5. A modulação funcional de VLA-4 permite que células DP que ainda não passaram pelos processos de seleção sejam mais estacionárias através da adesão firme à FN, enquanto as células que sobrevivem aos processos de seleção são capazes de migrar do córtex para a medula (Salomon et al. 1994; Crisa et al. 1996a). A mudança no perfil de ativação de VLA-4, juntamente com a maior abundância da isoforma de FN contendo a sequência LDV na região medular, comparada a região cortical, e o aumento da expressão de VLA-5 nas células SP, permite o aumento da capacidade migratória dos timócitos mais maduros (Rothenberg 1992; Salomon et al. 1994; Crisa et al. 1996a). Logo, a análise da expressão e perfil de ativação de VLA-4, bem como ensaios de quimiotaxia em câmaras 2D, que permitam comparar a capacidade de adesão x migração dos timócitos de camundongos NOD frente à FN, podem ser de grande utilidade no futuro. Outra hipótese que não pode ser descartada é de que haja uma modulação na localização celular da integrina. Foi demonstrado que o pré-tratamento de células endoteliais com S1P leva a mudança da localização de VLA-5 da superfície apical da célula para a superfície basal sem mudança na sua expressão total. A mudança na localização da integrina foi dependente de S1P1 e suficiente para diminuir a capacidade de adesão dos monócitos às células endoteliais mediada por VLA-5 (Aoki et al. 2007). Experimentos de microscopia confocal que permitem analisar mudanças na localização celular da integrina antes e após estímulo de S1P podem ser de grande importância para avaliar essa hipótese.

Finalmente, na última etapa do nosso trabalho, nós avaliamos a expressão de S1P1 e VLA-5 nas células T nos pLN e pâncreas de camundongos NOD, ou seja, nas células que conseguiram sair do timo em direção a periferia, alcançaram os linfonodos de drenagem do

pâncreas e, possivelmente, foram ativadas e migraram, constituindo o infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans que leva a destruição das células beta. Nós não observamos diferenças significativas tanto na frequência quanto na densidade de expressão de S1P1 nas células SP CD4⁺ e CD8⁺ nos pLN, quando comparadas com C57BL/6. Quanto a expressão de VLA-5, nós observamos diminuição no percentual de células SP CD8⁺ que expressam a integrina, porém não observamos diferença na densidade de expressão do receptor em nenhuma das populações avaliadas. Curiosamente, ao contrário do que é observado no timo, não houve mudança no perfil de expressão de S1P1 dentre as células SP CD4⁺ e CD8⁺ VLA-5⁺ e VLA-5⁻. Da mesma forma, não observamos diferença significativa na expressão de S1P1 nas células VLA-5⁻ e VLA-5⁺ que infiltram o pâncreas de camundongos NOD, embora uma discreta diminuição tenha sido observada. Esses resultados são interessantes ao demonstrar que as células que são capazes de sair do timo e se encontram na periferia apresentam níveis semelhantes de expressão tanto do receptor S1P1 quanto da integrina VLA-5, ou conseguem modular positivamente a expressão desses receptores na periferia, o que sugere que as alterações de expressão de S1P1 nas células de camundongos NOD se dão no timo, na fase de desenvolvimento celular, como parte do contexto de diversas alterações já descritas, em um complexo microambiente com papel essencial na formação do repertório, determinação e controle da resposta imune periférica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Camundongos NOD apresentam diversos distúrbios de migração celular intratímica que podem ser de grande relevância no contexto da patogênese do DT1, dada a conhecida importância do timo e das células T nesse processo. Nesse modelo, ocorre a migração dos precursores do timo e exportação de células T maduras em menor quantidade, assim como de células Treg, células essenciais no controle de doenças autoimunes. Essas células chegam nos pLNs e as células T autorreativas são ativadas por DCs e infiltram o pâncreas, destruindo as células beta pancreáticas. Nesse contexto, a relevância do nosso estudo se dá em entender os distúrbios de migração celular no timo, que podem levar a essa mudança de repertório celular na periferia, que tem como consequência o desenvolvimento do DT1, através de dois receptores essenciais no processo de desenvolvimento de células T, o VLA-5 e o S1P1, que estão alterados em NOD.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados reforçam a nossa hipótese sobre a existência de importante desregulação no processo migratório de timócitos em camundongos NOD, em que defeitos concomitantes na expressão de VLA-5 e S1P1, receptores essenciais no processo de migração celular, parecem exercer um papel central. Assim, estudos futuros sobre as interações entre esses receptores poderão desvendar mecanismos de regulação do processo de desenvolvimento e saída de células T no timo e seu efeito na periferia, contribuindo para um melhor entendimento do processo diabetogênico, apontando para potenciais alvos moleculares de intervenção terapêutica (figura 6.1).

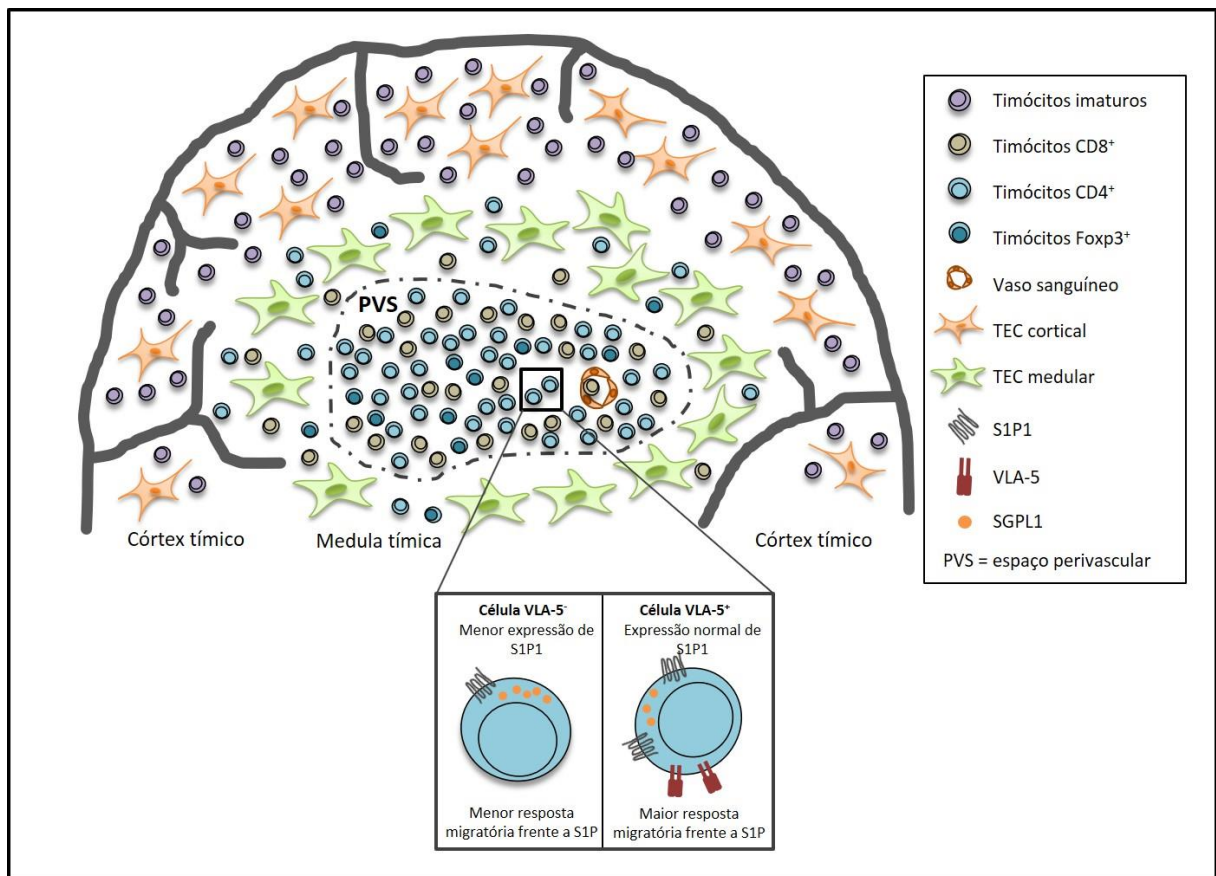


Figura 6.1 O receptor S1P1 e a integrina VLA-5 nos distúrbios de migração intratímica de camundongos NOD. O receptor S1P1 aparece como mais um importante vetor no modelo de migração multivetorial intratímica de timócitos, tendo papel essencial na saída dessas células do timo. Em camundongos NOD, o S1P1 encontra-se com expressão reduzida assim como a integrina VLA-5, duas moléculas essenciais no processo de migração celular, que parecem ser de grande importância nos distúrbios migratórios observados nesses animais. É possível que haja uma correlação entre a expressão e função dos dois receptores e um efeito da modulação de um sobre o outro, capaz de determinar a migração celular resultante e acúmulo das células maduras no interior dos espaços perivascular. Células VLA-5⁻, que se encontram retidas nesses espaços, têm menor expressão de S1P1 e menor capacidade migratória frente a S1P, enquanto células VLA-5⁺, que conseguem sair do timo, apresentam expressão de S1P1 normal e maior capacidade migratória frente a S1P (adaptado de Lemos et al. 2018).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 8^a edition I. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 2017. Available from: file:///C:/Users/Cecilia Torqueti/Downloads/IDF_DA_8e-EN-final (1).pdf
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15396–401.
- Anada Y, Igarashi Y, Kihara A. The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets. *Eur J Pharmacol*. 2007;568(1–3):106–11.
- Anderson G, Anderson KL, Jenkinson EJ. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+CD44+stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur J Immunol*. 1997;27:1200–6.
- Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1996;14:73–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717508>
- Anderson MS, Bluestone JA. The NOD Mouse : A Model of Immune Dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447–85.
- Anelli V, Gault CR, Snider AJ, Obeid LM. Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis *in vitro*. *FASEB J* [Internet]. 2010;24(8):2727–38. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.09-150540>
- Aoki S, Yatomi Y, Shimosawa T, Yamashita H, Kitayama J, Tsuno NH, et al. The suppressive effect of sphingosine 1-phosphate on monocyte-endothelium adhesion may be mediated by the rearrangement of the endothelial integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$. *J Thromb Haemost*. 2007;5(6):1292–301.
- Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. A Role of CXC Chemokine Ligand 12/Stromal Cell-Derived Factor-1/Pre-B Cell Growth Stimulating Factor and Its Receptor CXCR4 in Fetal and Adult T Cell Development in Vivo. *J Immunol* [Internet]. 2003;170(9):4649–55. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.9.4649>
- Atkinson M, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? *Nat Med*. 1999;5(6):601–4.
- Bach J-F, Chatenoud L, Herbelin A, Gombert JM, Carnaud C. Autoimmune diabetes t how

- many steps for one disease? 70th Forum Immunol. 1997;2387–93.
- Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev.* 1994;15(4):516–42.
- Bai A, Hu H, Yeung M, Chen J. Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. *J Immunol.* 2007;178(12):7632–9.
- Bankovich AJ, Shiow LR, Cyster JG. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22328–37.
- Barczyk M, Carracedo S, Donald G. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010;339:269–80.
- Baron M, Norman D, Willis A, Campbell ID. Structure of the fibronectin type 1 module. *Nature.* 1990;345(6276):642–6.
- Bearman RM, Bensch KG, Levine GD. The Normal Human Thymic Vasculature : An Ultrastructural Study '. *Anat Rec.* 1975;183:485–98.
- Berrih S, Savino W, Cohen S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem [Internet].* 1985;33(7):655–64. Available from: <http://jhc.sagepub.com/content/33/7/655.abstract>
- Bettini M, Vignali DAA. T cell-driven initiation and propagation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol [Internet].* 2011;23(6):754–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2011.10.002>
- Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, Liu C, Steven L, Kono M, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature.* 2015;523(7560):342–6.
- Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 2014;55.
- Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol.* 2000;30(12):3371–9.
- Bode C, Gräler MH. Immune regulation by sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60(1):3–12.
- Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, et al. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem.*

2010;109(6):1232–43.

- Borowsky AD, Bandhuvula P, Kumar A, Yoshinaga Y, Nefedov M, Fong LG, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues. *J Lipid Res.* 2012;53.
- Boyd RL, Hugo P. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today.* 1991;12(2).
- Brimnes MK, Jensen T, Jørgensen TN, Michelsen BK, Troelsen J, Werdelin O. Low expression of insulin in the thymus of non-obese diabetic mice. *J Autoimmun* [Internet]. 2002;19:203–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473241>
- Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2007;115:84–105.
- Bunting MD, Comerford I, McColl SR. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):185–96.
- Campbell JJ, Pan J, Butcher EC. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* [Internet]. 1999;163(5):2353–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/v163n5/2353/2353-abs-frame.html>
- Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich M a, Walsh ER, et al. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature.* 2006;442(7100):299–302.
- Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(8):666–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1887>
- Chae S, Paik J, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1–phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest.* 2004;114(8).
- Chang AC, Wadsworth S, Coligan JE. Expression of merosin in the thymus and its interaction with thymocytes. *J Immunol.* 1993;151:1789–801.
- Charlton B, Taylor-Edwards C, Tisch R, Fathman CG. Prevention of diabetes and insulinitis by neonatal intrathymic islet administration in NOD mice. Vol. 7, *Journal of Autoimmunity.* 1994. p. 549–60.
- Chen J, Fong Y, Tang C. Novel Strategies for the Treatment of Chondrosarcomas : Targeting Integrins. 2013a;2013.
- Chen JC, Fong YC, Tang CH. Novel strategies for the treatment of chondrosarcomas:

Targeting integrins. *Biomed Res Int*. 2013b;2013:11.

Chen W, Bergerot I, Elliott JF, Harrison LC, Abiru N, Eisenbarth GS, et al. Evidence That a Peptide Spanning the B-C Junction of Proinsulin Is an Early Autoantigen Epitope in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *J Immunol* [Internet]. 2001;167(9):4926–35. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.9.4926>

Christensen PM, Bosteen MH, Hajny S, Nielsen LB, Christoffersen C. Apolipoprotein M mediates sphingosine-1-phosphate efflux from erythrocytes /631/45/287/1191 /631/45/287/1196 /692/4017 /13/1 /82/83 /82/16 /96/106 article. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15043-y>

Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnstrom J, Sevvana M, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011;108(23):9613–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103187108>

Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXVIII . Lysophospholipid. *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):579–87.

Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns a, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* [Internet]. 2005;54 Suppl 2(6):S97-107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306347>

Colomb E, Savino W, Wicker L, Peterson L, Dardenne M, Carnaud C. Genetic control of giant perivascular space formation in the thymus of NOD mice. *Diabetes*. 1996;45(11):1535–40.

Cotta-de-Almeida V, Serra Villa-Verde DM, Lepault F, Pléau J-M, Dardenne M, Savino W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: A fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol*. 2004;34(6):1578–87.

Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med*. 1996a;184(1):215–28.

Crisa L, Cirulli V, Ellismanfi MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. Cell Adhesion and Migration Are Regulated at Distinct Stages of Thymic T Cell Development : The Roles of Fibronectin, VLA4, and VLA5. *J Exp Med*. 1996b;184(July).

Cuvillier O. Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate. *médecine/sciences*. 2012;28:951–7

- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Goso OA, Gutkind JS, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996;381(27):800–3.
- Dardenne M, Lepault F, Bendelac A, Bach J-F. Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. *Eur J Immunol*. 1989;19(5):889–95.
- Davalos-Misslitz ACM, Worbs T, Willenzon S, Bernhardt G, Förster R. Impaired responsiveness to T-cell receptor stimulation and defective negative selection of thymocytes in CCR7-deficient mice. *Blood*. 2007;110(13):4351–9.
- Don AS, Lim XY, Couttas TA. Re-Configuration of Sphingolipid Metabolism by Oncogenic Transformation. *Biomolecules*. 2014;4(1):315–53.
- Drennan MB, Elewaut D, Hogquist KA. Thymic emigration: Sphingosine-1-phosphate receptor-1-dependent models and beyond. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):925–30.
- Eken A, Duhon R, Singh AK, Fry M, Buckner JH, Kita M, et al. S1P1 deletion differentially affects TH17 and Regulatory T cells. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(1):12905. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13376-2>
- Ferreira C, Palmer D, Blake K, Garden OA, Dyson J. Reduced Regulatory T Cell Diversity in NOD Mice Is Linked to Early Events in the Thymus. *J Immunol [Internet]*. 2014;192(9):4145–52. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1301600>
- Frej C, Mendez AJ, Ruiz M, Castillo M, Hughes TA, Dahlbäck B, et al. A Shift in ApoM / S1P Between HDL-Particles in Women With Type 1 Diabetes Mellitus Is Associated With Impaired Anti-Inflammatory Effects of the ApoM / S1P Complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;1–13.
- Fujita T, Yui R, Kusumoto Y, Serizawa Y, Makino S, Tochino Y. Lymphocytic insulinitis in a ‘non-obese diabetic (NOD)’ strain of mice: an immunohistochemical and electron microscope investigation. *Biomed Res*. 1982;3(4).
- Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, et al. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(4):21–8.
- Galvani S, Sanson M, Blaho VA, Swendeman SL, Conger H, Dahlbäck B, et al. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Sci Signal*. 2016;8(389):1–26.

- Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhes Migr*. 2010;4(3):382–90.
- Gao M, Liu Y, Xiao Y, Han G, Jia L, Wang L, et al. Prolonging survival of corneal transplantation by selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist. *PLoS One*. 2014;9(9):1–9.
- García-Bernal D, Redondo-Muñoz J, Dios-Esponera A, Chèvre R, Bailón E, Garayoa M, et al. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Jounal Pathol*. 2013;36–48.
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest [Internet]*. 2001 Sep [cited 2016 Jan 30];108(5):689–701. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=209379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Garris CS, Wu L, Acharya S, Arac A, Blaho VA, Huang Y, et al. Defective sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1166–72.
- Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):309–22.
- Geutskens SB, Mendes-da-Cruz DA, Dardenne M, Savino W. Fibronectin receptor defects in NOD mouse leucocytes: Possible consequences for type 1 diabetes. *Scand J Immunol*. 2004;60(1):30–8.
- Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*. 1993;150:4244–52.
- Goetzl EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J*. 1998;12(15):1589–98.
- Gonzalez-cabrera PJ, Hla T, Rosen H. Mapping Pathways Downstream of Sphingosine 1-Phosphate Subtype 1 by Differential Chemical Perturbation. 2007;282(10):7254–64.
- Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM V, Kast J, et al. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-

- selectin/CCL25. *J Exp Med*. 2009;206(4):761–78.
- Graeler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J* [Internet]. 2002;16(14):1874–8. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.02-0548com>
- Graeler M, Shankar G, Goetzl EJ. Cutting Edge: Suppression of T Cell Chemotaxis by Sphingosine 1-Phosphate. *J Immunol*. 2002;1–5.
- Graler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptors. *FASEB J* [Internet]. 2004;18(10):2079–81. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0910fje>
- Grigorova IL, Panteleev M, Cyster JG. Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *J Exp Med*. 2010;207(4):477–87.
- Guyton AC, Hall JE. *Guyton & Hall - Tratado de Fisiología Médica*. Elsevier. Vol. 12^a edición. 2011.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Feb [cited 2015 Jun 16];9(2):139–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216770>
- Heo MJ, Kim YM, Koo JH, Yang YM, An J, Lee S-K, et al. microRNA-148a dysregulation discriminates poor prognosis of hepatocellular carcinoma in association with USP4 overexpression. *Oncotarget* [Internet]. 2014;5(9):2792–806. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/1920>
- Hisano Y, Kobayashi N, Kawahara A, Yamaguchi A, Nishi T. The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *J Biol Chem*. 2011;286(3):1758–66.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 functions as a Sphingosine-1-Phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2012a;7(6):e37811.
- Hisano Y, Nishi T, Kawahara A. The functional roles of S1P in immunity. *J Biochem*. 2012b;152(4):305–11.
- Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia* [Internet]. 2017; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-017-4377-1>
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. INTEGRIN LIGANDS. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 19):3901–3.

- Humphries MJ. Integrin Structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;28.
- Hunt III SW, Harris ES, Sirid-Aimée K, Shimizu Y. T-lymphocyte interactions with endothelium and extracellular matrix. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(1):59–86.
- Hynes RO. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 2002;110(Table 1):673–87.
- Hynes RO. The emergence of integrins : a personal and historical perspective. *Matrix Biol.* 2004;23(6):333–40.
- Hyöty H. Environmental causes: Viral causes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33(1):27–44.
- Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, et al. CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol [Internet].* 2012;180(1):199–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.027>
- Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, Agace WW, Takahama Y, Jenkinson EJ, et al. Chemokine receptor expression defines heterogeneity in the earliest thymic migrants. *Eur J Immunol.* 2007;37(8):2090–6.
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(11):531–64.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 12^a. Koogan G, editor. 2013.
- Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter Spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science (80-).* 2009;323(5913):524–7.
- Khamechian T, Irandoust B, Mohammadi H, Nikoueinejad H, Akbari H. Association of Regulatory T Cells with Diabetes Type-1 and Its Renal and Vascular Complications Based on the Expression of Forkhead Box Protein P3 (FoxP3), Helios and Neurophilin-1. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2018;17(2):151–7.
- Kim CH, Pelus LM, White JR, Broxmeyer HE. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood.* 1998;91(12):4434–43.
- Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2008;7(7):550–7.
- Kobayashi N, Kawasaki-Nishi S, Otsuka M, Hisano Y, Yamaguchi A, Nishi T. MFSD2B is a sphingosine 1-phosphate transporter in erythroid cells. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–

11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23300-x>
- Kohno T, Matsuyuki H, Inagaki Y, Igarashi Y. Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/S1P4-expressing cells. *Genes to cells devoted to Mol Cell Mech* [Internet]. 2003 Aug [cited 2016 Jan 29];8(8):685–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875654>
- Krueger A, Willenzon S, Łyszkiewicz M, Kremmer E, Fo R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Thymus*. 2010;115(10):1906–12.
- Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev*. 1997;11(22):2996–3006.
- Kutleša S, Siler U, Speiser A, Wessels JT, Virtanen I, Rousselle P, et al. Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. *Immunology*. 2002;105(4):407–18.
- De La Garza-Rodea AS, Baldwin DM, Oskouian B, Place RF, Bandhuvula P, Kumar A, et al. Sphingosine phosphate lyase regulates myogenic differentiation via S1P receptor-mediated effects on myogenic microRNA expression. *FASEB J*. 2014;28(1):506–19.
- Lannes-Vieira J, Dardenne M, Savino W. Extracellular Matrix Componentes of the Mouse Thymus Microenvironment: Ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(11):1539–46.
- Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(7):501–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2787>
- 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.
- Lin Oo M, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem*. 2007;282(12):9082–9.
- Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, et al. Role of CCL21 in recruitment of T precursor cells to fetal thymus. *Blood* [Internet]. 2005;105(1):31–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citat>

ion&list_uids=15358618%5Cnpapers3://publication/uuid/F0790BDD-5B9D-497C-B6B4-678602843CDC

- Liu G, Burns S, Huang G, Boyd K, Proia RL, Flavell R a, et al. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* [Internet]. 2009;10(7):769–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1743>
- Liu G, Yang K, Burns S, Shrestha S, Chi H. S1P1 -mTOR axis directs the reciprocal differentiation of TH 1 and regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2010;11(11):1047–56.
- Liu X, Xiong SL, Yi GH. ABCA1, ABCG1, and SR-BI: Transit of HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2012;413(3–4):384–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.002>
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. 2000;106(8):951–61.
- Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med*. 2005;201(2):291–301.
- Maeda Y, Yagi H, Takemoto K, Utsumi H, Fukunari A, Sugahara K, et al. S1P lyase in thymic perivascular spaces promotes egress of mature thymocytes via up-regulation of S1P receptor 1. *Int Immunol*. 2013a;26(5):245–55.
- Maeda Y, Yagi H, Takemoto K, Utsumi H, Fukunari A, Sugahara K, et al. S1P lyase in thymic perivascular spaces promotes egress of mature thymocytes via up-regulation of S1P receptor 1. *Int Immunol*. 2013b;26(5):245–55.
- Magner WJ, Chang AC, Owens J, Hong MJP, Brooks A, Coligan JE. Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Dev Immunol*. 2000;7(2–4):179–93.
- Main AL, Harvey TS, Baron M, Boyd J, Campbell ID. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: An insight into RGD-mediated interactions. *Cell*. 1992;71(4):671–8.
- Maki T, Gottschalk R, Ogawa N, Monaco AP. Prevention and cure of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice by continuous administration of FTY720. *Transplantation*. 2005;79(9):1051–5.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. *Exp Anim* [Internet]. 1981;30(2):137–40. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7286067>

- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim* [Internet]. 1980;29(1):1–13. Available from:
<http://europepmc.org/abstract/MED/6995140>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6995140>
- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* (80-). 2002;296(5566):346–9.
- 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.
- Matsuyuki H, Maeda Y, Yano K, Sugahara K, Chiba K, Kohno T, et al. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(6):429–37.
- Mendes-da-Cruz DA, Brignier AC, Asnafi V, Baleyrier F, Messias CV, Lepelletier Y, et al. Semaphorin 3F and Neuropilin-2 Control the Migration of Human T-Cell Precursors. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(7):e103405. Available from:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103405>
- Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol*. 2008;180(7):4639–47.
- Mendoza A, Bréart B, Ramos-Perez WD, Pitt LA, Gobert M, Sunkara M, et al. The transporter *Spns2* is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep*. 2012;2(5):1104–10.
- Messias C V., Santana-Van-Vliet E, Lemos JP, Moreira OC, Cotta-de-Almeida V, Savino W, et al. Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148137.
- Miller JF, Osoba D. Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev*. 1967;47(3):437–520.
- Mitra P, Oskeritzian C, Payne S, Beaven M, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006;103(44):16394–9. Available from: <http://www.pnas.org/content/103/44/16394.full>

- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller G, Spiegel S, Proia R. Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Mol Cell Biol*. 2005;25(24):11113–21.
- Mojcik CF, Salomon DR, Chang a C, Shevach EM. Differential expression of integrins on human thymocyte subpopulations. *Blood*. 1995;86(11):4206–17.
- Morris MA, McDuffie M, Nadler JL, Ley K. Prevention, but not cure, of autoimmune diabetes in a NOD.scid transfer model by FTY720 despite effective modulation of blood T cells. *Autoimmunity*. 2011;44(2):115–28.
- Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*. 2000;815:809–15.
- Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. Artmed Editora. 2014.
- Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC, et al. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J*. 2013;27(3):1001–11.
- Ocampo JSP, Brito JM de, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol [Internet]*. 2008;254(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.06.005>
- Ohkawa R, Nakamura K, Okubo S, Hosogaya S, Ozaki Y, Tozuka M, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: Close correlation with red blood cell parameters. *Ann Clin Biochem*. 2008;45(4):356–63.
- Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: Roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol*. 2010;32(2):95–106.
- Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator ? *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:132–7.
- Ono Y, Kurano M, Ohkawa R, Yokota H, Igarashi K, Aoki J, et al. Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: Close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids Health Dis [Internet]*. 2013;12(1):1. Available from: *Lipids in Health and Disease*

- Pankov R, Kenneth M. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115:3861–3.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources. *Science* (80-). 2007;295.
- Parslow TG, Stites DP, Ter AI, Imboden JB. *Imunologia Médica*. Guanabara Koogan, 10^a edition. 2004.
- Pham THM, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207(1):17–27. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20091619>
- Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, De La Pe??a H, et al. Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8 + T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *Rev Diabet Stud.* 2009;6(2):97–103.
- Pickford AR, Potts JR, Bright JR, Phan I, Campbell ID. Solution structure of a type 2 module from fibronectin: implications for the structure and function of the gelatin-binding domain. *Structure.* 1997;5(3):359–70.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev.* 2002;3(September).
- Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM. FTY720 Immunosuppression Impairs Effector T Cell Peripheral Homing Without Affecting Induction, Expansion, and Memory. *J Immunol* [Internet]. 2000;164(11):5761–70. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.164.11.5761>
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical Role for CXCR4 Signaling in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus. *J Immunol* [Internet]. 2003;171(9):4521–7. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.9.4521>
- Posgai AL, Wasserfall CH, Kwon K, Daniell H, Schatz DA, Atkinson MA. Plant-based vaccines for oral delivery of type 1 diabetes-related autoantigens : Evaluating oral tolerance mechanisms and disease prevention in NOD mice. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;(February):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42372>
- Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, et al. Thymocyte

- emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* [Internet]. 2002 Apr [cited 2015 Aug 11];109(8):1101–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world-- recent facts and figures. *Immunol Today* [Internet]. 1993;14(5):193–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8517916><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016756999390160M>
- Principi N, Berioli MG, Bianchini S, Esposito S. Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? *J Clin Virol* [Internet]. 2017;96:26–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.09.003>
- Reed JC, Herold KC. Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015;11(5):308–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2014.236>
- Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer AC, Abramson J, et al. Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue [Internet]. 1st ed. Vol. 136, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.014>
- Richardson SJ, Morgan NG. Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2018;43:11–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.07.006>
- Rivera J, Proia RL, Olivera A. THE ALLIANCE OF SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AND ITS RECEPTORS IN IMMUNITY. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):753–63.
- Robertson P, Means TK, Luster AD, Scadden DT. CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp Hematol*. 2006;34(3):308–19.
- Rossi FM V, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. 2005;6(6):626–34.
- Rothenberg E V. The Development of Functionally Responsive T Cells. *Adv Immunol*. 1992;51(C):85–214.
- Ruiz M, Frej C, Holmér A, Guo LJ, Tran S, Dahlbäck B. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein M limits endothelial inflammation by delivering sphingosine-1-phosphate

- to the sphingosine-1-phosphate receptor 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;37(1):118–29.
- Ruiz P, Wiles M V., Imhof BA. $\alpha 6$ integrins participate in pro-T cell homing to the thymus. *Eur J Immunol.* 1995;25(7):2034–41.
- Saba JD, Hla T. Point-Counterpoint of Sphingosine 1-Phosphate Metabolism. *Circ Res.* 2004;94(6):724–34.
- Sainte-Marie G, Leblond CP. Cytologic Features and Cellular Migration in the Cortex and Medulla of Thymus in the Young Adult Rat. *Blood.* 1964;13(3).
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* [Internet]. 2000;12(4):431–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761300801958>
- Salomon DR, Mojciak CF, Chang AC, Wadsworth S, Adams DH, Coligan JE, et al. Constitutive activation of integrin $\alpha 4 \beta 1$ defines a unique stage of human thymocyte development. *J Exp Med* [Internet]. 1994;179(5):1573–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapourzadeh T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, et al. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Jan 31];43(4):394–402. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sanford M. Fingolimod: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drugs.* 2014;74(12):1411–33.
- Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn M, Peterson MS, et al. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Receptor Subtypes S1P1 and S1P3, Respectively, Regulate Lymphocyte Recirculation and Heart Rate*. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13839–48.
- Sanna MG, Wang S-K, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol.* 2006;2(8):434–41.
- Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, et al. Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J Neurochem*

[Internet]. 2007;103:2610–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2007.04958.x>

Savagner P, Imhof BA, Yamada KM, Thiery JP. Homing of hemopoietic precursor cells to the embryonic thymus: Characterization of an invasive mechanism induced by chemotactic peptides. *J Cell Biol.* 1986;103(6):2715–27.

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.

Savino W, Boitard C, Bach J-F, Dardenne M. Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab Investig.* 1991;

Savino W, Carnaud C, Luan JJ, Bach JF, Dardenne M. Characterization of the extracellular matrix-containing giant perivascular spaces in the NOD mouse thymus. *Diabetes.* 1993a;42(1):134–40.

Savino W, Dalmau SR, Cotta-de-Almeida V. Role of Extracellular Matrix-Mediated Interactions in Thymocyte Migration. *Dev Immunol.* 2000;7(55):279–91.

Savino W, Mendes-Da-Cruz D a., Silva JS, Dardenne M, Cotta-De-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: A combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* 2002;23(6):305–13.

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.* 2015a;6(NOV).

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015b;. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2015.168>

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* [Internet]. 2004;75(6):951–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020651>

Savino W, Villa-Verde DMS, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today.* 1993b;14(4):158–61.

Sawada M, Nagamine J, Takeda K, Utsumi K, Kosugi A, Tatsumi Y, et al. Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with

- their capacity to adhere to thymic stromal cells. *J Immunol*. 1992;149(11):3517–24.
- Schabath R, Müller G, Schubel A, Kremmer E, Lipp M, Förster R. The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation. *J Leukoc Biol*. 1999;66(6):996–1004.
- Schmeissner PJ, Xie H, Smilenov LB, Shu F, Marcantonio EE. Integrin functions play a key role in the differentiation of thymocytes in vivo. *J Immunol* [Internet]. 2001;167(7):3715–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564787>
- Schulze T, Golfier S, Tabeling C, Rabel K, Graler MH, Witzernath M, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *FASEB J* [Internet]. 2011;25(11):4024–36. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.10-179028>
- Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1295–301.
- Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* (80-). 2005;309(September):1735–40.
- Shiow LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, et al. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* [Internet]. 2006 Mar 23 [cited 2016 Feb 4];440(7083):540–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525420>
- Sitnicka E. From the Bone Marrow to the Thymus: The Road Map of Early Stages of T-Cell Development. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2009;29(6):487–530. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,0e9e83c77713325b,262881fd6b2a000f.html>
- Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes mellitus gestacional: diagnóstico, tratamento e acompanhamento pós-gestação. *Diretrizes SBD* [Internet]. 2015;192. Available from: <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-gestacional/001-Diretrizes-SBD-Diabetes-Gestacional-pg192.pdf>
- Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity Sarah. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):1172–85.
- Srinivasan S, Bolick DT, Lukashev D, Lappas C, Sitkovsky M, Lynch KR, et al. Sphingosine-1-Phosphate Reduces CD4₊ T-Cell Activation in Type 1 Diabetes Through Regulation of Hypoxia-Inducible Factor Short Isoform I.1 and CD69. *Diabetes*. 2008;57(February).

- Stimamiglio MA, Jiménez E, Silva-Barbosa SD, Alfaro D, García-Ceca JJ, Muñoz JJ, et al. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2010;88(3):483–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0210079>
- Stuiver I, O'Toole TE. Regulation of integrin function and cellular adhesion. *Stem Cells*. 1995;13:250–62.
- Suniara BRK, Jenkinson EJ, Owen JJT. An Essential Role for Thymic Mesenchyme in Early T Cell Development. *J Exp Med*. 2000;191(6):1051–6.
- Sutter I, Park R, Othman A, Rohrer L, Hornemann T, Stoffel M, et al. Apolipoprotein M modulates erythrocyte efflux and tubular reabsorption of sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* [Internet]. 2014;55(8):1730–7. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M050021>
- Suzuki G, Sawa H, Kobayashi Y, Nakata Y, Nakagawa KI, Uzawa a, et al. Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol* [Internet]. 1999;162(10):5981–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229836>
- Suzuki S, Li X-K, Enosawa S, Shinomiya T. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes. *Immunology*. 1996;89:518–23.
- Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10477–86.
- Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;
- Takeshita H, Kitano M, Iwasaki T, Kitano S, Tsunemi S, Sato C, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor 1 signaling regulates receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) expression in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012;419(2):154–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.103>
- Tarrasón G, Aulí M, Mustafa S, Dolgachev V, Domènech MT, Prats N, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor-1 antagonist, W146, causes early and short-lasting peripheral blood lymphopenia in mice. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011;11(11):1773–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.07.004>
- Thayer TC, Wilson BS, Mathews CE. Use of NOD Mice to Understand Human Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):541–61.

- Thuy A V., Reimann C-M, Hemdan NY a., Gräler MH. Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2014;34(1):158–71. Available from: <http://www.karger.com?doi=10.1159/000362992>
- Tukijan F, Chandrakanthan M, Nguyen LN. Mini-review: The signaling roles of S1P derived from red blood cells and platelets. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2018; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.14451>
- Ueno T, Saito F, Gray DHD, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, et al. CCR7 Signals Are Essential for Cortex – Medulla Migration of Developing Thymocytes. 2004;200(4):493–505.
- Ushiki T, Takeda M. Three-dimensional Ultrastructure of the Perivascular Space in the Rat Thymus. *Arch Histol Cytol* [Internet]. 1997;60(1):89–99. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/aohc1982/60.89?from=CrossRef>
- Utsumi K, Sawada M, Narumiya S, Nagamine J, Sakata T, Iwagami S, et al. Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991;88(13):5685–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=51942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell*. 2006;9(3):225–38.
- Visperas A, Vignali DAA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol* [Internet]. 2016;197(10):3762–70. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601118>
- Vivinus-Nebot M, Ticchioni M, Mary F, Hofman P, Quaranta V, Rousselle P, et al. Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via alpha6beta4 integrins. *J Cell Biol* [Internet]. 1999;144(3):563–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Van Der Vliet HJJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:3–7.
- Vu TM, Ishizu AN, Foo JC, Toh XR, Zhang F, Whee DM, et al. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. *Nature* [Internet].

2017;550(7677):524–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24053>

- Wadsworth S, Halvorson MJ, Coligan JE. Developmentally regulated expression of the beta 4 integrin on immature mouse thymocytes. *J Immunol* [Internet]. 1992;149(2):421–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385605>
- Wang L, Lee J-F, Lin C-Y, Lee M-J. Rho GTPases mediated integrin $\alpha\beta3$ activation in sphingosine-1-phosphate stimulated chemotaxis of endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2008a;129:579–88.
- Wang W. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J* [Internet]. 2005;16(5):1–16. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.05-3730fje>
- Wang XQ, Chen L, Pan R, Zhao J, Liu Y, He RQ. An earthworm protease cleaving serum fibronectin and decreasing HBeAg in HepG2.2.15 cells. *BMC Biochem*. 2008b;9(1):1–14.
- Wani M a, Wert SE, Lingrel JB. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21180–5.
- Wani MA, Means RT, Lingrel JB. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res*. 1998;7(4):229–38.
- Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. 2003a;42:344–57.
- Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Prog Lipid Res*. 2003b;42(4):344–57.
- Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, et al. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res*. 2006a;99(7):731–9.
- Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, et al. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res*. 2006b;99(7):731–9.
- White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of Fibronectin Splice Variants. *J Pathol*. 2008;216(1):1–14.
- Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: Clinical and research perspectives. *J Autoimmun*. 2005;25(SUPPL.):56–62.

World Health Organization. Global Report on Diabetes. Isbn [Internet]. 2016;978:88.

Available from:

http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf

Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release.

Prostaglandins [Internet]. 2001;64(1–4):107–22. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331099>

Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *ARPN J Eng Appl Sci*. 2017;12(10):3218–21.

Zachariah M a, Cyster JG. Thymic egress: S1P of 1000. *F1000 Biol Rep*. 2009;1(August):60.

Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science (80-)*. 2010;328(5982):1129–35.

Zamora-Pineda J, Kumar A, Suh JH, Zhang M, Saba JD. Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress. *J Exp Med*. 2016a;213(12):2773–91.

Zamora-Pineda J, Kumar A, Suh JH, Zhang M, Saba JD. Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress. *J Exp Med [Internet]*. 2016b;213(12):2773–91. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20160287>

Zhang G, Contos JJA, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene*. 1999;227:89–99.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Artigo “Sphingosine-1-phosphate induces dose-dependent chemotaxis or fugetaxis of T-ALL blasts through S1P1 activation” PLOS ONE (doi: 10.1371/journal.pone.0148137), 2016. Neste documento, demonstramos que a resposta migratória de blastos de LLA-T frente ao estímulo por S1P pode ser quimiotática ou repulsiva, dependendo da concentração utilizada. Além de descrever as vias de sinalização ativadas pós-estímulo em diferentes concentrações e sugerir mecanismos de migração de blastos de LLA e LL-T, que parecem ser semelhantes aos utilizados por precursores de células T normais.

RESEARCH ARTICLE

Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation

Carolina V. Messias¹, Eliane Santana-Van-Vliet¹, Julia P. Lemos¹, Otacilio C. Moreira², Vinicius Cotta-de-Almeida¹, Wilson Savino¹, Daniella Arêas Mendes-da-Cruz^{1*}

1 Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* daniella@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Messias CV, Santana-Van-Vliet E, Lemos JP, Moreira OC, Cotta-de-Almeida V, Savino W, et al. (2016) Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation. PLoS ONE 11(1): e0148137. doi:10.1371/journal.pone.0148137

Editor: Neil A. Hotchin, University of Birmingham, UNITED KINGDOM

Received: October 15, 2015

Accepted: January 13, 2016

Published: January 29, 2016

Copyright: © 2016 Messias et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by CNPq, Faperj, Fiocruz, and FOCEM-Mercosur.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid involved in several physiological processes including cell migration and differentiation. S1P signaling is mediated through five G protein-coupled receptors (S1P1-S1P5). S1P1 is crucial to the exit of T-lymphocytes from the thymus and peripheral lymphoid organs through a gradient of S1P. We have previously observed that T-ALL and T-LBL blasts express S1P1. Herein we analyzed the role of S1P receptors in the migratory pattern of human T-cell neoplastic blasts. S1P-triggered cell migration was directly related to S1P1 expression. T-ALL blasts expressing low levels of S1P1 mRNA (HPB-ALL) did not migrate toward S1P, whereas those expressing higher levels of S1P1 (MOLT-4, JURKAT and CEM) did migrate. The S1P ligand induced T-ALL cells chemotaxis in concentrations up to 500 nM and induced fugetaxis in higher concentrations (1000–10000 nM) through interactions with S1P1. When S1P1 was specifically blocked by the W146 compound, S1P-induced migration at lower concentrations was reduced, whereas higher concentrations induced cell migration. Furthermore, we observed that S1P/S1P1 interactions induced ERK and AKT phosphorylation, and modulation of Rac1 activity. Responding T-ALL blasts also expressed S1P3 mRNA but blockage of this receptor did not modify migratory responses. Our results indicate that S1P is involved in the migration of T-ALL/LBL blasts, which is dependent on S1P1 expression. Moreover, S1P concentrations in the given microenvironment might induce dose-dependent chemotaxis or fugetaxis of T-ALL blasts.

Introduction

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a membrane-derived lipid produced by mast cells, endothelial cells [1], pericytes [2] and especially by activated platelets and erythrocytes [3]. This lipid is produced by an enzymatic cascade of sphingolipids through phosphorylation of sphingosine by sphingosine kinase 1 or 2 (SphK1 and SphK2) [4, 5]. S1P is involved in several physiological

processes in the immune, cardiovascular and nervous systems, including cell proliferation, survival, migration and differentiation, angiogenesis, inflammation and calcium homeostasis [6, 7]. Furthermore, S1P is involved in tumor progression [8], neoplastic cell proliferation [9–11], migration [12, 13] as well as resistance to chemotherapeutic drugs [14, 15].

S1P signaling is primarily mediated through five G protein-coupled receptors (S1P1–S1P5). S1P1, originally named EDG-1, was the first S1P receptor described and is the only S1P receptor exclusively coupled to G_i , being ubiquitously expressed. Its major functions are related to vascular development and integrity, and to the mobility of different hematopoietic cells types (hematopoietic progenitors, T and B lymphocytes, natural killer T cells, dendritic cells, macrophages, neutrophils, mast cells and osteoclasts) [7, 16]. This mobility is associated with a gradient of S1P since this lipid is found in higher concentrations in the blood and in lower amounts within lymphoid organs [3, 17].

S1P1 is crucial to the exit of T lymphocytes from the thymus and peripheral lymphoid organs [18, 19]. Mouse double-positive immature thymocytes ($CD4^+CD8^+$) express relatively low levels of S1P1, as compared with single-positive mature thymocytes ($CD4^+CD8^-$ or $CD4^-CD8^+$) [18]. Single-positive thymocytes migrate toward S1P, a response that is no longer seen in thymocytes deficient in S1P1. Actually, S1P1-deficient thymocytes are able to differentiate in the thymus but are not able to leave the thymus, thus accumulating within the organ [18, 19]. Moreover, mature T lymphocytes deficient in S1P1 are not seen in the blood or peripheral organs, and transplantation of these cells to normal mice leads to their accumulation in peripheral organs [19]. These data support the hypothesis that S1P1 is one of the major players in the exit of T lymphocytes from lymphoid organs.

Similar to what has been seen in mice [18], we have recently reported that normal human double-positive thymocytes express less S1P1 than CD4 and CD8 single-positive thymocytes. Moreover, human thymocytes migrate toward S1P according to the expression levels of S1P1. This response is associated with early step events of cell migration such as actin polymerization. Interestingly, S1P1 is also expressed by human malignant T-cell precursors. Indeed, T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) blasts express similar levels of S1P1 and migrate toward S1P [20]. As T-ALL/LBL present similar characteristics of normal T-lymphocyte precursors [21], they might also share mechanisms of migration and homing through S1P receptors. Considering the importance of T-ALL/LBL migration and spread during disease pathogenesis, we analyzed herein the role of different S1P concentrations in the migratory response of human T-cell lymphoblasts and the signaling pathways involved in S1P1 activation.

Materials and Methods

Antibodies and chemicals

Sphingosine-1-phosphate, W146, (4R)-2-Undecyl-4-thiazolidinecarboxylic acid (BML-241), FITC-phalloidin, L-alpha-phosphatidylcholine palmitoyl and fatty acid free bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Rabbit anti-phospho-Akt (catalog number: 9271), rabbit anti-Akt (catalog number: 4685), rabbit anti-p44/42 MAPK (catalog number: 4695), rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (catalog number: 9101) and goat anti-rabbit HRP-linked (catalog number: 7071) polyclonal or monoclonal antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, USA), whereas the mouse anti-actin monoclonal antibody (clone C4—catalog number: MAB1501) was from Merck Milipore (Darmstadt, Germany) and the goat anti-mouse HRP-linked antibody (catalog number: 1031–05) was from Southern Biotech (Birmingham, USA).

Cell lines

T-cell acute lymphoblastic leukemia (HPB-ALL, MOLT-4, JURKAT, CEM) [22–25] and anaplastic large lymphoma (SU-DHL-1) [26] were kindly provided by Dr. Vahid Asnafi (Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hopital Necker-Enfants Malades, Paris, France). Cell lines were cultured in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), pH 7–7.5, supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil), 2 g/L sodium bicarbonate (Isosfar, Rio de Janeiro, Brazil), 2 g/L HEPES (Sigma-Aldrich), 2 mg/ml ciprofloxacin at 37°C in an atmosphere containing 5% of CO₂. MOLT-4 was the only cell line supplemented with 20% fetal bovine serum.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR)

mRNA was isolated from cells using RNase Mini Kit following the manufacturer's instructions (Quiagen, Hilden, Germany). cDNA synthesis was done with 2 µg of mRNA with Super Script II RT (Invitrogen, Carlsbad, USA). S1P1 and ABL primers were designed using the Primer Express[®] software (Applied Biosystems, Foster City, USA). S1P2, S1P3, S1P4 and S1P5 primers were obtained from the literature [27]. S1P1 forward: GGCTCTCCGAACGCAACTT; S1P1 reverse: CAGGCTTTTTGTGTAGCTTTTCC; S1P2 forward: GCCATTGTGGTGGAAAACCTT; S1P2 reverse: CAGGTTGCCAGAAACAGGTA; S1P3 forward: AGCGGC ACTTGACAATGATCA; S1P3 reverse: ACATCCCGATCAGGAGGAAGA; S1P4 forward: CCCTTACTCCAAGCGCTACA; S1P4 reverse: CCATAGAGGCCCATGATGGT; S1P5 forward: TGAAGGAGTAGTTCCCGAAGG; S1P5 reverse: AAGCTTCTATGGCTCCACCTC; ABL forward: TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT; ABL reverse: GATGTAGTTGCTTGGGACCCA. RQ-PCR was performed with Syber[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on Step One Plus System (Applied Biosystems). Results were normalized by the gene control ABL, which is recommended by Europe Against Cancer Program for leukemia's diagnosis [28]. Fold change analysis were done using HPB-ALL as calibrator and statistical analysis was made with Δ Ct values.

Cell migration assays

Cells were serum-starved for 2 h and then treated or not with 100 µM of W146 (Sigma-Aldrich) and/or 100 µM BML-241 (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. This treatment (using 2 x 10⁶ cells per well) was performed in 100 µl of RPMI- fatty acid free BSA 0.1%. Migration assays were done in transwell chambers. Cell culture inserts of 8µm pore size (Nunc, Roskilde, Denmark or Corning Costar, Cambridge, USA) were treated with PBS-fatty acid free BSA 0.1% for 45 min at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. For chemotaxis assays, 2 x 10⁶ cells in 300 µl (inserts from Nunc) of migration medium (RPMI- fatty acid free BSA 0.1%) were added in the upper chambers and 500 µl of the migration medium alone or containing S1P were added in the lower chamber. For fugetaxis assays, 2 x 10⁶ cells in 100 µl (inserts from Corning Costar) of migration medium alone or containing S1P were added to the upper chamber and 600 µl of migration medium alone were added to the lower chamber. For checkerboard assays, 2 X 10⁶ cells in 100 µl (inserts from Corning Costar) of migration medium alone or containing S1P were added to the upper chamber and 600 µl of migration medium alone or containing S1P were added to the lower chamber. Cells were allowed to migrate for 4 h and the numbers of migrating cells in the lower chamber were counted using a Neubauer chamber. In some experiments, cells in the upper chamber were also collected and stained with Anexin-V-FITC and PI and viability was evaluated by flow cytometry in a FACSCanto™ II device (Becton Dickinson, San Jose, USA).

Actin polymerization assays

Cells were serum-starved for 2 h and then treated or not with 100 μ M W146 for 1 h as detailed above. After treatment, cells were incubated in RPMI/20 mM HEPES and S1P was added. At each indicated time point (15 s to 2 min), an aliquot was taken from the cell suspension and mixed with the labeling buffer, consisting in 10^{-7} M FITC-phalloidin, 0.125 mg/ml L-alpha-phosphatidylcholine palmitoyl, and 4.5% paraformaldehyde in PBS. Staining was analyzed by flow cytometry, and the mean fluorescence intensity (MFI) values obtained before addition of the ligand were arbitrarily set at 100%.

Cell stimulation

Serum-starved cells (2×10^6) were centrifuged and resuspended in RPMI- fatty acid free BSA 0.1% and S1P was added to the cell suspension and at each time point (1 to 60 min) and then washed with cold PBS.

Western Blot

Protein extraction was performed in 70 μ l of protease and phosphatase cocktail (Sigma-Aldrich) with aid of a 1 ml syringe coupled to a needle immediately after cell stimulation. Total protein content was determined in Qubit fluorometer (Invitrogen) following manufacturer's recommendations. Proteins were resolved by Bolt 4–12% Bis-Tris Plus Gel (Novex, Carlsbad, USA) and transferred by iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen) to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% non-fat milk in tris-buffered saline with tween 20 (TBST) for 2 h at room temperature. The membranes were then labeled with anti-AKT, anti-pAKT, anti-p44/42 MAPK or anti-phospho-p44/42 antibodies (1:1000) diluted in 2,5% non-fat milk in TBST for 2 h at room temperature. After incubation, membranes were washed twice for 10 min and twice for 5 min with TBST. Peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG were used as secondary antibodies (1:1000) and samples were incubated for 90 min at room temperature. Subsequently, membranes were washed again, incubated with Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection Reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK) for 3 min at room temperature and exposed to Hyperfilm ECL (Amersham). When necessary, brightness and contrast adjustments were performed in the entire images.

Rac1 Activation assays

Rac-1 activity was assessed with Rac1 G-LISA Activation Assay Kit (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA). Protein extraction and quantification were performed according to the manufacturer's instructions immediately after cell stimulation. Rac activation signal was measured as absorbance levels using 490 nm filter. Optical density (OD) values obtained before addition of the ligand were arbitrarily set at 100%.

Statistical analyses

Results were analyzed by unpaired Student's *t* test, One-way ANOVA followed by Tukey or Dunnett post-test or Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test in GraphPad Prism 5. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$ (* or #), $p < 0.01$ (** or ##) or $p < 0.001$ (***) or ###).

Results

S1P receptors are expressed in T-ALL blasts

We first analyzed gene expression of all S1P receptors (S1P1-S1P5) in different T-ALL blasts by quantitative RT-PCR. We detected variable levels of the S1P receptors in the four cell lines studied. We observed that HPB-ALL cells mainly expressed S1P4 and S1P5 mRNA, whereas MOLT-4 cells showed a more intense expression of S1P1, S1P3 and S1P5. JURKAT cells preferentially expressed genes coding for S1P1 and S1P3. Except for S1P2, CEM cells expressed all other S1P receptors (Fig 1A).

Among S1P receptors, S1P1, S1P2 and S1P3 are the most studied. S1P1 and S1P3 are involved in inducing cell motility, while S1P2 is involved in the inhibition of this process [29].

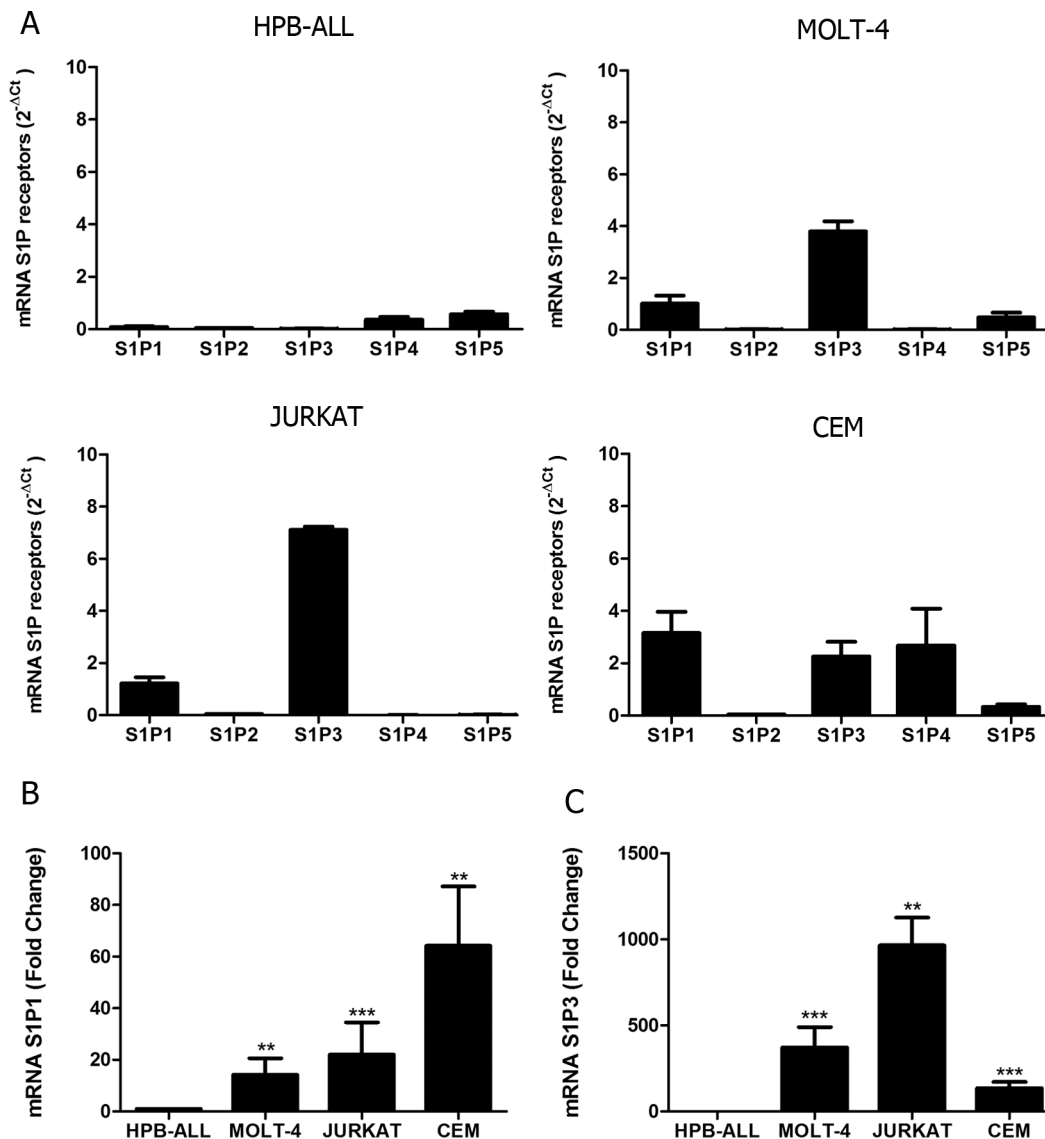


Fig 1. S1P receptors mRNA expression in human T-ALL blasts. (A) Bars show S1P receptors mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl) gene ($2^{-\Delta Ct}$) in T-ALL ($n = 1-2$, with 3-6 biological replicates). (B) Bars shows S1P1 or (C) S1P3 mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl). Fold change analysis were done using HPB-ALL as calibrator to normalize the expression of the receptors on the other T-ALL blasts. Statistical analysis was made with ΔCt values and significant differences are related to HPB-ALL cells. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by Student's t test and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) ($n = 1-2$, with 3-6 biological replicates).

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g001

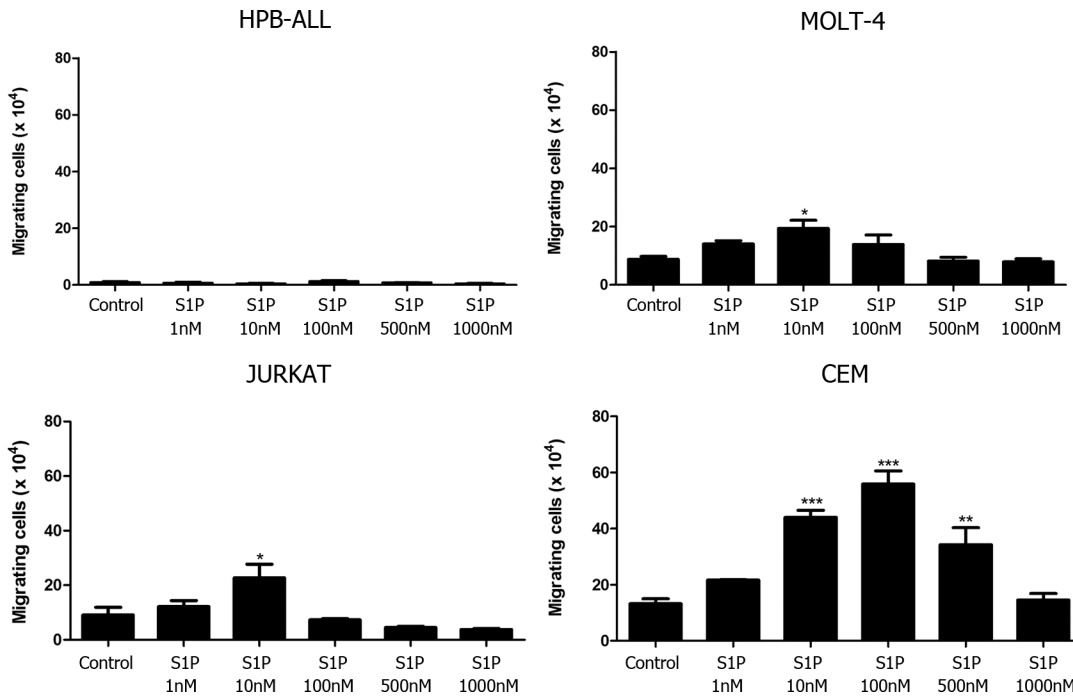


Fig 2. Different S1P concentrations induce chemotactic responses of T-ALL blasts. T-ALL blasts were serum-starved for 2 h and inserted into Transwell™ chambers with different S1P concentrations for 4 hours. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by One-way ANOVA, followed by Tukey post-test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ ($n = 3$).

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g002

As HPB-ALL expressed very low levels of S1P1 and S1P3 we used this cells in order to normalize the expression of the receptors on the other T-ALL cell lines. We observed that S1P1 gene expression in MOLT-4, JURKAT and CEM cells was, respectively, 14, 22 and 64 times higher than in HPB-ALL cells (Fig 1B). Regarding S1P3, its expression was, respectively, 372, 965 and 136 times higher than HPB-ALL cells (Fig 1C).

Low S1P concentrations induced chemotactic migration of T-ALL blasts

Functionally, we evaluated whether different concentrations of S1P could act as chemoattractant stimulus upon T-ALL cell lines. We observed that HPB-ALL cells, which express very low S1P1 mRNA levels, did not migrate toward S1P in any concentration used (1–1000 nM—Fig 2). Differently, MOLT-4 and JURKAT cells, which express comparably moderate S1P1 amounts, migrated at low rates toward S1P 10 nM, but failed to migrate toward higher concentrations (500 and 1000 nM). CEM cells, which expressed higher S1P1 levels, migrated at a higher rate and respond to a wider concentration range of S1P (10, 100 and 500 nM) than MOLT-4 and JURKAT cells (Fig 2). When we compared the S1P-induced migration rate (10 nM) of the various T-ALL cells as a function of the corresponding S1P1 gene expression level, we noticed that the numbers of migrating cells were higher for CEM cells and lower for MOLT-4 and JURKAT, suggesting that S1P1 mRNA expression is directly correlated with their migration capacity (S1 Fig).

S1P1 is involved in S1P-induced migration of T-ALL blasts

To investigate if the S1P-evoked migration occurred due to specific interactions between S1P/S1P1, cells were pre-treated with the W146 compound, a S1P1 specific inhibitor [30–32]. Such pre-treatment inhibited the migration of MOLT-4 cells toward S1P 10 nM, whereas

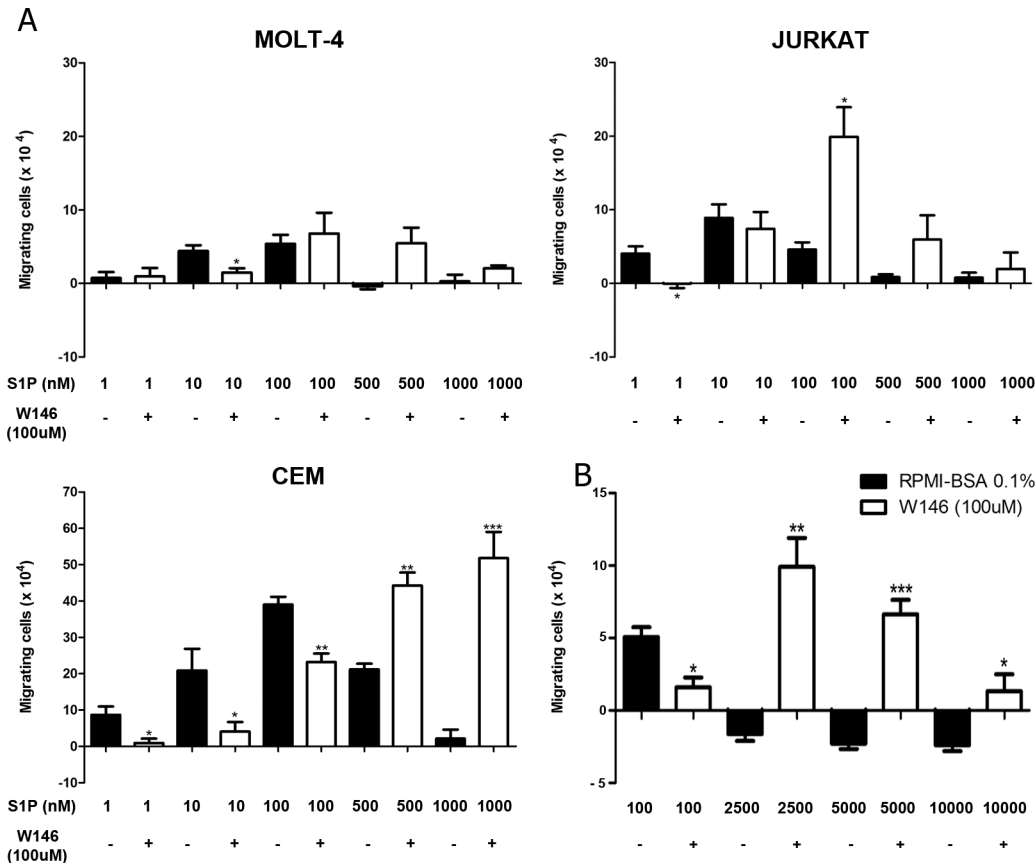


Fig 3. S1P1 is involved in S1P-driven chemotactic responses of T-ALL blasts. T-ALL blasts were serum-starved for 2 h and pre-treated or not with W146 (100 μ M). **(A)** Cells were applied to Transwell™ chambers with S1P 1, 10, 100, 500 or 1000 nM and incubated for 4 hours (n = 3). **(B)** Migratory response of CEM cells toward S1P 100, 2500, 5000 and 10000 nM (n = 3). Values correspond to a specific migration after subtracting the numbers of migrating cells obtained in wells with culture medium only. Black bars correspond to T-ALL blasts pre-treated with RPMI-BSA 0.1% and white bars correspond to T-ALL blasts pre-treated with W146. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by unpaired Student's *t* test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g003

pre-treatment of JURKAT cells significantly inhibited migration toward S1P 1 nM, but not 10 nM. In the case of CEM cells, W146 blocked the migration in various S1P concentrations, namely 1, 10 and 100 nM (Fig 3A). These results suggest that migration induced by low concentrations of S1P in T-ALL blasts is specifically mediated by S1P1.

Unexpectedly, JURKAT cells pre-treated with W146 migrated efficiently toward S1P 100 nM, but much less toward higher concentrations, such as 1000 nM. After CEM cell pre-treatment with the S1P1 blocker, we observed that S1P 500 and 1000 nM strongly induced cell migration (Fig 3A). We then enhanced S1P concentrations to investigate if even at higher concentrations, CEM cells pre-treated with W146 would still be able to migrate. As expected, we observed that S1P 2500, 5000 and 10000 nM did not induce cell migration. However, CEM cells pre-treated with W146 migrated toward S1P applied at 2500 and 5000 nM, but did not migrate when exposed to S1P 10000 nM (Fig 3B), where migration response returned to basal levels. Similar effect was observed with MOLT-4 cells pre-treated with W146, even though differences between pre-treated and non-treated cells were not statistically different for higher S1P concentrations, such as 100–1000 nM (Fig 3A). Together, our data indicate that the pre-treatment of the T-ALL blasts with W146 shifted the S1P dose/chemoattraction response

curve. Indeed, the maximum chemotaxis was reached at approximately one-log higher S1P dose, following W146 pre-treatment.

S1P1 mediates fugetaxis of T-ALL at high S1P concentrations

Since we verified that high S1P concentrations failed to induce chemotaxis of T-ALL blasts, we then evaluated whether these concentrations were actually repulsive. We performed migration assays where different S1P concentrations were applied to the transwell upper chambers together with CEM cells, which express higher levels of S1P1. We found that high S1P concentrations (1000, 5000 and 10000 nM) induced fugetaxis or cell chemorepulsion, whereas lower concentrations did not (Fig 4A). The most significant effect was observed at S1P 5000 nM. This chemorepulsive effect was also S1P1 dependent, since pre-treatment of cells with W146 inhibited fugetaxis responses induced by S1P 1000, 5000 and 10000 nM (Fig 4B). Interestingly, W146 also inhibited migratory responses from control and lower S1P concentrations (10, 100 and 500 nM).

To confirm that different S1P concentrations induce fugetaxis or chemotaxis, we performed checkerboard assays. We observed that low S1P concentrations (100 nM) induced chemokinesis, as cell migration was observed when S1P was added to both upper and lower transwell™ chambers, (Fig 5A). However, chemotaxis was still induced by S1P 100 nM, since migratory response induced by S1P added only to the lower chamber was higher than migratory response observed when S1P was present on both chambers (Fig 5A). In contrast, higher S1P concentrations (5000 nM) only induced fugetaxis, as cells migrated when S1P was added only to lower chamber and did not migrate when S1P was present in both upper and lower chambers (Fig 5B).

S1P3 is not involved in migration of T-ALL blasts

Migratory responses of CEM cells were completely abrogated following W146 pretreatment in fugetaxis experiments, but not in chemotaxis assays. We therefore hypothesized if other S1P receptor could be activated inducing chemotaxis toward high S1P concentrations following W146 treatment. Besides S1P1, S1P-migrating T-ALL cell lines (MOLT-4, JURKAT and CEM) also expressed S1P3 (Fig 1A–1C), raising the possibility that S1P3 might be involved in cell migratory responses. To evaluate this hypothesis, we performed migration assays with CEM, considering its higher S1P1 expression. We found that pre-treatment of CEM cells with BML-241 (a specific S1P3 blocker) did not inhibit cell migration toward S1P 10 and 100 nM (Fig 6A). In fact, the number of migrating cells in this case was very similar to what was seen when CEM cells were not treated. When CEM cells were pre-treated with W146 and BML-241 together, cell migration was inhibited toward S1P 10 and 100 nM, but did happen when higher S1P concentrations were applied. These data are comparable to those observed when CEM cells were pre-treated only with W146 (Fig 6A), indicating that S1P3 was not involved in cell migration when S1P1 signaling is blocked.

As an additional strategy, we used SU-DHL-1 cells, an anaplastic large cell lymphoma cell line, which expresses S1P1 and S1P4 but not S1P3 (Fig 6B). As compared to HPB-ALL cells, this lymphoma cell line expressed very high levels of S1P1 but even less S1P3 (Fig 6C). As expected, SU-DHL-1 cells were able to migrate toward S1P 100 and 500 nM, but not toward higher S1P concentrations (Fig 6D). Furthermore, when SU-DHL-1 cells were pre-treated with W146, migration toward S1P 10 and 100 nM was inhibited, but was induced toward 5000 and 10000 nM (Fig 6E). Since SU-DHL-1 does not express S1P3 and migration patterns were similar to the ones observed with T-ALL blasts, these results reinforce the notion that S1P3 is not involved in cell migration toward high S1P concentrations under conditions of S1P1 blockage.

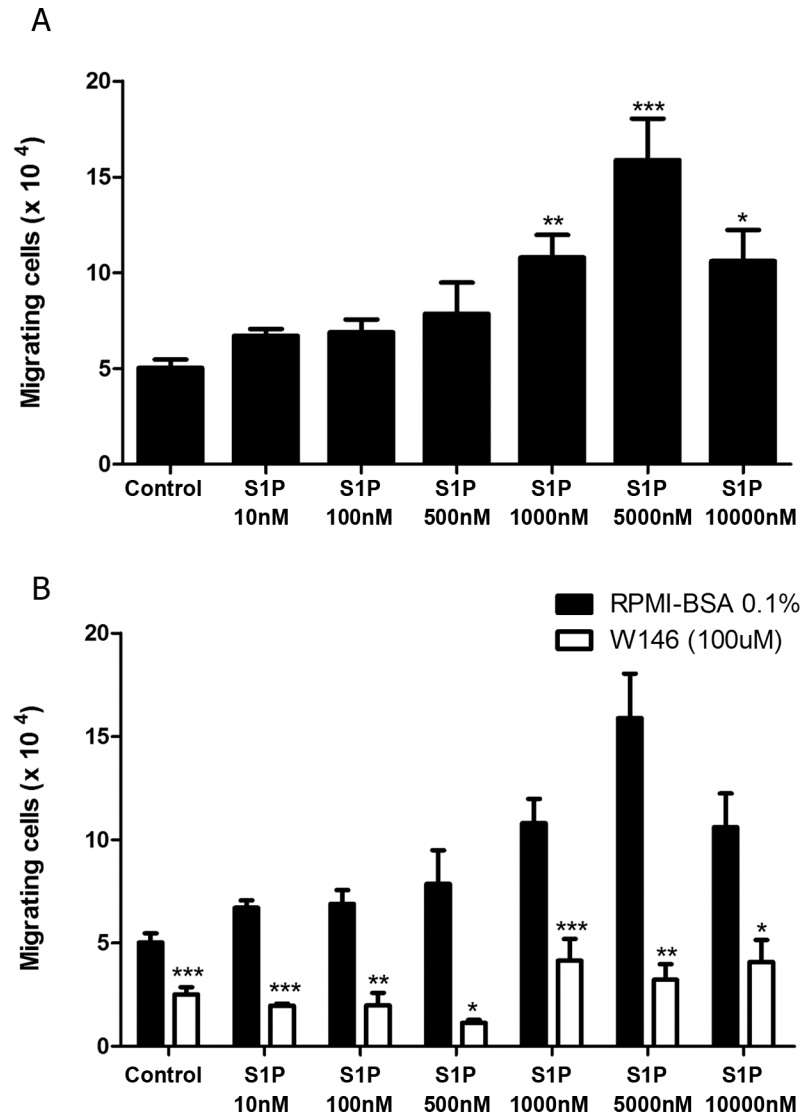


Fig 4. High S1P concentrations induce S1P1-dependent fugetaxis of CEM cells. (A) CEM cells were serum-starved for 2 h, applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. S1P was added to the upper chamber to evaluate fugetaxis; only RPMI-BSA 0.1% was added to the bottom chambers. Results were analyzed by One-way ANOVA, followed by Tukey post-test ($n = 3$). **(B)** CEM cells were serum-starved for 2 h and pre-treated or not with W146 (100 μ M). Cells were then applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. S1P was added to the upper chamber to evaluate repulsive responses. Black bars correspond to T-ALL blasts pre-treated with RPMI-BSA 0.1% alone and white bars correspond to T-ALL blasts pre-treated with W146. Results were analyzed by unpaired Student's *t* test. Results are expressed as mean \pm SEM and differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ ($n = 3$).

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g004

S1P modulates actin polymerization, AKT, ERK and Rac1 activation in T-ALL blasts

Having characterized the S1P modulation of migratory responses of T-ALL blasts, we next analyzed the regulation of actin cytoskeleton, an event necessary for cell migration [33]. As shown in Fig 7A, S1P induced an important actin cytoskeleton polymerization in CEM cells at 10 and 100 nM, the same concentrations that induced chemotactic responses in these cells (Fig 2).

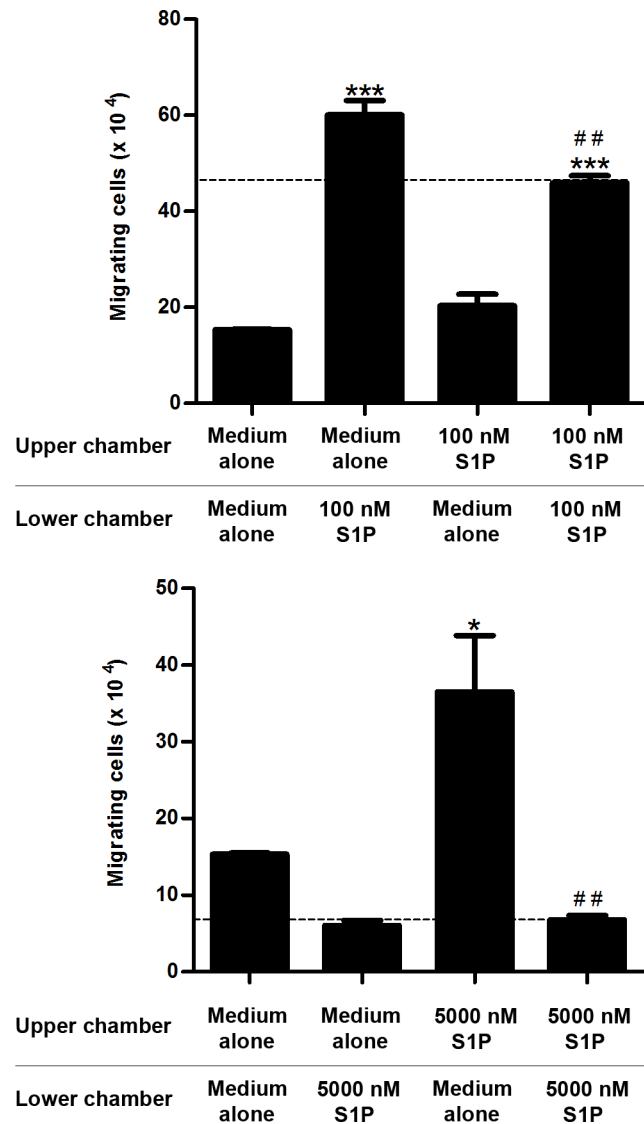


Fig 5. S1P-induced migratory responses in checkerboard assays. CEM cells were serum-starved for 2 h, applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations in a checkerboard format and incubated for 4 hours. (A) S1P 100 nM or (B) S1P 5000 nM were added to upper and/or lower chamber as RPMI-BSA 0,1%. Results were analyzed by One-way ANOVA, followed by Tukey post-test and are expressed as mean ± SEM. Differences between wells with medium alone in upper and lower chambers and wells with S1P in upper and/or lower chamber were considered statistically significant when * p<0.05, ** p<0.01 or *** p<0.001. Differences between wells with S1P in lower (100 nM) or upper (5000 nM) chambers and wells with S1P in both upper and lower chambers were considered statistically significant when # p<0.05, ## p<0.01 or ### p<0.001 (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g005

Slight polymerization was observed at 1 and 500 nM. Pre-treatment with W146 blocked actin polymerization in all S1P doses applied. Interestingly, the peak of actin polymerization during the kinetics was dose-dependent (Fig 7A).

We then examined AKT, ERK and Rac activation, known to be involved in S1P1 signaling in other cells [34, 35]. After stimulating CEM cells with S1P 10 and 100 nM, which induced cell chemotaxis, we detected a clear AKT phosphorylation at 5 and 10 min, whereas 1000 nM

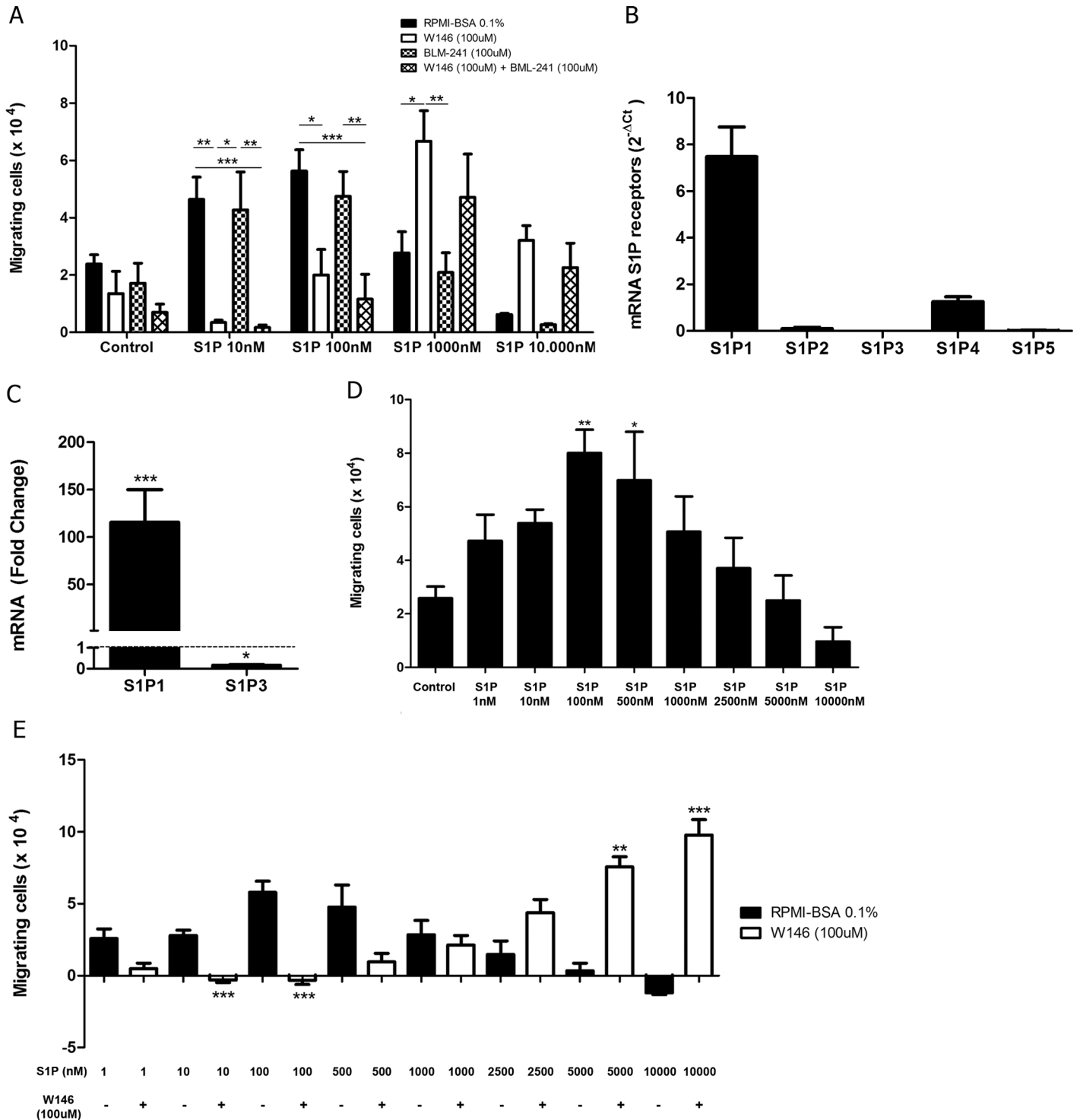


Fig 6. S1P3 is not involved in S1P-driven chemotactic responses of CEM cells. (A) CEM cells were serum-starved for 2 h and pre-treated or not with W146 (100 μM) and/or BM-241 (100 μM). Cells were applied in Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. Black bars correspond to pre-treatment with RPMI-BSA 0.1%; white bars correspond to pre-treatment with W146; grid bars correspond to pre-treatment with BML-241; and chess bars correspond to pre-treatment with W146 plus BML-241. Results were analyzed by Two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test (n = 3). (B) S1P receptors mRNA expression were analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl) gene (2^{-ΔCt}) in SU-DHL-1 cells (n = 4). (C) S1P1 and S1P3 mRNA expression was analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl). Fold change analysis were done using HPB-ALL as calibrator to normalize the expression of S1P1 and S1P3 on SU-DHL-1 cells. Statistical analysis was made with ΔCt values and significant differences are related to HPB-ALL cells. Results were analyzed by Student's t test (n = 4). (D) SU-DHL-1 cells were serum-starved for 2 h, applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. Results were analyzed by One-way

ANOVA, followed by Tukey post-test ($n = 3$). (E) SU-DHL-1 cells were serum-starved for 2 h and treated or not with W146 (100 μM). Cells were applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. Values correspond to specific migration after subtracting the numbers of migrating cells in culture medium only. Black bars correspond to pre-treatment with RPMI-BSA 0.1% alone and white bars correspond to pre-treatment with W146. Results were analyzed by unpaired Student's t test ($n = 3$). Results are expressed as mean \pm SEM and differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g006

induced a later AKT activation at 60 min (Fig 7B). Cells pre-treated with W146 did not present AKT phosphorylation.

A strong ERK1/2 activation was observed at doses of 10 and 1000 nM (at 10 and 60 min respectively), but only a slight activation at 100 nM. Pre-treatment of CEM cells with W146 also inhibited ERK1/2 activation (Fig 7C).

Despite a slight increase, no significant Rac1 activation was detected when CEM cells were stimulated with S1P 10 nM, whereas a decrease was detected at the end of kinetics (12 minutes post-stimulus) (Fig 7D-left panel). Interestingly, a decrease of Rac1 activity was observed when cells were stimulated with higher S1P concentrations (1000 nM). In contrast, CEM cells pre-treated with W146 presented an increase in Rac1 activation following S1P 1000 nM (Fig 7D-right panel). These data suggest that Rac activation or inhibition can be involved in the particular migratory responses (chemotaxis versus fugetaxis) following different doses of S1P.

Discussion

The migration of normal and neoplastic T-cell progenitors is guided by a variety of molecules and corresponding receptors. The T-ALL blasts used in this study expressed different amounts of S1P1 mRNA and were able to migrate toward different S1P concentrations. Migration of T-ALL blasts toward S1P 10 nM, a concentration largely used in the literature [18, 19, 36, 37], directly correlated with S1P1 gene expression. This is similar to what we have recently reported for S1P-driven migration of normal human thymocytes [20]. Experimental data in mice also showed that naive CD4⁺ T lymphocytes overexpressing S1P1 migrate more toward S1P 10 nM than wild type CD4⁺ lymphocytes. In addition, the transgenic cells still migrated toward different S1P concentrations when activated with anti-CD3 and anti-CD28, whereas wild type CD4⁺ T cells practically lose their migratory responses, together with a down regulation of S1P1 after activation [36].

In our study, S1P-driven migratory responses of T-ALL cells presented a bell-shaped dose-dependent pattern, with migration increasing from 1 nM to 100 nM and decreasing from 100 to 500 nM. Yet, the curves varied among T-ALL blasts, according to S1P1 gene expression levels. Similar results were described by Iino and colleagues, showing that JURKAT cells migrate toward S1P and the migratory response exhibits a bell-shaped curve [38]. Interestingly, it was reported that CD4 and CD8 L-selectin high single positive thymocytes [19], activated B lymphocytes, transduced with a retrovirus containing a flag-tagged S1P1 insert and a human CD4 reporter, [19, 37] and JURKAT cells [38] lose their migratory response driven by high S1P concentrations (1000 nM).

Our results lead us to investigate whether high doses of S1P1 were inhibiting cell migration (chemotaxis) or were inducing cell repulsion (fugetaxis). We verified that higher concentrations of S1P were actually repulsive to CEM cells and this effect was dependent on S1P1. Interestingly, no CEM chemokinesis was observed at high S1P concentrations, while low S1P concentration induced both chemokinesis and chemoattraction. Dose-dependent chemoattraction versus fugetaxis promoted by the same molecule have been described for chemokines. CXCL12, for example, is attractive to thymocytes when applied at low concentrations and repulsive at high concentrations [39]. IL-8 also induces both migratory processes, being

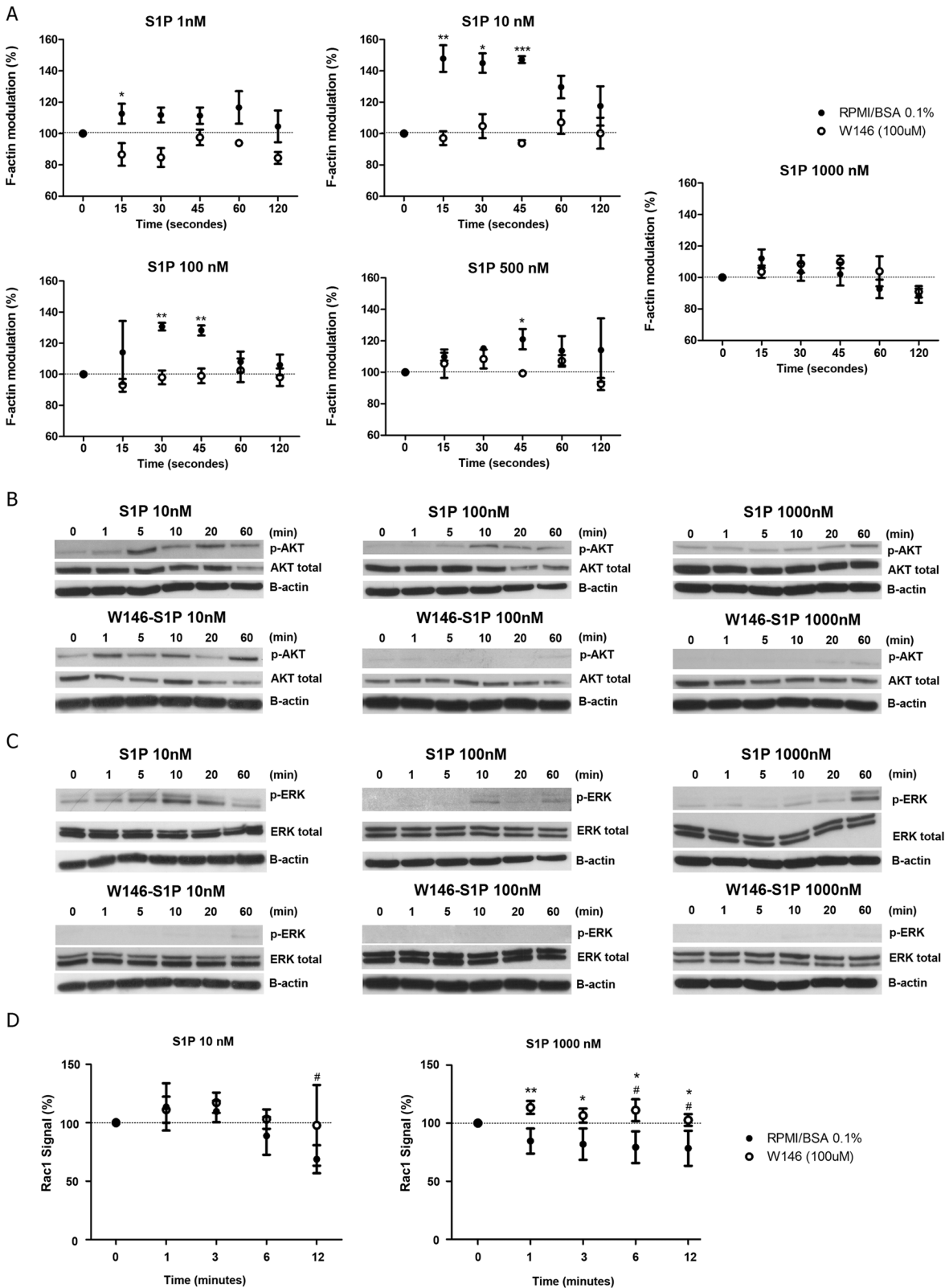


Fig 7. S1P modulates F-actin polymerization, AKT, ERK and Rac1 activity. (A) Modulation of the actin cytoskeleton after stimulation by different S1P concentrations in CEM cells pre-treated or not with W146 (100 μ M). Results are represented as [(MFI after addition of the ligand) / (MFI before addition of the ligand)] x 100. The MFI values obtained before the addition of S1P were arbitrarily set as 100% and correspond to the time zero. White circles correspond to

cells previously treated with W146 (100 μ M) and the black circles correspond to cells treated with RPMI-BSA 0.1%. Results are expressed by mean \pm SEM and were analyzed by unpaired Student's *t* test ($n = 3$). Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ (B) AKT and (C) ERK1/2 activation after stimulation of CEM cells, with different S1P concentrations, being pre-treated or not with W146 (100 μ M). Protein extracts were analyzed by Western-blot with AKT, phosphorylated-AKT, ERK1/2 and phosphorylated-ERK-1/2 specific antibodies. Representative western-blot images are shown ($n = 3$). (D) Rac1 activity after stimulation of CEM cells, pre-treated or not with W146 (100 μ M), with different S1P concentrations was accessed by G-LISA. Optical density (OD) was detected in 490 nm. Results are represented as [(OD after addition of the ligand) / (OD before addition of the ligand)] \times 100. OD values obtained before the addition of S1P were arbitrarily set as 100% and correspond to the time zero. Black circles correspond pre-treatment with RPMI-BSA 0.1% and white circles correspond to pre-treatment with W146 (100 μ M). Results and are expressed as mean \pm SEM. Differences between distinct time points and control (time zero) were analyzed by One-way ANOVA, followed by Dunnett post-test and were considered statistically significant when # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ or ### $p < 0.001$. Differences between pre-treatment with RPMI-BSA 0.1% and pre-treatment with W146 (100 μ M) were analyzed by unpaired Student T test ($n = 1$, with 2 biological replicates in duplicate). Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g007

attractive and repulsive to neutrophils [40]. Furthermore, it was described that S1P can be repulsive to osteoclast precursors in high concentrations (10^{-6} M) through S1P2 activation [41], although this effect has never been related to S1P1. The role of S1P2 in migratory responses away from S1P1 was not analyzed in this study since T-ALL blasts expressed very low mRNA levels for this receptor.

In a second vein, it was described, in CCL-23 cells expressing *c-myc*-tagged S1P1, that W146 treatment resulted in an increase in S1P1 membrane contents probably by inhibiting receptor internalization [42]. In a recent study conducted with B cell lymphoma cells, inhibition of CCR7 endocytosis reverted repulsion to attraction in high CCL19 concentration gradients [43]. The chemoattraction observed in high S1P concentrations after treatment with W146 might correspond to a reversion of migratory orientation.

Different responses of T-ALL blasts toward different S1P concentrations can help to explain previous data described in the literature. Through an experimental model of T-ALL/LBL on zebrafish, Feng and colleagues showed that treatment with W146 inhibited the generation of tumor cell clusters and induced blast dissemination [44]. In addition to the facts discussed above, this may also occur due to a break in S1P gradients, as shown in other studies with different pathologies [45, 46], triggered by an increase in S1P concentrations in the blood stream or in the tumor microenvironment, but also because of S1P-induced chemokinesis. Moreover, upregulation of S1P levels in tumor microenvironment could induce blasts dissemination, as S1P-driven fugetaxis was observed for high S1P concentrations. Therefore, it would be of interest to quantify S1P levels on the bloodstream and tumor of T-ALL and T-LBL *in vivo*.

SphK1 overexpression it was reported for lymphomas and leukemias, suggesting that these blasts could catalyze S1P production. Tissues from patients with non-Hodgkin's lymphoma presented higher SphK1 protein and mRNA levels than tissues from patients with reactive lymphoid hyperplasia [47]. Besides that, tumorigenic proerythroblasts presented an upregulation in SphK1 gene expression when compared with nontumorigenic proerythroblasts in a transgenic mouse model of erytroleukemia [48].

Currently, several studies concerning neoplastic cells search to understand cell signaling pathways involved in cell migration processes, since cell motility is directly correlated with invasive and metastatic capacity [49–51]. In addition, specific cell signaling pathways inhibitors have been widely screened for use in the treatment of various malignancies. In this context, we analyzed possible cell signaling pathways activated by S1P/S1P1 interaction in T-ALL blasts. We have previously observed F-actin modulation in normal human T lymphocytes when stimulated with S1P 10 nM; same concentration that induced cell migration upon these cells [20]. As expected, we observed F-actin polymerization in CEM when S1P was used at low concentrations and that modulation was mediated by S1P1. However, we did not observe F-actin modulation when cells were stimulated with high S1P concentrations, suggesting that actin polymerization may occur in a later stage.

S1P/S1P1 interaction can lead to the activation of AKT, ERK, and Rac1 [34, 35]. AKT and ERK activation has been implicated in cell survival and proliferation, respectively. AKT enhances the survival of lymphocytes and others immune cells by inhibiting apoptosis, whereas ERK modulates the proliferation of these cells [34]. In a second vein, it has shown ERK1/2 involvement on S1P-driven migration of DU145 cells, derived from prostate cancer [52]. By contrast, Li and colleagues have reported that ERK was not involved in WiT49 (Wilm's tumor cell line) cell migration after S1P exposure [27]. Our data shown that low and high S1P concentrations induced AKT and ERK1/2 phosphorylation and S1P1 was involved in the activation of both signaling pathways. CEM cells pre-treated with W146 did not exhibit ERK1/2 phosphorylation when stimulated with S1P, and AKT phosphorylation was prevented when cells were stimulated with high S1P concentrations. Furthermore, when CEM cells were stimulated with high S1P concentrations, AKT and ERK1/2 phosphorylation was seen in a later time point (60 minutes) than in cells stimulated with low S1P concentrations (5–10 minutes). These data are in accordance with our hypothesis that actin polymerization induced by higher S1P concentrations may be occurring in a later stage. It is noteworthy that S1P concentrations used in this work did not alter cell proliferation (until 72 hours—data not shown) and survival (until 48 hours—data not shown and S2 Fig).

The GTPase Rac is required for lymphocyte migration and cell-cell interactions [34, 53, 54]. Modulation of Rac1 activity under high S1P concentrations can be related to the migratory responses observed under the same conditions. CEM cells do not migrate toward high S1P concentrations, when we observed a decrease in Rac1 activity. In contrast, CEM cells pre-treated with W146 expressively migrate toward high S1P concentrations, when Rac1 activity was increased. Previous data indicated a concentration-dependent effect of S1P on Rac and Rho activation. In human pulmonary artery endothelial cells, 500 nM of S1P led to Rac activation, whereas higher S1P concentrations (5 μ M) led to Rho activation while occurs a decrease in Rac activation [55]. Induction of distinct signaling pathways was also reported for CXCL12/CXCR4 interactions. Treatment of T-lymphocytes with anti-CXCR4, PTX and Wortmannin (a PI3K inhibitor) prevented chemotaxis and fugetaxis induced by CXCL12, whereas treatment with tyrosine kinase inhibitors (genistein and herbimycin) prevented only the chemotactic migration [56]. Moreover, different calcium and cAMP levels can determine attraction or repulsion in neuron axon guidance [57]. Together these results suggest that chemotaxis and fugetaxis can activate distinct signaling pathways.

As actin polymerization and Rac activation were not observed when CEM cells were stimulated with S1P concentrations related to fugetaxis, another mechanism inducing cell migration, independent of actin cytoskeleton modulation, might be occurring, such as blebs [58]. Indeed, to confirm this hypothesis other signaling pathways involved in the regulation of actin polymerization need to be investigated, including GTPases Cdc42 and Rho [59, 60].

Signaling pathways involved in cell migration induced by S1P are also involved in other processes important for normal and neoplastic T-cell development, such as cell proliferation and survival [61]. This reinforces the therapeutic potential of targeting S1P-mediated interactions in T-ALL/LBL. For example, the SphK1/SphK2 inhibitor SKi reduces phosphorylated AKT and ERK levels and induces apoptotic death in T-ALL cell lines and primary human patient cells, although some sub-populations are resistant to death. Another SphK2-selective inhibitor (ROME) do not perturbs these signaling pathways but induces autophagic death of the same cells [62]. In this context, one can imagine that S1P production catalyzed by SphK1/SphK2 could not only promote cell survival through the activation of different signaling pathways but could also induce cell migration, depending on its concentration in the blasts niche. We observed that adding S1P to CEM cell cultures did not change the proliferation or survival rates even in micromolar doses (unpublished data), but S1P induced dose-dependent directed

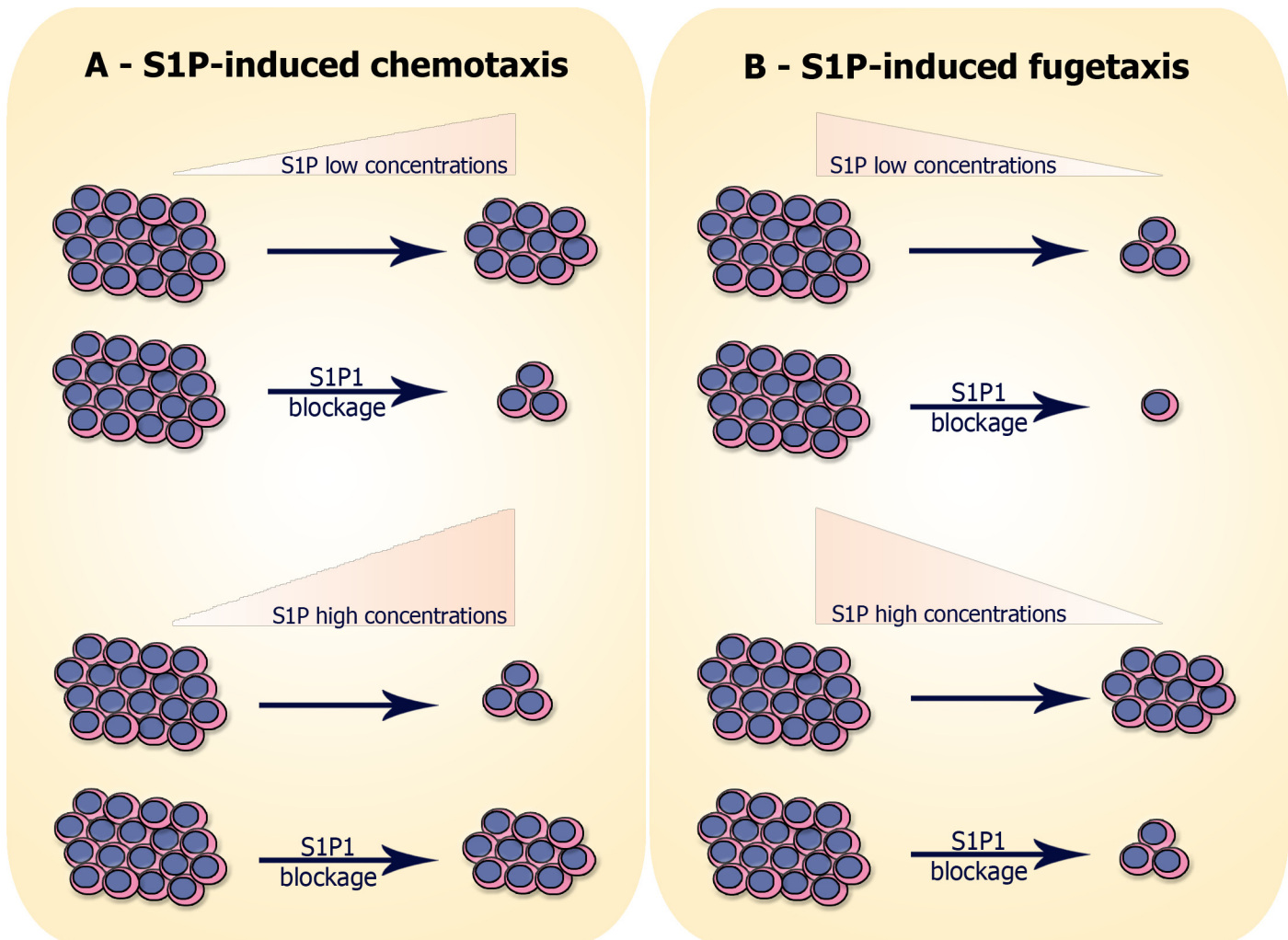


Fig 8. Hypothesis of S1P-induced migration of neoplastic T-cell progenitors: (A) S1P-induced chemotaxis: cells expressing S1P1 migrate toward low S1P concentrations (10–100 nM) and migration is inhibited when S1P1 is blocked with W146. In contrast, cells do not migrate toward high S1P concentrations (500–10000 nM), unless when S1P1 is blocked. (B) S1P-induced fugetaxis: cells expressing S1P1 do not migrate away from low S1P concentrations and the nonspecific migration observed is even smaller when S1P1 is blocked. However, cells migrate away from high S1P concentrations and migration is impaired when S1P1 is blocked.

doi:10.1371/journal.pone.0148137.g008

cell migration. We summarize our results on migratory responses of T-ALL blasts resulting in chemotaxis or fugetaxis in Fig 8.

Together, our results shed more light on the dynamics of T-ALL/LBL blasts migration and can benefit the development of therapeutical strategies using S1P and S1P1 blockers. Taking into account the diversity of cellular processes involved in S1P/S1P1 signaling, the strategies may include induction of cell death, diminution of proliferation and prevention of blast dissemination, which can be resultant of chemotaxis or fugetaxis.

Supporting Information

S1 Fig. S1P1 gene expression and S1P-driven migration are directly correlated in T-ALL blasts. (A) mRNA expression of S1P1 in T-ALL cell lines. mRNA expression was analyzed by real time quantitative PCR and compared with the control Abelson (Abl) gene ($2^{-\Delta Ct}$). $n = 1-2$, with 3–6 biological replicates. (B) Cell migration in Transwell™ chambers was analyzed using

S1P 10 nM. Values correspond to specific migration after subtracting the numbers of migrating cells obtained for each cell line in wells with culture medium only. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 3). (C) Linear regression of S1P1 mRNA expression and migrating cells. (TIF)

S2 Fig. S1P, W146 and BML-241 are not toxic to T-ALL blasts. After migration assays, (A) T-ALL blasts cells (B) CEM cells (C) SU-DHL-1 cells and again (D) CEM cells, but this time blocked with W146 and/or BML-241, that were not able to migrate toward different S1P concentrations, were collected and stained with Annexin-V-APC and propidium iodide; being further analyzed by flow cytometry. Results correspond to relative number (%) of live cells (Annexin-V-APC⁻ PI⁻) and are expressed as mean \pm SEM. Black bars correspond to pre-treatment with RPMI-BSA 0.1%; white bars correspond to pre-treatment with W146; grid bars correspond to pre-treatment with BML-241; and chess bars correspond to pre-treatment with W146 plus BML-241. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by One-way ANOVA, followed by Tukey post-test and by unpaired Student T test (n = 3). Differences were considered statistically significant when * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Leandra Linhares Lacerda for technical assistance; the Real-time PCR PDTIS platform (RPT09A) from Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil and Dr. Loic Dupré (Purpan University Hospital, Toulouse, France) for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CVM ESVV JPL VCA WS DAMC. Performed the experiments: CVM ESVV JPL DAMC. Analyzed the data: CVM ESVV JPL OCM VCA WS DAMC. Contributed reagents/materials/analysis tools: OCM VCA WS DAMC. Wrote the paper: CVM JPL VCA WS DAMC.

References

1. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*. 2007; 115(1):84–105. doi: [10.1016/j.pharmthera.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.006) PMID: [17561264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17561264/).
2. Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science*. 2010; 328(5982):1129–35. Epub 2010/04/24. doi: [science.1188222](https://doi.org/10.1126/science.1188222) [pii] doi: [10.1126/science.1188222](https://doi.org/10.1126/science.1188222) PMID: [20413455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20413455/); PubMed Central PMCID: [PMC3107339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3107339/).
3. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007; 316(5822):295–8. Epub 2007/03/17. doi: [1139221](https://doi.org/10.1126/science.1139221) [pii] doi: [10.1126/science.1139221](https://doi.org/10.1126/science.1139221) PMID: [17363629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17363629/).
4. Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 688:141–55. Epub 2010/10/06. PMID: [20919652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20919652/); PubMed Central PMCID: [PMC2951632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2951632/).
5. Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Prog Lipid Res*. 2003; 42(4):344–57. Epub 2003/06/07. PMID: [12790117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12790117/).
6. Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(7):489–97. Epub 2010/06/19. doi: [nchembio.392](https://doi.org/10.1038/nchembio.392) [pii] doi: [10.1038/nchembio.392](https://doi.org/10.1038/nchembio.392) PMID: [20559316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559316/); PubMed Central PMCID: [PMC3001344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3001344/).
7. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of lipid research*. 2014; 55(8):1596–608. doi: [10.1194/jlr.R046300](https://doi.org/10.1194/jlr.R046300) PMID: [24459205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24459205/); PubMed Central PMCID: [PMC4109755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4109755/).

8. Tabasinezhad M, Samadi N, Ghanbari P, Mohseni M, Saei AA, Sharifi S, et al. Sphingosin 1-phosphate contributes in tumor progression. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2013; 9(4):556–63. doi: [10.4103/0973-1482.126446](https://doi.org/10.4103/0973-1482.126446) PMID: [24518696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24518696/).
9. Kohno M, Momoi M, Oo ML, Paik JH, Lee YM, Venkataraman K, et al. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(19):7211–23. Epub 2006/09/19. doi: [10.1128/MCB.02341-05](https://doi.org/10.1128/MCB.02341-05) PMID: [16980623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16980623/); PubMed Central PMCID: PMC1592880.
10. Gao P, Smith CD. Ablation of sphingosine kinase-2 inhibits tumor cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res*. 2011; 9(11):1509–19. Epub 2011/09/08. doi: [1541-7786.MCR-11-0336](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0336) PMID: [21896638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21896638/); PubMed Central PMCID: PMC3219805.
11. Guan H, Liu L, Cai J, Liu J, Ye C, Li M, et al. Sphingosine kinase 1 is overexpressed and promotes proliferation in human thyroid cancer. *Mol Endocrinol*. 2011; 25(11):1858–66. Epub 2011/09/24. doi: [10.1210/me.2011-1048](https://doi.org/10.1210/me.2011-1048) [pii]. PMID: [21940753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21940753/).
12. Park KS, Kim MK, Lee HY, Kim SD, Lee SY, Kim JM, et al. S1P stimulates chemotactic migration and invasion in OVCAR3 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356(1):239–44. Epub 2007/03/14. doi: [S0006-291X\(07\)00421-4](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.112) [pii] doi: [10.1016/j.bbrc.2007.02.112](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.112) PMID: [17349972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17349972/).
13. Bao M, Chen Z, Xu Y, Zhao Y, Zha R, Huang S, et al. Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012; 32(2):331–8. doi: [10.1111/j.1478-3231.2011.02666.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02666.x) PMID: [22098666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098666/).
14. Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, Garcia V, et al. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res*. 2005; 65(24):11667–75. Epub 2005/12/17. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-05-2702](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2702) PMID: [16357178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16357178/).
15. Sukocheva O, Wang L, Verrier E, Vadas MA, Xia P. Restoring endocrine response in breast cancer cells by inhibition of the sphingosine kinase-1 signaling pathway. *Endocrinology*. 2009; 150(10):4484–92. doi: [10.1210/en.2009-0391](https://doi.org/10.1210/en.2009-0391) PMID: [19706837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19706837/).
16. Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *British journal of pharmacology*. 2014; 171(15):3575–94. doi: [10.1111/bph.12678](https://doi.org/10.1111/bph.12678) PMID: [24602016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24602016/); PubMed Central PMCID: PMC4128058.
17. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*. 2005; 309(5741):1735–9. Epub 2005/09/10. doi: [309/5741/1735](https://doi.org/10.1126/science.1113640) [pii] doi: [10.1126/science.1113640](https://doi.org/10.1126/science.1113640) PMID: [16151014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151014/).
18. Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(15):15396–401. doi: [10.1074/jbc.M314291200](https://doi.org/10.1074/jbc.M314291200) PMID: [14732704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14732704/).
19. 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. doi: [10.1038/nature02284](https://doi.org/10.1038/nature02284) PMID: [14737169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14737169/).
20. Mendes-da-Cruz DA, Brignier AC, Asnafi V, Baleyrier F, Messias CV, Lepelletier Y, et al. Semaphorin 3F and neuropilin-2 control the migration of human T-cell precursors. *PloS one*. 2014; 9(7):e103405. doi: [10.1371/journal.pone.0103405](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103405) PMID: [25068647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25068647/); PubMed Central PMCID: PMC4113369.
21. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23(4):655–74. Epub 2009/07/07. doi: [S0889-8588\(09\)00085-9](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009) [pii] doi: [10.1016/j.hoc.2009.04.009](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009) PMID: [19577163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19577163/).
22. Morikawa S, Tatsumi E, Baba M, Harada T, Yasuhira K. Two E-rosette-forming lymphoid cell lines. *Int J Cancer*. 1978; 21(2):166–70. Epub 1978/02/15. PMID: [203546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203546/).
23. Minowada J, Onuma T, Moore GE. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1972; 49(3):891–5. Epub 1972/09/01. PMID: [4567231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4567231/).
24. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 1977; 19(5):621–6. Epub 1977/05/15. PMID: [68013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/68013/).
25. Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE. Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer*. 1965; 18:522–9. Epub 1965/04/01. PMID: [14278051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14278051/).
26. Epstein AL, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas. *Cancer*. 1974; 34(6):1851–72. PMID: [4140017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4140017/).

27. Li MH, Sanchez T, Yamase H, Hla T, Oo ML, Pappalardo A, et al. S1P/S1P1 signaling stimulates cell migration and invasion in Wilms tumor. *Cancer Lett.* 2009; 276(2):171–9. Epub 2009/01/10. doi: [10.1016/j.canlet.2008.11.025](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.025) PMID: [19131156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131156/); PubMed Central PMCID: PMC2943759.
28. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003; 17(12):2474–86. Epub 2003/10/17. doi: [10.1038/sj.leu.24031362403136](https://doi.org/10.1038/sj.leu.24031362403136) [pii]. PMID: [14562124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14562124/).
29. Brocklyn JR. Regulation of cancer cell migration and invasion by sphingosine-1-phosphate. *World J Biol Chem.* 2010; 1(10):307–12. Epub 2011/05/04. doi: [10.4331/wjbc.v1.i10.307](https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i10.307) PMID: [21537464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21537464/); PubMed Central PMCID: PMC3083934.
30. Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol.* 2006; 2(8):434–41. Epub 2006/07/11. doi: [nchembio804](https://doi.org/10.1038/nchembio804) [pii] doi: [10.1038/nchembio804](https://doi.org/10.1038/nchembio804) PMID: [16829954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829954/).
31. Gonzalez-Cabrera PJ, Hla T, Rosen H. Mapping pathways downstream of sphingosine 1-phosphate subtype 1 by differential chemical perturbation and proteomics. *J Biol Chem.* 2007; 282(10):7254–64. Epub 2007/01/16. doi: [M610581200](https://doi.org/10.1074/jbc.M610581200) [pii] doi: [10.1074/jbc.M610581200](https://doi.org/10.1074/jbc.M610581200) PMID: [17218309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17218309/).
32. Gonzalez-Cabrera PJ, Jo E, Sanna MG, Brown S, Leaf N, Marsolais D, et al. Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Mol Pharmacol.* 2008; 74(5):1308–18. Epub 2008/08/19. doi: [mol.108.049783](https://doi.org/10.1124/mol.108.049783) [pii] doi: [10.1124/mol.108.049783](https://doi.org/10.1124/mol.108.049783) PMID: [18708635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18708635/); PubMed Central PMCID: PMC2575047.
33. Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(1):30–48. Epub 2003/01/15. PMID: [12525560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12525560/).
34. Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature reviews Immunology.* 2005; 5(7):560–70. doi: [10.1038/nri1650](https://doi.org/10.1038/nri1650) PMID: [15999095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15999095/).
35. Cuvillier O. [Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology]. *Medecine sciences: M/S.* 2012; 28(11):951–7. doi: [10.1051/medsci/20122811013](https://doi.org/10.1051/medsci/20122811013) PMID: [23171898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23171898/).
36. Graler MH, Huang MC, Watson S, Goetzl EJ. Immunological effects of transgenic constitutive expression of the type 1 sphingosine 1-phosphate receptor by mouse lymphocytes. *J Immunol.* 2005; 174(4):1997–2003. Epub 2005/02/09. doi: [174/4/1997](https://doi.org/10.1172/JCI13853) [pii]. PMID: [15699128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15699128/).
37. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med.* 2005; 201(2):291–301. Epub 2005/01/20. doi: [jem.20041509](https://doi.org/10.1084/jem.20041509) [pii] doi: [10.1084/jem.20041509](https://doi.org/10.1084/jem.20041509) PMID: [15657295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15657295/); PubMed Central PMCID: PMC2212802.
38. Iino J, Osada M, Kurano M, Kaneko M, Ohkawa R, Satoh Y, et al. Platelet-derived sphingosine 1-phosphate induces migration of Jurkat T cells. *Lipids in health and disease.* 2014; 13:150. doi: [10.1186/1476-511X-13-150](https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-150) PMID: [25253303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25253303/); PubMed Central PMCID: PMC4193286.
39. Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, et al. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest.* 2002; 109(8):1101–10. Epub 2002/04/17. doi: [10.1172/JCI13853](https://doi.org/10.1172/JCI13853) PMID: [11956248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956248/); PubMed Central PMCID: PMC150941.
40. Tharp WG, Yadav R, Irimia D, Upadhyaya A, Samadani A, Hurtado O, et al. Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology.* 2006; 79(3):539–54. doi: [10.1189/jlb.0905516](https://doi.org/10.1189/jlb.0905516) PMID: [16365152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16365152/).
41. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *The Journal of experimental medicine.* 2010; 207(13):2793–8. doi: [10.1084/jem.20101474](https://doi.org/10.1084/jem.20101474) PMID: [21135136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135136/); PubMed Central PMCID: PMC3005230.
42. Tarrason G, Auli M, Mustafa S, Dolgachev V, Domenech MT, Prats N, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor-1 antagonist, W146, causes early and short-lasting peripheral blood lymphopenia in mice. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(11):1773–9. Epub 2011/07/30. doi: [S1567-5769\(11\)00277-3](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.07.004) [pii] doi: [10.1016/j.intimp.2011.07.004](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.07.004) PMID: [21798372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798372/).
43. Malet-Engra G, Yu W, Oldani A, Rey-Barroso J, Gov NS, Scita G, et al. Collective cell motility promotes chemotactic prowess and resistance to chemorepulsion. *Curr Biol.* 2015; 25(2):242–50. doi: [10.1016/j.cub.2014.11.030](https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.030) PMID: [25578904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25578904/).
44. Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L, Sanda T, et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell.* 2010; 18(4):353–66. Epub 2010/10/19. doi: [S1535-6108\(10\)00346-6](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.009) [pii] doi: [10.1016/j.ccr.2010.09.009](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.009) PMID: [20951945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20951945/); PubMed Central PMCID: PMC3003429.

45. Sattler KJ, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Graler MH, et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 2010; 105(6):821–32. Epub 2010/07/24. doi: [10.1007/s00395-010-0112-5](https://doi.org/10.1007/s00395-010-0112-5) PMID: [20652276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20652276/).
46. Nunes J, Naymark M, Sauer L, Muhammad A, Keun H, Sturge J, et al. Circulating sphingosine-1-phosphate and erythrocyte sphingosine kinase-1 activity as novel biomarkers for early prostate cancer detection. *British journal of cancer*. 2012; 106(5):909–15. doi: [10.1038/bjc.2012.14](https://doi.org/10.1038/bjc.2012.14) PMID: [22315056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315056/); PubMed Central PMCID: PMC3305969.
47. Bayerl MG, Bruggeman RD, Conroy EJ, Hengst JA, King TS, Jimenez M, et al. Sphingosine kinase 1 protein and mRNA are overexpressed in non-Hodgkin lymphomas and are attractive targets for novel pharmacological interventions. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49(5):948–54. Epub 2008/05/03. doi: [10.1080/10428190801911654](https://doi.org/10.1080/10428190801911654) PMID: [18452097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18452097/).
48. Le Scolan E, Pchejetski D, Banno Y, Denis N, Mayeux P, Vainchenker W, et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood*. 2005; 106(5):1808–16. Epub 2005/05/14. doi: [10.1182/blood-2004-12-4832](https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4832) [pii] doi: [10.1182/blood-2004-12-4832](https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4832) PMID: [15890687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890687/).
49. Lee CJ, Lee MH, Yoo SM, Choi KI, Song JH, Jang JH, et al. Magnolin inhibits cell migration and invasion by targeting the ERKs/RSK2 signaling pathway. *BMC Cancer*. 2015; 15:576. doi: [10.1186/s12885-015-1580-7](https://doi.org/10.1186/s12885-015-1580-7) PMID: [26253302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253302/); PubMed Central PMCID: PMC4529708.
50. Di J, Huang H, Qu D, Tang J, Cao W, Lu Z, et al. Rap2B promotes proliferation, migration, and invasion of human breast cancer through calcium-related ERK1/2 signaling pathway. *Sci Rep*. 2015; 5:12363. doi: [10.1038/srep12363](https://doi.org/10.1038/srep12363) PMID: [26201295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26201295/); PubMed Central PMCID: PMC4512009.
51. He SQ, Gao M, Fu YF, Zhang YN. Glycyrrhizic acid inhibits leukemia cell growth and migration via blocking AKT/mTOR/STAT3 signaling. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(5):5175–81. PMID: [26191214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26191214/); PubMed Central PMCID: PMC4503086.
52. Sekine Y, Suzuki K, Remaley AT. HDL and sphingosine-1-phosphate activate stat3 in prostate cancer DU145 cells via ERK1/2 and S1P receptors, and promote cell migration and invasion. *Prostate*. 2011; 71(7):690–9. Epub 2010/10/28. doi: [10.1002/pros.21285](https://doi.org/10.1002/pros.21285) PMID: [20979115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20979115/).
53. Matsuyuki H, Maeda Y, Yano K, Sugahara K, Chiba K, Kohno T, et al. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol*. 2006; 3(6):429–37. PMID: [17257496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257496/).
54. McVerry BJ, Garcia JG. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell Signal*. 2005; 17(2):131–9. doi: [10.1016/j.cellsig.2004.08.006](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.08.006) PMID: [15494205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15494205/).
55. Shikata Y, Birukov KG, Garcia JG. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol* (1985). 2003; 94(3):1193–203. doi: [10.1152/jappphysiol.00690.2002](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00690.2002) PMID: [12482769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12482769/).
56. Poznansky MC, Olszak IT, Foxall R, Evans RH, Luster AD, Scadden DT. Active movement of T cells away from a chemokine. *Nature medicine*. 2000; 6(5):543–8. doi: [10.1038/75022](https://doi.org/10.1038/75022) PMID: [10802710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802710/).
57. Forbes EM, Thompson AW, Yuan J, Goodhill GJ. Calcium and cAMP levels interact to determine attraction versus repulsion in axon guidance. *Neuron*. 2012; 74(3):490–503. doi: [10.1016/j.neuron.2012.02.035](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.035) PMID: [22578501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22578501/).
58. Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Current opinion in cell biology*. 2013; 25(5):582–90. doi: [10.1016/j.ceb.2013.05.005](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.005) PMID: [23786923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786923/); PubMed Central PMCID: PMC3989058.
59. Rottner K, Stradal TE. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Current opinion in cell biology*. 2011; 23(5):569–78. doi: [10.1016/j.ceb.2011.07.003](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.07.003) PMID: [21807492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21807492/).
60. Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal*. 2013; 25(10):1955–61. doi: [10.1016/j.cellsig.2013.04.009](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009) PMID: [WOS:000322943700003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/WOS:000322943700003/).
61. Pyne NJ, McNaughton M, Boomkamp S, MacRitchie N, Evangelisti C, Martelli AM, et al. Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation. *Adv Biol Regul*. 2015. doi: [10.1016/j.jbior.2015.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.09.001) PMID: [26429117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26429117/).
62. Evangelisti C, Evangelisti C, Teti G, Chiarini F, Falconi M, Melchionda F, et al. Assessment of the effect of sphingosine kinase inhibitors on apoptosis, unfolded protein response and autophagy of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells; indications for novel therapeutics. *Oncotarget*. 2014; 5(17):7886–901. doi: [10.18632/oncotarget.2318](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2318) PMID: [25226616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25226616/); PubMed Central PMCID: PMC4202168.

8.2 Anexo 2

Artigo “Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Is Involved in Non-Obese Diabetic Mouse Thymocyte Migration Disorders” *International Journal of Molecular Sciences* (doi: 10.3390/ijms19051446), 2018. Neste documento, publicamos grande parte dos resultados aqui apresentados. Demonstramos que os timócitos de camundongos NOD apresentam uma importante diminuição na expressão de SIP1 e que a expressão do receptor reflete na resposta quimiotática ao ligante natural, SIP. Além disso, demonstramos que a menor expressão de SIP1 se dá majoritariamente em timócitos maduros CD62L^{hi} que não expressam VLA-5 e sugerimos que ambos os receptores podem estar envolvidos nos distúrbios de migração observados no timo de camundongos NOD, no contexto do desenvolvimento do diabetes tipo I.



Article

Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Is Involved in Non-Obese Diabetic Mouse Thymocyte Migration Disorders

Julia P. Lemos ^{1,2}, Salette Smaniotto ^{2,3} , Carolina V. Messias ^{1,2}, Otacilio C. Moreira ⁴, Vinicius Cotta-de-Almeida ^{1,2} , Mireille Dardenne ⁵, Wilson Savino ^{1,2} and Daniella A. Mendes-da-Cruz ^{1,2,*}

¹ Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; j.lemos@ioc.fiocruz.br (J.P.L.); cmessias@ioc.fiocruz.br (C.V.M.); vca@ioc.fiocruz.br (V.C.-d.-A.); savino@fiocruz.br (W.S.)

² National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; smaniotto@icbs.ufal.br

³ Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas 57000-001, Brazil

⁴ Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; otacilio@ioc.fiocruz.br

⁵ French National Center for Scientific Research (CNRS), Mixed Research Unit (UMR) 8147, Paris Descartes University, 75006 Paris, France; mireille.dardenne@free.fr

* Correspondence: daniella@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-2562-1248

Received: 2 February 2018; Accepted: 27 February 2018; Published: 12 May 2018

Abstract: NOD (non-obese diabetic) mice spontaneously develop type 1 diabetes following T cell-dependent destruction of pancreatic β cells. Several alterations are observed in the NOD thymus, including the presence of giant perivascular spaces (PVS) filled with single-positive (SP) CD4⁺ and CD8⁺ T cells that accumulate in the organ. These cells have a decreased expression of membrane CD49e (the $\alpha 5$ integrin chain of the fibronectin receptor VLA-5 (very late antigen-5)). Herein, we observed lower sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) expression in NOD mouse thymocytes when compared with controls, mainly in the mature SP CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations bearing the CD49e⁻ phenotype. In contrast, differences in S1P1 expression were not observed in mature CD49e⁺ thymocytes. Functionally, NOD CD49e⁻ thymocytes had reduced S1P-driven migratory response, whereas CD49e⁺ cells were more responsive to S1P. We further noticed a decreased expression of the sphingosine-1-phosphate lyase (SGPL1) in NOD SP thymocytes, which can lead to a higher sphingosine-1-phosphate (S1P) expression around PVS and S1P1 internalization. In summary, our results indicate that the modulation of S1P1 expression and S1P/S1P1 interactions in NOD mouse thymocytes are part of the T-cell migratory disorder observed during the pathogenesis of type 1 diabetes.

Keywords: non-obese diabetic mice; thymus; sphingosine-1-phosphate; sphingosine-1-phosphate receptor 1; VLA-5 (very late antigen-5); cell migration

1. Introduction

NOD (non-obese diabetic) mice spontaneously develop type I diabetes (T1D) as a result of the autoreactive destruction of the insulin-producing β cells in the pancreatic islets. The NOD mouse strain provided a wealth of knowledge of the processes involved in autoimmune diabetes etiology and is one of the most used mouse models due to the similarity with human disease [1]. The disease is preceded by a progressive pancreatic inflammatory infiltrate called insulinitis, constituted mainly of

T cells [2], suggesting a primary role of these cells in diabetes onset. This role is also supported by several studies showing that (1) *in vivo* treatment with anti-CD4 prevents spontaneous T1D; (2) splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells from diabetic NOD mice can transfer the disease and; (3) neonatal thymectomy prevents T1D onset [3].

T cells precursors develop within the thymus, where they interact with different components of thymic microenvironment during the migratory process that parallels T cell differentiation [4]. Several disorders were identified in the NOD thymus, such as changes in the arrangement of cortical and medullary epithelial cells network, an increase in the deposition of extracellular matrix molecules (ECM) such as fibronectin and laminin and the presence of giant perivascular spaces (PVS), which are up to ten times larger than in normal animals. Giant PVS are filled with mature single-positive (SP) CD4⁺, CD8⁺ [5] and FoxP3⁺ regulatory T cells [6]. These cells are reported to present a defect in the membrane expression of VLA-5 (very late antigen-5, the $\alpha 5\beta 1$ integrin), a fibronectin receptor, suggesting the involvement of this molecule in thymocyte accumulation within the organ [6–8]. Conversely, the formation of giant PVS in the NOD thymus seems to result from a progressive accumulation of mature T cells, as *in vivo* experiments showed similar rates of fluorescein isothiocyanate (FITC)-stained recent thymic emigrants in NOD peripheral lymphoid organs when compared with controls [7], indicating that other cell migration-related molecules could be involved in this process.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid, produced mainly by endothelial cells [9], pericytes [10] and erythrocytes [11]. When binding to one of its five receptors (S1P1–5), S1P participates in various cellular processes, such as proliferation, adhesion, death and migration [12,13]. S1P1, S1P2 and S1P3 are ubiquitously expressed, while S1P4 and S1P5 expression is restricted to some cellular types [13]. S1P1 is widely expressed, mainly in endothelial cells, brain, heart and immune cells [14,15]. S1P1 signaling in T cells suppresses proliferation and cytokine production and regulates cell migration [9,16], promoting chemotaxis or fugetaxis depending on the S1P concentration [17]. Accordingly, several studies demonstrate the essential role of S1P and S1P1 in cell migration and, mainly, in the egress of T cells from the thymus to peripheral lymphoid organs. Indeed, S1P1 knockout progenitor T cells are able to enter the thymus and differentiate normally; however, mature T cells cannot leave the organ and are not found in blood and peripheral lymphoid organs [18]. In addition, CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes present lower S1P1 membrane expression levels compared with mature CD4⁺ or CD8⁺ SP thymocytes, which present increased migration response towards S1P. Thymocytes increase S1P1 expression during differentiation and leave the organ following a S1P gradient, which is more concentrated in the blood than in the lymphoid organs [12]. Thus, the S1P1 works as a major receptor driving the output of lymphocytes from lymphoid organs under stimulation followed by its internalization, which prevents a constitutive signaling in an environment with high levels of S1P [19]. Biosynthesis of S1P is regulated by sphingosine-kinases and S1P-phosphatases, besides irreversibly degradation by S1P lyase that maintains the gradient of S1P between the compartments. Therefore, high concentrations of S1P in the blood and lymph together with low concentrations within lymphoid organs sustain a constant flow of lymphocytes from lymphoid organs [20].

There is no evidence of the putative role of S1P1 and its physiological ligand, S1P, in the NOD thymus, particularly in the events that precede the onset of T1D, and how this receptor impacts T cell migration and accumulation within the NOD thymus. To address these issues, we investigated herein S1P1 expression and its functional role in thymocyte migration in pre-diabetic NOD mice. We found that NOD mouse thymocytes have decreased expression of S1P1, mainly within mature CD49e⁻ ($\alpha 5$ integrin chain) cells. Functional migration assays revealed that NOD CD62L^{hi}CD49e⁻ thymocytes migrate less towards different concentrations of S1P, differing from the CD62L^{hi}CD49e⁺ cells that migrate more than controls under the same conditions. Our data indicate that S1P1 is involved in the abnormal NOD thymocyte migration, possibly being associated with the lower VLA-5 expression in NOD thymocytes.

2. Results

2.1. Decreased S1P1 Expression in NOD Thymocytes

We first analyzed S1P1 expression in NOD mouse thymocytes. As expected and observed by others [12], we observed by flow cytometry that SP thymocytes express higher levels of S1P1 than DP cells in control C57BL/6 mice (Figure 1A). The same kind of difference, between DP and SP subpopulations, was seen in NOD mouse thymocytes. Nevertheless, in this case the expression of S1P1 was lower in CD4⁺ and CD8⁺ SP cells when compared with the correlated subpopulations of C57BL/6 mice (Figure 1A). The reduced expression of S1P1 was more evident in CD8⁺ cells (51.3% of decrease) than in CD4⁺ cells (36.7%). In agreement with flow cytometry results, immunohistochemistry revealed a high expression level of S1P1 in the medullary region of C57BL/6 (Figure 1B,C, right panel) and NOD mouse thymi, as well as within NOD giant PVS (Figure 1B,C, left panel), when comparing with the cortical region. Yet, no differences were detected when comparing the S1P1 immunostaining density in the medulla with the values seen in giant PVS (Figure 1C, left panel).

We also investigated whether the mRNA S1P1 expression correlated with the diminished protein expression in NOD thymocytes. Despite the decreased expression of the receptor when compared with C57BL/6 mice, we found a higher S1P1 mRNA expression in NOD total and CD8⁺ SP thymocytes (Figure S1), suggesting that the impairment in the receptor expression occurs only at protein level and may lead to a positive transcriptional regulation of the S1P1 gene.

We next evaluated the expression of S1P1 in more mature SP thymocytes. We observed an important increase in the percentage and absolute numbers of CD62L^{hi} cells in NOD mouse thymus (Figure 2A,B), in keeping with the accumulation of mature thymocytes within giant PVS [6]. Interestingly, both SP CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} NOD thymocytes presented a decrease in S1P1 expression (Figure 2C) as well as an important decrease in CD49e expression (Figure 2D,E), when compared with controls. In addition, those NOD SP CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} cells that did not express CD49e exhibited decreased expression of S1P1 when compared with controls, whereas CD49e⁺CD4⁺CD62L^{hi} and CD49e⁺CD8⁺CD62L^{hi} cells had no significant differences in S1P1 expression densities (Figure 2F,G).

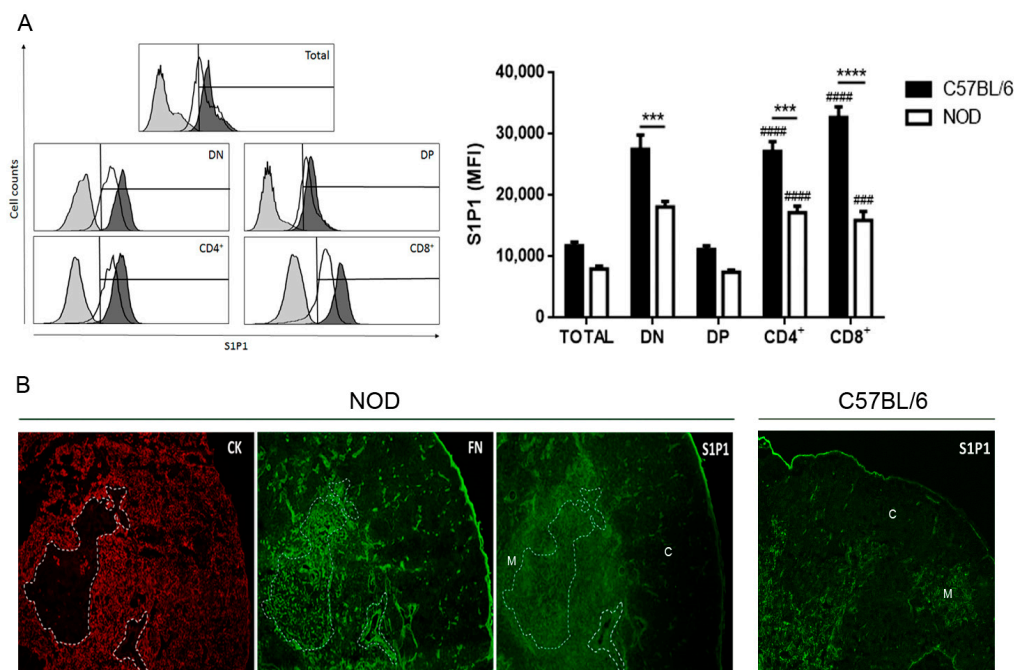


Figure 1. Cont.

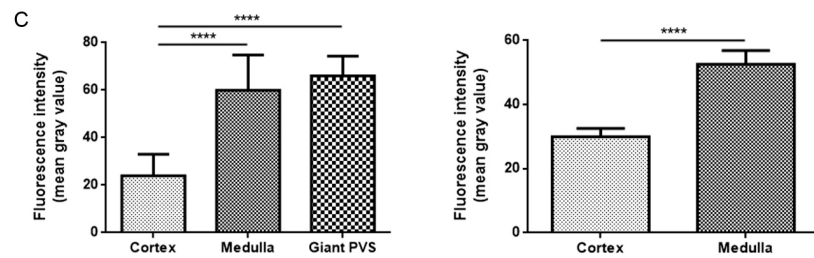


Figure 1. Decreased expression of sphingosine-1-phosphate (S1P1) in non-obese diabetic (NOD) mouse thymocytes. Panel (A) shows the S1P1 expression in CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. The histograms show the S1P1 representative staining in NOD (white curve) and C57BL/6 (black curve) thymocyte subpopulations. Grey curves represent the negative staining control for C57BL/6 and the region marks the positive staining. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by 2-way ANOVA followed by Tukey’s post-test. Differences were considered statistically significant when *** or ### $p < 0.001$; **** or #### $p < 0.0001$. Asterisks represent statistical significance between C57BL/6 and NOD subpopulations; hash marks represent statistical significance between DP and SP subpopulations in the same mouse strain, after evaluating 3 C57BL/6 and 4 NOD thymi. (B) immunohistochemistry showing the S1P1, fibronectin (FN) and cytokeratin (CK) expression profile in NOD and S1P1 expression in C57BL/6 thymus sections. The white dashed lines delimit the giant PVS. C = cortical region; M = medullary region. Three thymi per group were evaluated, with 1 cryosection being analyzed. Original magnification, ×100. (C) S1P1 fluorescence intensity in the cortex, medulla and giant PVS of NOD (left graph) and in the cortex and medulla of C57BL/6 (right graph) mice, represented by the mean grey value. **** $p < 0.0001$.

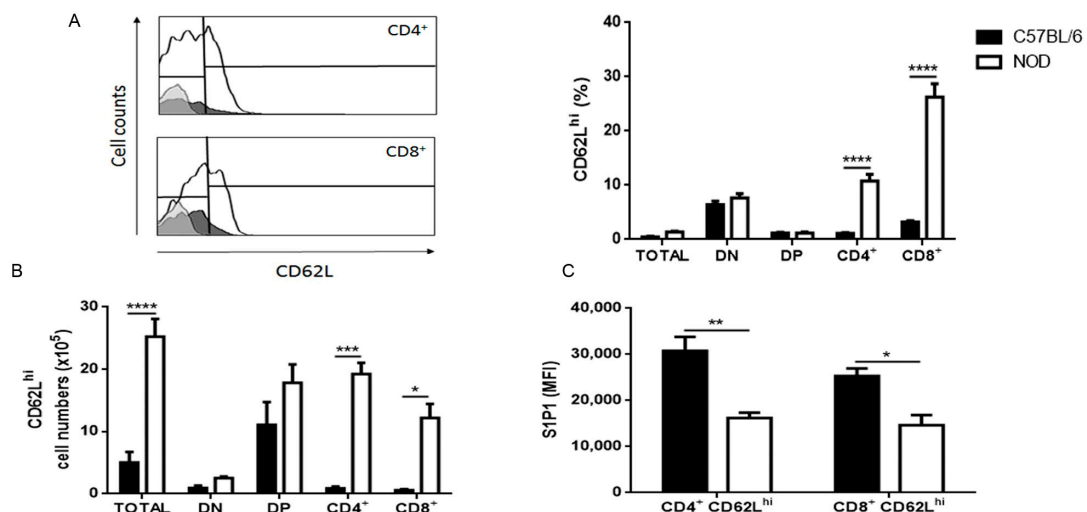


Figure 2. Cont.

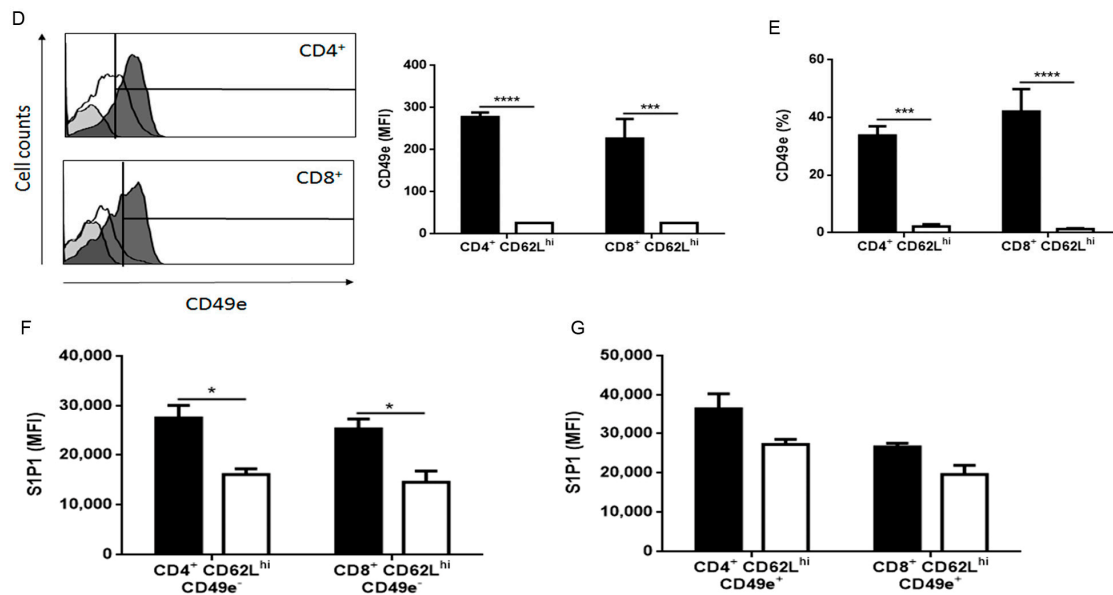


Figure 2. NOD CD62L^{hi} mature thymocytes have decreased expression of S1P1. The graphs show CD62L, S1P1 and CD49e expression in CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A) CD62L relative cell numbers (%); (B) CD62L absolute cell numbers; (C) S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations; (D) CD49e expression in CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations, (E) percentage of CD4⁺ and CD8⁺CD62L^{hi} cells expressing CD49e; (F) S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ cells; and (G) S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ cells. Histograms show the CD62L (A) and CD49e (D) staining in NOD (white curve) and C57BL/6 (black curve) CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes. The grey curves represent the negative staining control for C57BL/6. The region marks the positive staining in the case of CD49e and the neg/lo vs. hi (negative/ low vs. high) populations in the CD62L histograms. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity; % = relative cell numbers. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by 2-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 3$ C57BL/6; $n = 4$ NOD.

Interestingly, when we analyzed the less mature SP CD4⁺CD62L^{neg/lo} and CD8⁺CD62L^{neg/lo} subpopulations, we found that both NOD CD49e⁻ and CD49e⁺ cells had lower expression of S1P1 (Figure S2A,B), suggesting that maturation of the VLA-5⁺ cells from CD62L^{neg/lo} to the CD62L^{hi} phenotype could be observed by the upregulation in S1P1 expression, although this profile was observed only in NOD CD4⁺ SP cells (Figure S2C,D).

We also analyzed S1P1 expression in mice at 4 weeks of age, an age-point corresponding with the beginning of many alterations found in NOD mice, including the formation of enlarged PVSs [21–25]. Curiously, we found no differences in any of the populations investigated (Figures S3A–F and S4A–F), suggesting that the decreased expression of S1P1 appears late in NOD mouse life and after the VLA-5 defect. Together, these results indicate that the reduced expression of S1P1, along with the VLA-5 defect in mature SP thymocyte subpopulations in NOD mice, could modulate the migratory capacity of thymocytes and contribute to the accumulation of these cells in giant PVS.

2.2. Decreased Expression of S1P Lyase 1 in NOD Thymocytes

S1P lyase 1 (SGPL1) maintains constant S1P concentrations in tissues by irreversible degradation of S1P [26]. In the thymus, SGPL1 expression in the medullary region is related to low S1P concentrations around the vessels, allowing up-regulation of S1P1 and egress of mature thymocytes [27,28]. Inhibition

of SGPL1 leads to the accumulation of mature thymocytes in the thymus and giant PVS formation, secondary to S1P1 internalization [28,29]. We observed higher SGPL1 expression densities in SP CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes when compared with DP cells of both C57BL/6 and NOD mice (Figure 3A), similar to when we compared CD49e⁻ and CD49e⁺ cells (Figure S5A,B). Although differences between subpopulations were observed in both mouse strains, they were less important concerning NOD mouse thymocytes. No differences in the relative numbers of cells expressing SGPL1 were observed (Figure S6A–H). Interestingly, when we analyzed the CD62L^{hi} subpopulations, NOD SP CD8⁺CD62L^{hi}, CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ thymocytes presented lower SGPL1 expression in comparison with C57BL/6 counterparts (Figure 3B–D). The same was observed for NOD SP CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺, while a relevant, but not significant reduction was seen in SP CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells (Figures S5C,D). In agreement with the increase of SGPL1 expression in SP cells by flow cytometry, we observed by immunohistochemistry a higher SGPL1 deposition in the medullary region of both C57BL/6 (Figure 3E,F, right panel) and NOD (Figure 3E,F, left panel) thymi. Accordingly, the SGPL1 reduction in mature NOD thymocytes could result in less degradation and consequent accumulation of S1P around PVS leading to S1P1 internalization and thymocyte accumulation.

2.3. CD49e-Negative NOD Mouse Thymocytes Have Impaired S1P-Driven Migratory Response

We investigated the functional role of S1P/S1P1 interactions in NOD thymocyte subpopulations in Transwell® (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) migration assays. We observed that both the C57BL/6 and NOD SP CD4⁺CD62L^{hi} subpopulation migrated towards 10 nM of S1P (Figure 4A), whereas a discrete, but not significant, migratory response was seen only in C57BL/6 SP CD8⁺CD62L^{hi} cells towards both 10 and 100 nM S1P concentrations (Figure 4B). No chemotactic response was observed when the C57BL/6 or NOD SP CD62L^{neg/lo} subpopulations were stimulated with the same concentrations of S1P and, in some cases, the migration was even lower than in the control (Figure S7A,B).

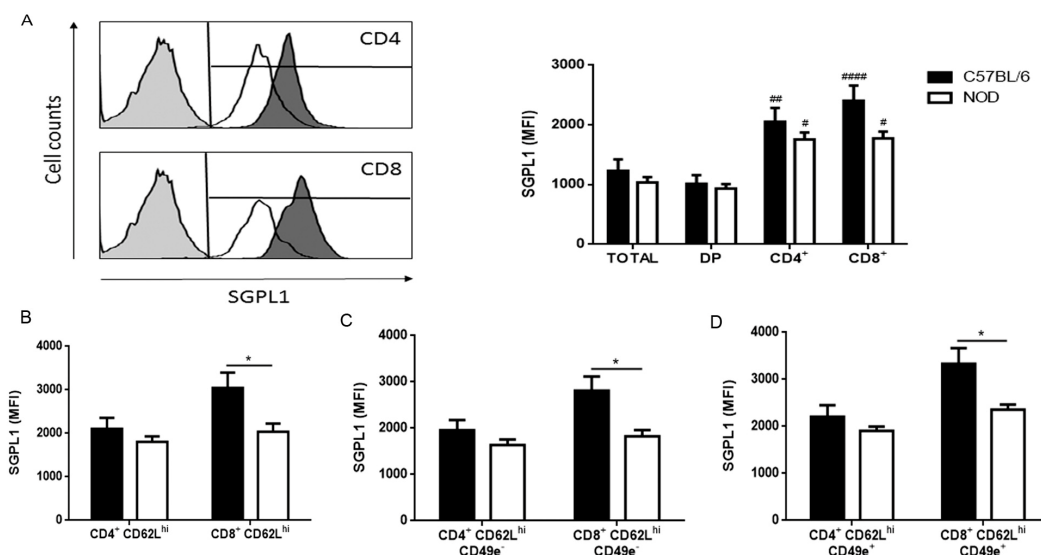


Figure 3. Cont.

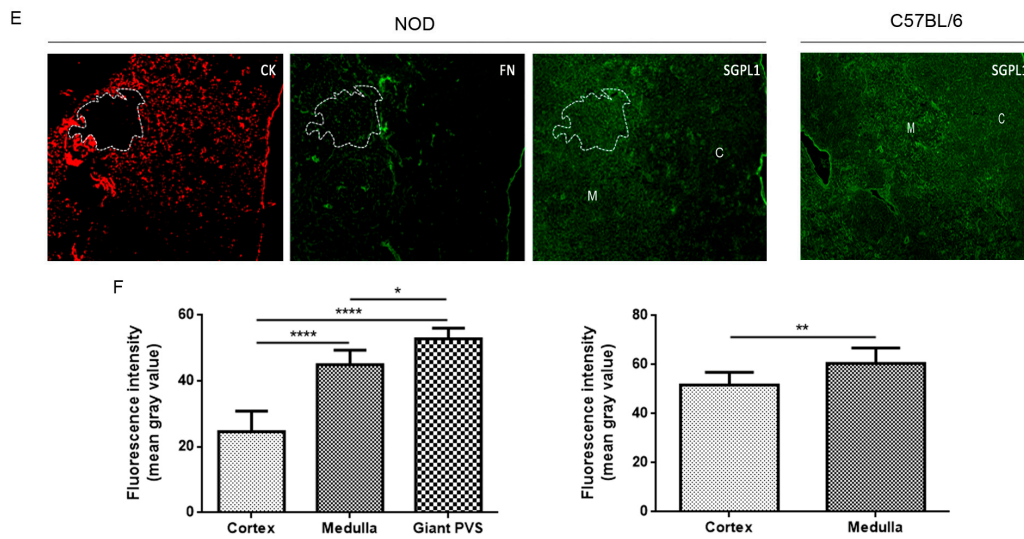


Figure 3. NOD thymocytes have reduced expression of S1P lyase 1 (SGPL1). The graphs show the SGPL1 expression in CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A) SGPL1 in total thymocytes, as well as CD4⁺CD8⁺ double-positive, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations. Histograms show the SGPL1 staining in NOD (white curve) and C57BL/6 (black curve) CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes. The grey curves represent the negative staining control; (B) SGPL1 in mature CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocyte subpopulations; (C) SGPL1 expression in CD49e⁻CD4⁺CD62L^{hi} and CD49e⁻CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocytes; (D) SGPL1 expression in CD49e⁺CD4⁺CD62L^{hi} and CD49e⁺CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocytes; (E) SGPL1, fibronectin (FN) and cytokeratin (CK) expression profile in NOD and SGPL1 expression in C57BL/6 thymus sections. The white dashed lines delimit the giant PVS. C = cortical region; M = medullary region. *n* = 3 thymi per group. Original magnification, ×100; and (F) SGPL1 fluorescence intensity quantification in the cortex, medulla and giant PVS of NOD (left graph) and in the cortex and medulla of C57BL/6 (right graph) mice, represented by the mean grey value. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by 2-way ANOVA followed by Tukey’s post-test. Differences were considered statistically significant when * or # *p* < 0.05; ** or ## *p* < 0.01; **** or ##### *p* < 0.0001. Asterisks represent a statistically significant difference between C57BL/6 and NOD subpopulations; hash marks represent a statistically significant difference between DP and SP subpopulations in the same mouse strain. *n* = 8 C57BL/6; *n* = 8 NOD.

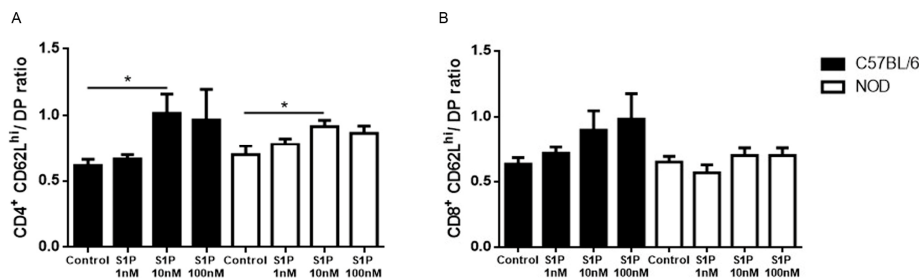


Figure 4. S1P induces NOD thymocyte migration. Total thymocytes of C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice were added to the Transwell insert and allowed to respond to 1, 10 or 100 nM of S1P in the lower chamber. Single-positive (A) CD4⁺CD62L^{hi}; and (B) CD8⁺CD62L^{hi} and double-positive (DP) percentages of input were determined by flow cytometry. Results are shown as the ratio of the percentages of input (single-positive to double-positive thymocytes). Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by Student’s *t* test. Differences were considered statistically significant when * *p* < 0.05. *n* = 6 C57BL/6; *n* = 6 NOD.

We also investigated whether the differences in S1P1 expression between CD49e⁺ and CD49e⁻ cells correlated with the changes in migratory response towards S1P. We found that NOD SP CD62L^{hi}CD49e⁻ cells had decreased migratory response toward 10 and 100 nM of S1P when compared with controls (Figure 5A,B). In contrast, NOD SP CD62L^{hi}CD49e⁺ showed higher migratory response towards the same S1P concentrations (Figure 5C,D). Regarding CD62L^{neg/lo} cells, there was no difference in migratory responses between NOD and C57BL/6 SP CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells, but NOD SP CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells displayed lower migratory capacity towards 10 nM of S1P (Figure S7C,D). For CD49e⁺ cells, only the NOD SP CD4⁺CD62L^{neg/lo} subpopulation presented higher migratory capacity towards 10 and 100 nM of S1P (Figure S7E,F). Interestingly, when we treated CD62L^{hi}CD49e⁺ cells with a specific CD49e blocker antibody, we observed a reduced migratory capacity of C57BL/6 SP CD4⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ and NOD SP CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ cells toward 10 nM of S1P, while migration toward 100 nM of S1P remained unaltered (Figure 5E,F). Together, these results show that the membrane levels of VLA-5 (ascertained by CD49e expression) can influence the cellular migratory response to S1P in the thymus, particularly in the NOD mouse.

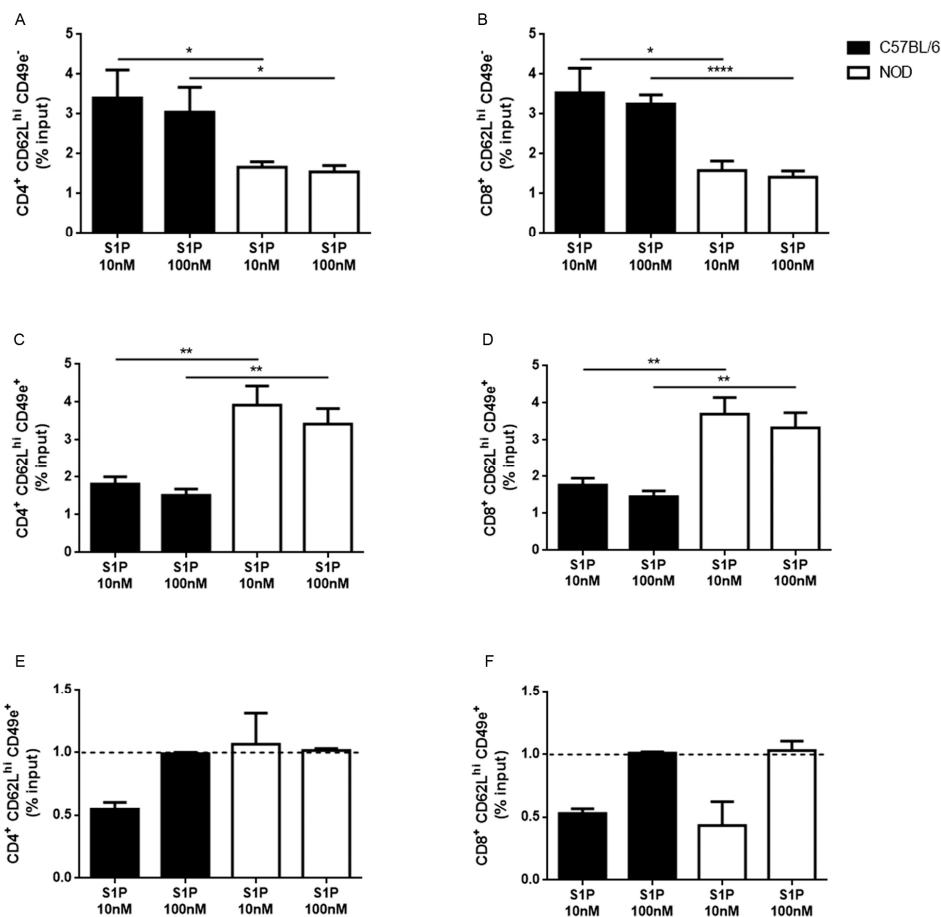


Figure 5. NOD CD49e⁻ and CD49e⁺ thymocytes present different migration patterns under S1P stimulation. Total thymocytes of C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice were added to the Transwell insert and were allowed to migrate toward 10 or 100 nM of S1P present in the lower chamber. Single-positive (A) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (B) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻; (C) CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺; and (D) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ percentages of input were determined by flow cytometry, (E) percentages of input of CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺; and (F) CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ after CD49 blockade, compared with isotype control-treated cells (dashed black lines = 1). Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by Student's *t* test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. $n = 6$ C57BL/6 and 6 NOD (A–D) and $n = 4$ C57BL/6 and 4 NOD (E,F).

3. Discussion

S1P1 is the main receptor involved in thymocyte egress to the periphery [30]. Here, we show that in the thymus of the NOD mouse there is an abnormality in the expression and function of S1P1. NOD thymocytes have a decreased expression of S1P1 when compared with C57BL/6 thymocytes, and this is mainly observed in CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, particularly in the more mature SP CD4⁺CD62L^{hi} and SP CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations, which under normal conditions, are those ready to leave the organ [30]. In this respect, the NOD thymus also exhibits higher relative and absolute numbers of CD62L^{hi} cells. These mature thymocytes also show decreased expression of CD49e, consistent with the accumulation of mature thymocytes in giant PVS [5–7]. Interestingly, we found that the diminished expression of S1P1 occurs in NOD mature (SP CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi}) CD49e⁻ thymocytes, but not in CD49e⁺ cells. We observed differences in the percentage of SP CD8⁺CD62L^{hi} cells that express S1P1, as well as SP CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺, when comparing C57BL/6 with NOD (Figure S8A–F); the main differences were observed in the density of receptor expression ascertained by the median of fluorescence intensity measurements. These data suggest that the expression of S1P1 and the integrin VLA-5 is somehow related, resulting in the involvement of both molecules in the accumulation of mature thymocytes in the NOD thymus. This hypothesis is supported by several studies showing that the signaling mediated by S1P1 modulates integrin activation and localization. Pre-treatment of endothelial cells with S1P prevented monocyte adhesion through VLA-5 and $\alpha v \beta 3$ integrins expressed on the endothelial apical surface. The treatment changed the localization of the integrins to the basal surface through S1P1 signaling and activation of proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src family proteins, PI3K (phosphoinositide 3-kinase) and Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) [31]. S1P activates the integrin $\alpha v \beta 3$ in the endothelial cell lamellipodial region and promotes cell migration through vitronectin substrates. The S1P signaling via S1P1/Gi/Rho GTPases induces integrin association with cytoskeleton proteins and the combination of αv and $\beta 3$ subunits [32]. Furthermore, it has been shown that S1P/S1P1 interactions enhance the CXCL12-mediated myeloma cell adhesion to fibronectin through VLA-4 (the $\alpha 4 \beta 1$ integrin) and VLA-4-mediated transendothelial migration [33].

We also investigated the mRNA expression of S1P1 in NOD versus C57BL/6 thymocytes. Curiously, the S1P1 mRNA expression was higher in NOD mice than in C57BL/6, both in total and mature CD8⁺ SP cells. These data suggest that the decreased expression of the receptor occurs only at the protein level, which may, in turn, result in a positive transcriptional regulation of the *S1P1* gene. One explanation could be the desensitization of G protein-coupled receptors that occurs rapidly after agonist exposure and a decrease in the membrane expression of the receptors that can be observed after prolonged agonist exposure [34]. Moreover, high concentrations of S1P were able to induce internalization, followed by ubiquitination and degradation of S1P1 [35]. Thymocytes are highly sensitive to S1P and internalize S1P1 after incubation with 1 nM of this lipid [36]. This internalization in mature thymocytes can prevent cells from exiting the organ, and increased S1P concentrations in thymic medullary region (mainly around the PVS) likely caused by SGLP1 inhibition, can lead to the formation of giant PVS in normal mice [28]. In this study, we did not observe a breakdown of the S1P gradient in NOD mice when comparing S1P contents between the thymus and serum, which were similar to C57BL/6 controls (Figure S9). Nevertheless, we cannot rule out the hypothesis of dysregulation in S1P concentration in the NOD thymus microenvironment, such as an increase around and within the giant PVS. Higher S1P concentrations could lead to a decrease in the expression of S1P1 in CD49e⁻ cells that remain for longer periods in these structures. We observed lower SGLP1 expression in NOD mature SP CD8⁺CD62L^{hi} thymocytes as compared with controls. Downregulation or inhibition of this enzyme causes lymphopenia through the disruption of S1P gradients inside the thymus [29]. Although dendritic cells (DCs) present in the medullary and cortico-medullary regions seem to be the main reason for the low levels of S1P, the disruption of SGLP1 in thymocytes was also related to increased thymus and plasma levels of S1P, the decrease of S1P1 on the mature SP

cell surface and mature thymocyte retention in the thymus [37]. However, other events that involve post-translational regulation of the receptor expression cannot be discarded.

We observed that S1P1 decreased expression correlated with a lower migratory response of NOD thymocytes towards S1P. Additionally, S1P-driven migration of NOD SP CD62L^{hi}CD49e⁻ cells was lower than in the controls, although migration of NOD mature SP CD62L^{hi}CD49e⁺ thymocytes was higher when induced by the same S1P concentrations. It is interesting to emphasize that CD49e⁻ mature thymocytes migrate more towards S1P than CD49e⁺ mature cells in C57BL/6 mice, but not in NOD mice. In this case, CD49e⁺ mature cells were more responsive to S1P, suggesting that the CD49e expression can influence the chemotactic responses towards S1P in the NOD thymus in a different way.

Finally, we observed a decreased migratory capacity of C57BL/6 SP CD4⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ towards 10 nM of S1P after CD49e blockade, suggesting that this integrin can indirectly regulate S1P-induced thymocyte migration. In contrast, inhibition of migration was observed for NOD CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ thymocytes, suggesting that in this subpopulation other molecules can also be involved. Distinct migratory responses between CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes from NOD mice were described, for example, towards laminin. In this case, laminin receptor VLA-6 expression is augmented in both CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes, but migration is enhanced only for CD4 SP cells [6]. Furthermore, our group showed that S1P induces chemotaxis and chemokinesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) blasts at 100 nM. By contrast, high concentrations of S1P (1000, 5000 and 10,000 nM) induce fugetaxis (or chemorepulsion) of the same cells [17]. It is thus conceivable that different thymocyte subpopulations present different sensitivity in migratory behavior under S1P stimulation, depending on the concentration and receptor expression, and that VLA-5 expression could differentially influence cell response in these conditions. Indeed, we cannot exclude the participation of other interactions since S1P/S1P1 can alter cellular responsiveness through other molecules, besides integrin activation and chemokine response, as mentioned above. Together, our results provide evidence that the expression and migratory defects of NOD thymocytes are part of a complex mechanism that comprises hypo and hyper responsiveness to certain stimuli. This fits the multivectorial model for intrathymic T-cell migration we have previously proposed [6], in which the direction and velocity of thymocyte migration result from the balance of interactions mediated by different vectors, such as ECM proteins, cytokines and chemokines. Accordingly, the alterations seen in NOD mouse thymocytes likely alter the resultant vector driving oriented thymocyte movement within the thymus, modifying the overall thymocyte migratory behavior, which should be considered in the context of T1D development in NOD mice.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Female C57BL/6 and NOD mice aged 9–12 weeks (pre-diabetic) or 4 weeks (when indicated) were obtained from the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) and the Necker Hospital (Paris, France) and were maintained under specific-pathogen free (SPF) conditions. Experimental procedures were approved by the Fiocruz ethical committee on animal use (L-024/2015; June 2015), according to the rules defined by Brazilian and European legislations.

4.2. Antibodies and Chemicals

Rabbit anti-S1P1 (catalog number PA1-1040) and S1P1 Synthetic Immunizing Peptide (PEP-220) were obtained from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Rabbit anti-SGPL1 (bs-4188R) was purchased from Bioss Antibodies (Boston, MA, USA). S1P and rabbit anti-FN (F3648) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fluorochrome-labeled rat monoclonal antibodies directed against mouse proteins, including anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCP, anti-CD49e PE, unrelated IgG2A PE and anti-CD4 APC-Cy7, were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), as well as purified rat anti-CD49e and its respective isotype control. Rat anti-CD62L Pacific Blue and the

respective isotype control were obtained from BioLegend (San Diego, CA, USA). Purified rabbit anti-CK polyclonal antibody was obtained from DAKO Co. (Santa Clara, CA, USA). Rat anti-CD8 PerCP-Cy5.5, goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor[®] 488 and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor[®] 546 were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

4.3. Flow Cytometry

After thymus removal, thymocyte suspension was prepared in a tissue homogenizer with 1 mL of PBS (Sigma Aldrich). One million cells were stained using the BD Cytotfix/Cytoperm[™] Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) for S1P1, followed by staining for CD49e, CD62L, CD4 and CD8. Cells were then evaluated by flow cytometry using a FACSCanto II device (BD Biosciences).

4.4. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Quantitative RT-PCR)

Thymus RNA was extracted using a combination of TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and RNeasy[®] mini kit (Qiagen, Austin, TX, USA): total thymi were lysed in 1 mL TRIzol[®] with the aid of a pipette. Chloroform was then added to the lysate, and the organic and aqueous phases were separated by centrifugation at $10,000 \times g$ for 18 min, at 4 °C. From the aqueous phase, after the precipitation with ethanol, RNA was extracted using the RNeasy[®] mini kit and suspended in Ultrapure Nuclease-Free Water (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). cDNA synthesis was performed with 2 µg of RNA with Super Script II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For SP CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations, a pool of thymocytes from 4 thymi was suspended in 1 mL of RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 10% FBS (fetal bovine serum) (Cultilab, Campinas, Brazil) and stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies for 30 min at 4 °C, followed by cell sorting in a FACS Aria device (BD Biosciences). After sorting, RNA was extracted from SP CD4⁺ and CD8⁺ cells using the same protocol described above. cDNA synthesis was performed with 100 ng of RNA. Quantitative RT-PCR of total thymus and SP subpopulations was performed with Syber[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a Step One Plus System (Applied Biosystems). PCR cycling conditions were as follows: a first step at 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 3 s and 62 °C for 30 s and generation of melting curves for primer specificity analysis. Gene expression was calculated in the Expression Suite Software (version 1.1., Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) with the threshold set at 0.02. Statistical analyses were conducted using the ΔCt values. Gene expression was reported as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), in relation to samples from C57BL/6 control mice, used as calibrators. HPRT and GAPDH genes were used as reference genes and their constitutive expression was validated using the same software. The following primers were used: 200 nM S1P1 forward GTGTAGACCCAGAGTCCTGCG; 200 nM S1P1 reverse AGCTTTTCCTTGCTGGAGAG (Sigma Aldrich); 300 nM HPRT forward TCCAGCGTCGTGATTAGCGATG; 300 nM HPRT reverse GGCCACAATGTGATGGCCTCCC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 300 nM GAPDH forward CCACTCACGGCAAATTCAACGGC; 300 nM GAPDH reverse CCACCCTTCAAGTGGGCCCGG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Further information about primer standardization can be found in supplementary information, Table S1.

4.5. Immunohistochemistry

Thymi were removed from NOD and C57BL/6 mice, embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) and maintained at −80 °C. 5-µm-thick cryostat sections were settled on poly-L-lysine (Sigma Aldrich)-covered glass slides and were acetone-fixed for 10 min at −20 °C. Slides were treated with PBS 1% BSA (bovine serum albumin) for 30 min and incubated with primary antibodies (diluted in PBS for extracellular staining or PBS/BSA 1%/Saponin 0.1% for intracellular staining) overnight at 4 °C. Samples were then submitted to corresponding secondary antibodies for 30 min at room temperature. Immunostained samples were analyzed by an Axio Imager A2 device using the Axio Vision Rel 4.8 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Negative

controls, in which the secondary antibody was used alone, did not generate any significant labeling. Selected microscopic fields comprised cortical, medullary and PVS regions of the thymic lobules. The quantitative fluorescence analysis was performed by transforming the specific staining into an eight-bit grey image. The Mean Gray Value was used to quantify S1P1 or SGPL1 expression, using ImageJ software (Rasband, WS ImageJ, NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA). For S1P1 expression, we examined 23 cortical, 8 medullary and 11 giant PVS regions for NOD thymus and 33 cortical and 24 medullary regions for C57BL/6. For SGPL1 (Sphingosine-1-phosphate lyase 1) expression, we examined 11 cortical, 7 medullary and 4 giant PVS regions for NOD and 12 cortical and 9 medullary regions, for C57BL/6 thymus.

4.6. Transmigration Assays

Thymocyte migratory activity was assessed in Transwell® chambers. Briefly, 5-µm pore size Transwell membranes (Corning Incorporated Costar, Cornelle, NY, USA) were blocked with PBS 1 % fatty-acid free BSA for 45 min at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. After blockade, 2 × 10⁶ cells in 100 µL of RPMI 1640 1 % fatty-acid free BSA migration medium were added to the upper chamber, while 600 µL of the migration medium or migration medium containing S1P were added to the bottom chamber. After 3 h of incubation, the cells in the bottom chamber were counted in a Neubauer hemacytometer (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany), followed by labeling with appropriate antibodies and analyzed by flow cytometry. For CD49e blockade assays, cells were pre-incubated with blocking antibody or isotype control for 30 min at 4 °C and then challenged to migrate under the same conditions described above.

4.7. S1P Quantitation

Thymi and sera were obtained from NOD and C57BL/6 mice, and the S1P concentration was determined by thin-layer chromatography (TLC) as previously described [38,39].

4.8. Statistical Analysis

Results were analyzed using Student's *t* test or 2-way ANOVA tests, followed by Tukey's post-test, and using the software GraphPad Prism 6 (version 6.01, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (* or #), $p < 0.01$ (** or ##), $p < 0.001$ (***) or ###) or $p < 0.0001$ (**** or ####).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1446/s1.

Acknowledgments: This work was funded by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz); Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Carlos Chagas Filho Foundation for Funding Research in the State of Rio de Janeiro (Faperj); Brazilian National Coordination for Advancement of University Personnel (CAPES) and Mercosur Fund for Structural Convergence (FOCEM, Mercosur). This work was developed in the framework of the Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation. We thank Alexandre Morrot (Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) for helping with S1P quantitation assays.

Author Contributions: Julia P. Lemos, Mireille Dardenne, Salette Smaniotto, Otacilio C. Moreira, Vinicius Cotta-de-Almeida, Wilson Savino and Daniella A. Mendes-da-Cruz conceived and designed the experiments; Julia P. Lemos, Carolina V. Messias, Salette Smaniotto, Otacilio C. Moreira and Daniella A. Mendes-da-Cruz performed the experiments and analyzed data; Julia P. Lemos, Vinicius Cotta-de-Almeida, Wilson Savino and Daniella A. Mendes-da-Cruz wrote the manuscript; Daniella A. Mendes-da-Cruz coordinated the research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

NOD	Non-Obese Diabetic
VLA	Very Late Antigen
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1P1	Sphingosine-1-Phosphate receptor 1
T1D	Type I Diabetes

PVS Perivascular Spaces
 ECM Extracellular Matrix
 SGPL1 S1P lyase 1

References

- Anderson, M.S.; Bluestone, J.A. The NOD Mouse: A Model of Immune Dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 447–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fujita, T.; Yui, R.; Kusumoto, Y.; Serizawa, Y.; Makino, S.; Tochino, Y. Lymphocytic insulinitis in a ‘non-obese diabetic (NOD)’ strain of mice: An immunohistochemical and electron microscope investigation. *Biomed. Res.* **1982**, *3*, 429–443. [[CrossRef](#)]
- Ogawa, M.; Maruyamai, T.; Hasegawai, T.; Kanaya, T.; Kobayashii, F.; Tochino, Y.; Uda, H. The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed. Res.* **1985**, *6*, 103–105. [[CrossRef](#)]
- Savino, W.; Mendes-Da-Cruz, D.A.; Silva, J.S.; Dardenne, M.; Cotta-De-Almeida, V. Intrathymic T-cell migration: A combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 305–313. [[CrossRef](#)]
- Savino, W.; Boitard, C.; Bach, J.-F.; Dardenne, M. Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab. Investig.* **1991**, *63*, 405–417.
- Mendes-da-Cruz, D.A.; Smaniotto, S.; Keller, A.C.; Dardenne, M.; Savino, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4639–4647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cotta-de-Almeida, V.; Serra Villa-Verde, D.M.; Lepault, F.; Pléau, J.-M.; Dardenne, M.; Savino, W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: A fibronectin receptor-related defect. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1578–1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Geutskens, S.B.; Mendes-da-Cruz, D.A.; Dardenne, M.; Savino, W. Fibronectin receptor defects in NOD mouse leucocytes: Possible consequences for type 1 diabetes. *Scand. J. Immunol.* **2004**, *60*, 30–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brinkmann, V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *115*, 84–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zachariah, M.A.; Cyster, J.G. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* **2010**, *328*, 1129–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pappu, R.; Schwab, S.R.; Cornelissen, I.; Pereira, J.P.; Regard, J.B.; Xu, Y.; Camerer, E.; Zheng, Y.-W.; Huang, Y.; Cyster, J.G.; et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2007**, *316*, 295–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Allende, M.L.; Dreier, J.L.; Mandala, S.; Proia, R.L. Expression of the Sphingosine-1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15396–15401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blaho, V.A.; Hla, T. An update on the biology of sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1596–1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goetzl, E.J.; An, S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *FASEB J.* **1998**, *12*, 1589–1598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, G.; Contos, J.J.A.; Weiner, J.A.; Fukushima, N.; Chun, J. Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene* **1999**, *227*, 89–99. [[CrossRef](#)]
- Graeler, M.; Shankar, G.; Goetzl, E.J. Cutting Edge: Suppression of T Cell Chemotaxis by Sphingosine-1-Phosphate. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4084–4087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Messias, C.V.; Santana-Van-Vliet, E.; Lemos, J.P.; Moreira, O.C.; Cotta-de-Almeida, V.; Savino, W.; Mendes-da-Cruz, D.A. Sphingosine-1-Phosphate Induces Dose-Dependent Chemotaxis or Fugetaxis of T-ALL Blasts through S1P1 Activation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cinamon, G.; Lesneski, M.J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M.L.; Proia, R.L.; Cyster, J.G. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **2004**, *427*, 355–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garris, C.S.; Blaho, V.A.; Hla, T.; Han, M.H. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: Trafficking and beyond. *Immunology* **2014**, *142*, 347–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Don, A.S.; Lim, X.Y.; Couttas, T.A. Re-Configuration of Sphingolipid Metabolism by Oncogenic Transformation. *Biomolecules* **2014**, *4*, 315–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Makino, S.; Kunimoto, K.; Muraoka, Y.; Mizushima, Y.; Katagiri, K.; Tochino, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim.* **1980**, *29*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Makino, S.; Kunimoto, K.; Muraoka, Y.; Katagiri, K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. *Exp. Anim.* **1981**, *30*, 137–140. [[CrossRef](#)]
23. Colomb, E.; Savino, W.; Wicker, L.; Peterson, L.; Dardenne, M.; Carnaud, C. Genetic control of giant perivascular space formation in the thymus of NOD mice. *Diabetes* **1996**, *45*, 1535–1540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, W.; Bergerot, I.; Elliott, J.F.; Harrison, L.C.; Abiru, N.; Eisenbarth, G.S.; Delovitch, T.L. Evidence that a peptide spanning the B–C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 4926–4935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Brimnes, M.K.; Jensen, T.; Jørgensen, T.N.; Michelsen, B.K.; Troelsen, J.; Werdelin, O. Low expression of insulin in the thymus of non-obese diabetic mice. *J. Autoimmun.* **2002**, *19*, 203–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Saba, J.D.; Hla, T. Point-Counterpoint of Sphingosine-1-Phosphate Metabolism. *Circ. Res.* **2004**, 724–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Borowsky, A.D.; Bandhuvula, P.; Kumar, A.; Yoshinaga, Y.; Nefedov, M.; Fong, L.G.; Zhang, M.; Baridon, B.; Dillard, L.; de Jong, P.; et al. Sphingosine-1-phosphate lyase expression in embryonic and adult murine tissues. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Maeda, Y.; Yagi, H.; Takemoto, K.; Utsumi, H.; Fukunari, A.; Sugahara, K.; Masuko, T.; Chiba, K. S1P lyase in thymic perivascular spaces promotes egress of mature thymocytes via up-regulation of S1P receptor 1. *Int. Immunol.* **2013**, *26*, 245–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schwab, S.R.; Pereira, J.P.; Matloubian, M.; Xu, Y.; Huang, Y.; Cyster, J.G. Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* **2005**, *309*, 1735–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bunting, M.D.; Comerford, I.; McColl, S.R. Finding their niche: Chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89*, 185–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Aoki, S.; Yatomi, Y.; Shimosawa, T.; Yamashita, H.; Kitayama, J.; Tsuno, N.H.; Takahashi, K.; Ozaki, Y. The suppressive effect of sphingosine-1-phosphate on monocyte-endothelium adhesion may be mediated by the rearrangement of the endothelial integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 1292–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, L.; Lee, J.-F.; Lin, C.-Y.; Lee, M.-J. Rho GTPases mediated integrin $\alpha v\beta 3$ activation in sphingosine-1-phosphate stimulated chemotaxis of endothelial cells. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *129*, 579–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. García-Bernal, D.; Redondo-Muñoz, J.; Dios-Esponera, A.; Chèvre, R.; Bailón, E.; Garayoa, M.; Arellano-Sánchez, N.; Gutierrez, C.N.; Hidalgo, A.; García-Pardo, A.; et al. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 36–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pierce, K.L.; Premont, R.T.; Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev.* **2002**, *3*, 639–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lin Oo, M.; Thangada, S.; Wu, M.T.; Liu, C.H.; Macdonald, T.L.; Lynch, K.R.; Lin, C.Y.; Hla, T. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9082–9089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schwab, S.R.; Cyster, J.G. Finding a way out: Lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 1295–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zamora-Pineda, J.; Kumar, A.; Suh, J.H.; Zhang, M.; Saba, J.D. Dendritic cell sphingosine-1-phosphate lyase regulates thymic egress. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 2773–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Einicker-Lamas, M.; Wenceslau, L.D.; Bernardo, R.R.; Nogaroli, L.; Guilherme, A.; Oliveira, M.M.; Vieyra, A. Sphingosine-1-Phosphate Formation Activates Phosphatidylinositol-4 Kinase in Basolateral Membranes from Kidney Cells: Crosstalk in Cell Signaling through Sphingolipids and Phospholipids. *J. Biochem.* **2003**, *134*, 529–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lepletier, A.; De Almeida, L.; Santos, L.; Sampaio, S.; Paredes, B.; Bele, F.; Savino, W.; Morrot, A.; Einicker-lamas, M.; Pe, A.R. Early Double-Negative Thymocyte Export in Trypanosoma cruzi Infection Is Restricted by Sphingosine Receptors and Associated with Human Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



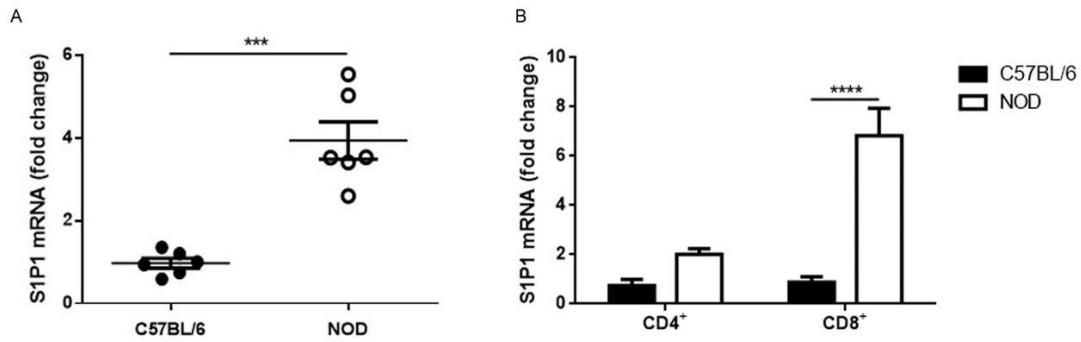


Figure S1. NOD thymocytes have increased expression of S1P1 mRNA. (A), the graph shows the mRNA expression of S1P1 in total thymocytes of C57BL/6 (black balls) and NOD (white balls) mice. Panel B depicts the mRNA expression of S1P1 in CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocyte subpopulations in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice. CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive. The relative quantitation was performed by the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$), using C57BL/6 as calibrator (fold change value = 1). Horizontal bars represent the mean \pm SEM of six biological replicates for total thymocytes (A) and sixteen biological replicates for SP subpopulations (B). Results were analyzed by Student's t test for total thymus and 2 way ANOVA followed by Tukey post-test for sorted thymocyte subsets. Differences were considered statistically significant when *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

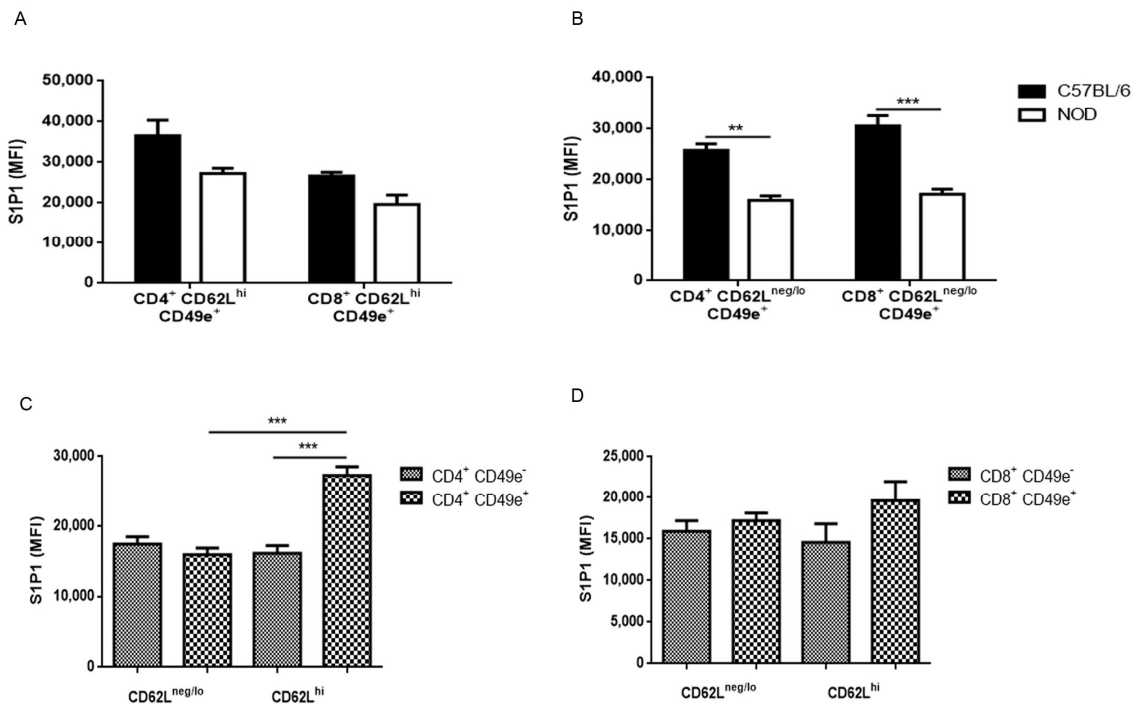


Figure S2. NOD CD4⁺CD49e⁺ SP cells increase S1P1 expression during differentiation. The panels show S1P1 expression in (A) CD4⁺ and CD8⁺ SP CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells, (B), SP CD4⁺ and CD8⁺ CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ cells, (C), NOD SP CD4⁺CD62L^{neg/lo} or CD4⁺CD62L^{hi}, expressing or not CD49e and (D) NOD SP CD8⁺CD62L^{neg/lo} or CD8⁺CD62L^{hi} thymocytes expressing or not CD49e, as indicated, analyzed by flow cytometry. CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test or Student's t test. Differences were considered statistically significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, after evaluating 3 C57BL/6 and 4 NOD thymi.

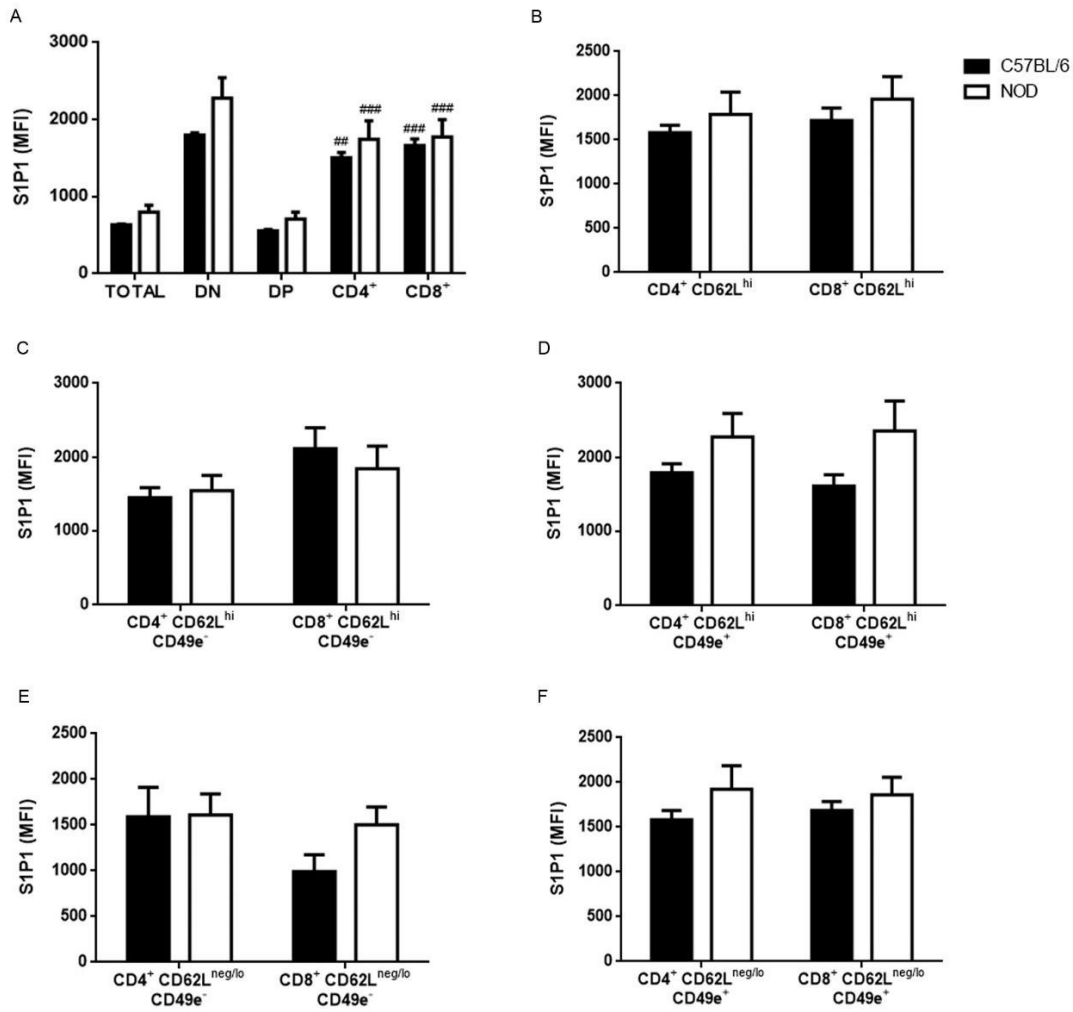


Figure S3. Younger NOD mice have no alterations in S1P1 expression. The graphs show S1P1 expression in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice with 4 weeks of age, analyzed by flow cytometry. (A), S1P1 expression on CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations, (B), S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} subpopulations. (C), S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ cells and (D), S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ cells, (E), S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells and (F), S1P1 expression in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ cells. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test. Differences were considered statistically significant when ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$. Hash marks represent statistical significance between DP and SP subpopulations in the same mouse strain, after evaluating 4 C57BL/6 and 4 NOD thymi.

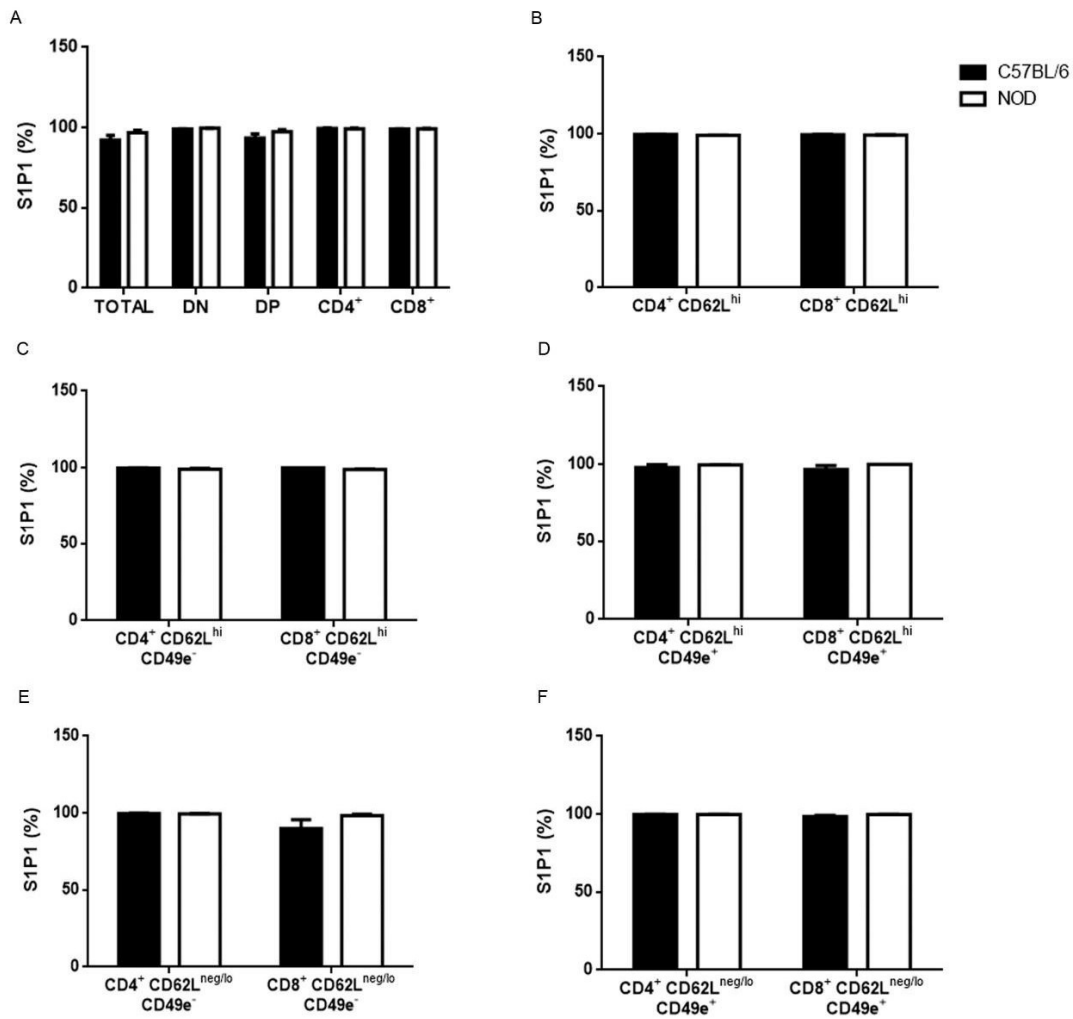


Figure S4. Younger NOD mice have no differences in percentage of cells expressing S1P1. The bars show the S1P1 expression on thymocyte subpopulations defined by CD4 and CD8 in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A), S1P1 in total thymocytes, as well as CD4⁻CD8⁻ double-negative, CD4⁺CD8⁺ double-positive, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (B), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocytes, (C), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ cells, (D), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ subpopulations, (E), S1P1 in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells and (F), S1P1 in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ subsets. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; % = relative cell numbers. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test. $n = 4$ C57BL/6; $n = 4$ NOD.

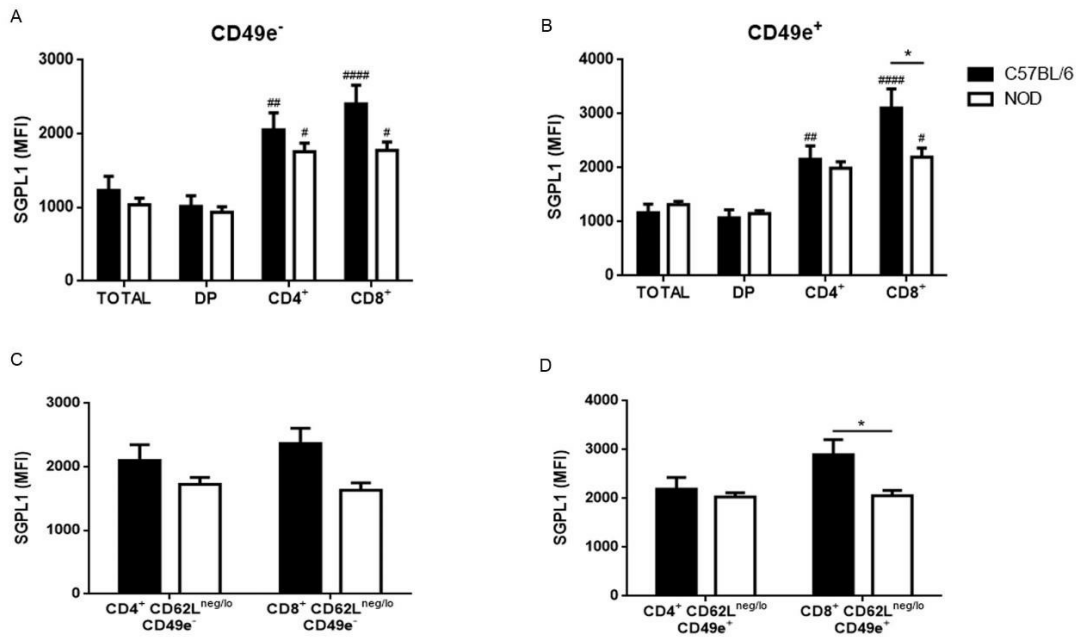


Figure S5. NOD CD49e⁺ and CD49e⁻ SP thymocytes present lesser SGPL1 expression. The bars show the SGPL1 expression on thymocyte subpopulations defined by CD4 and CD8 in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A), CD49e⁺ total thymocytes and DP, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations and (B), CD49e⁻ total thymocytes and DP, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (C), CD4⁺ and CD8⁺ SP CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells and (D), SP CD4⁺ and CD8⁺ CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ cells. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test. Differences were considered statistically significant when * or # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; #### $p < 0.0001$. Asterisks represent statistical significance between C57BL/6 and NOD subpopulations; hash marks represent statistical significance between DP and SP subpopulations in the same mouse strain. $n = 8$ C57BL/6; $n = 8$ NOD.

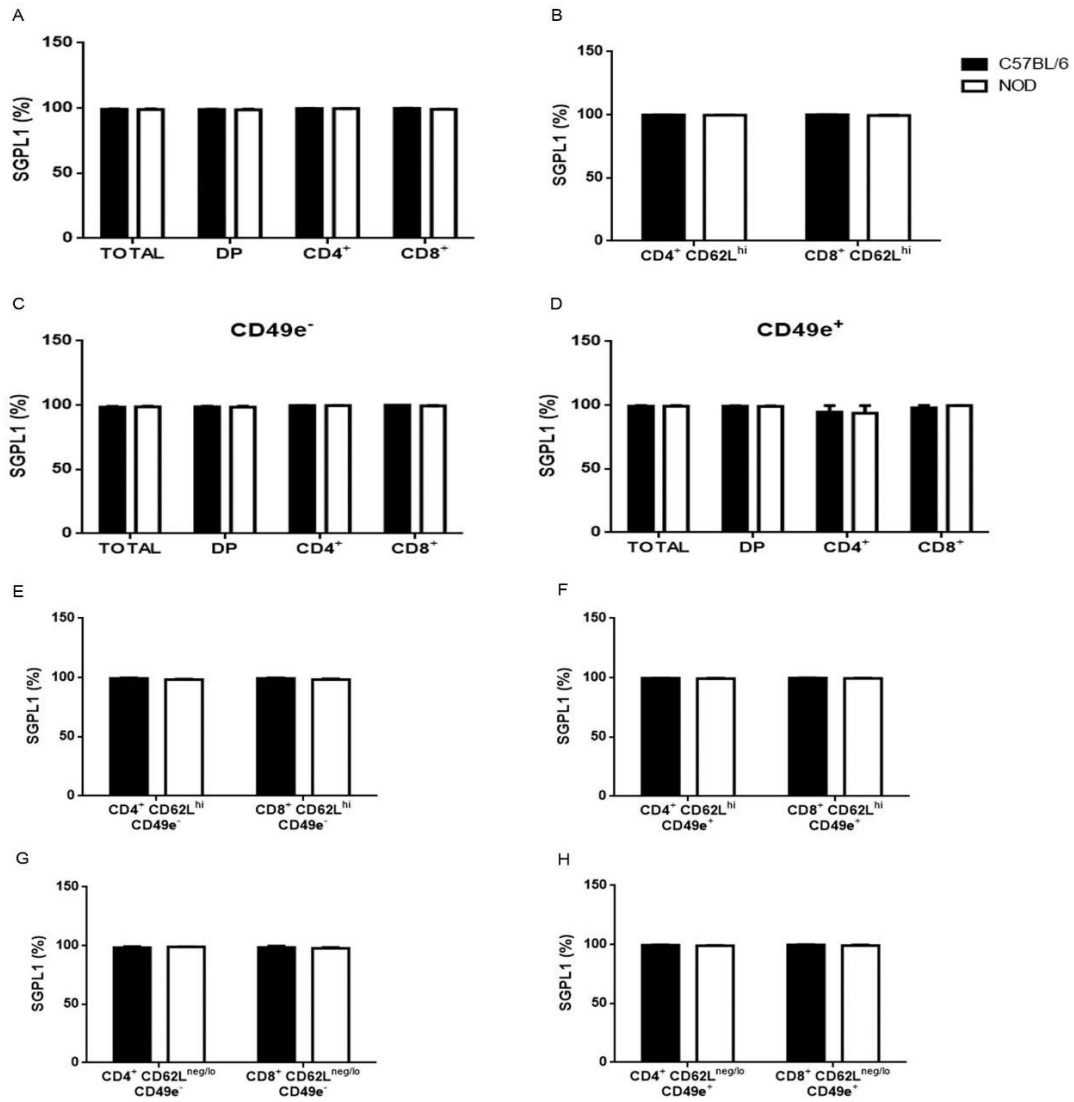


Figure S6. NOD mice have similar frequency of cell expressing SGPL1. The bars show the SGPL1 expression on thymocyte subpopulations defined by CD4 and CD8 in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A), SGPL1 in total thymocytes, as well as CD4⁺CD8⁺ double-positive, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (B), SGPL1 in mature CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocyte subpopulations, (C), SGPL1 in CD49e⁻ total thymocytes and DP, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (D), SGPL1 in CD49e⁺ total thymocytes and DP, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (E), SGPL1 in CD4⁺ and CD8⁺ SP CD62L^{hi}CD49e⁻ cells, (F), SGPL1 in SP CD4⁺ and CD8⁺ CD62L^{hi}CD49e⁺ cells, (G), SGPL1 in CD4⁺ and CD8⁺ SP CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells and (H), SGPL1 in SP CD4⁺ and CD8⁺ CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ cells. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; % = relative cell numbers. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test. *n* = 8 C57BL/6; *n* = 8 NOD.

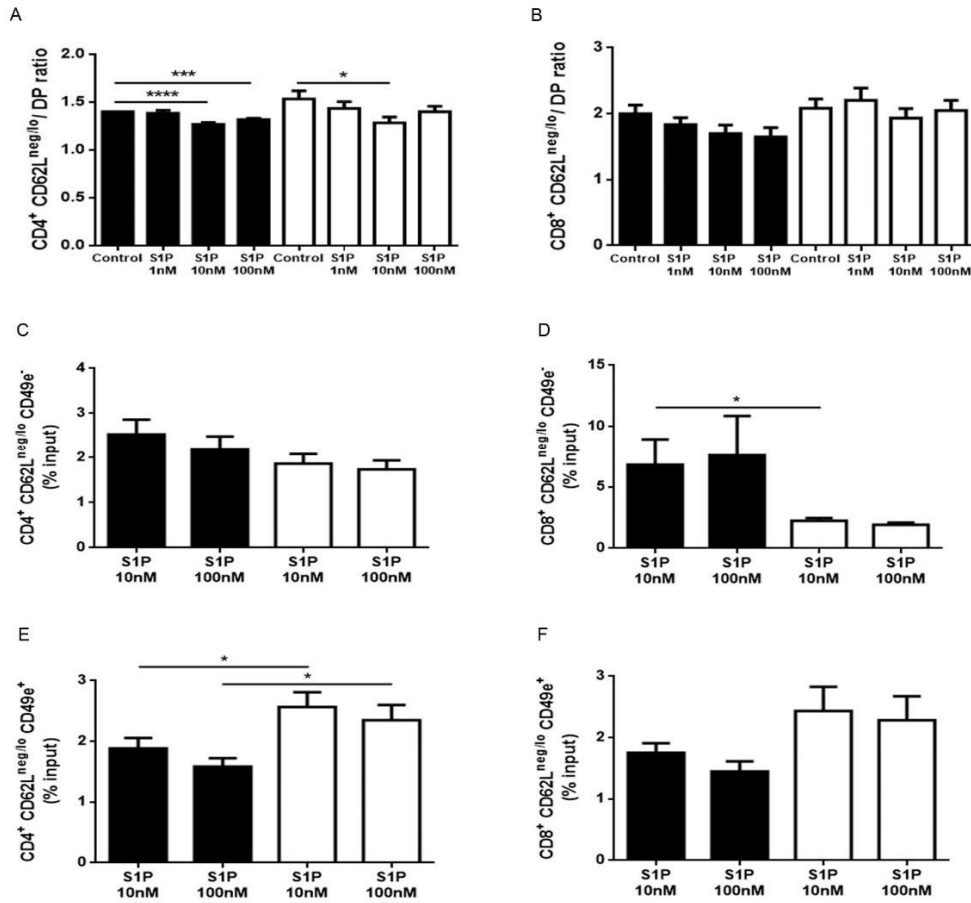


Figure S7. CD62L^{neg/lo} thymocyte subpopulations have no chemotactic response under S1P stimulation. The panels show (A), SP CD4⁺CD62L^{neg/lo}, (B), SP CD8⁺CD62L^{neg/lo}, (C), CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻, (D), CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻, (E), CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ and (F), CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ cells migration towards 1 nM, 10 nM or 100 nM of S1P, in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice. CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; MFI = median fluorescence intensity. Results are shown as the ratio of the percentages of input (single-positive to double-positive thymocytes) or percentages of input, and are expressed as mean ± SEM, being analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test or Student's t test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, after evaluating 6 C57BL/6 versus 6 NOD animals.

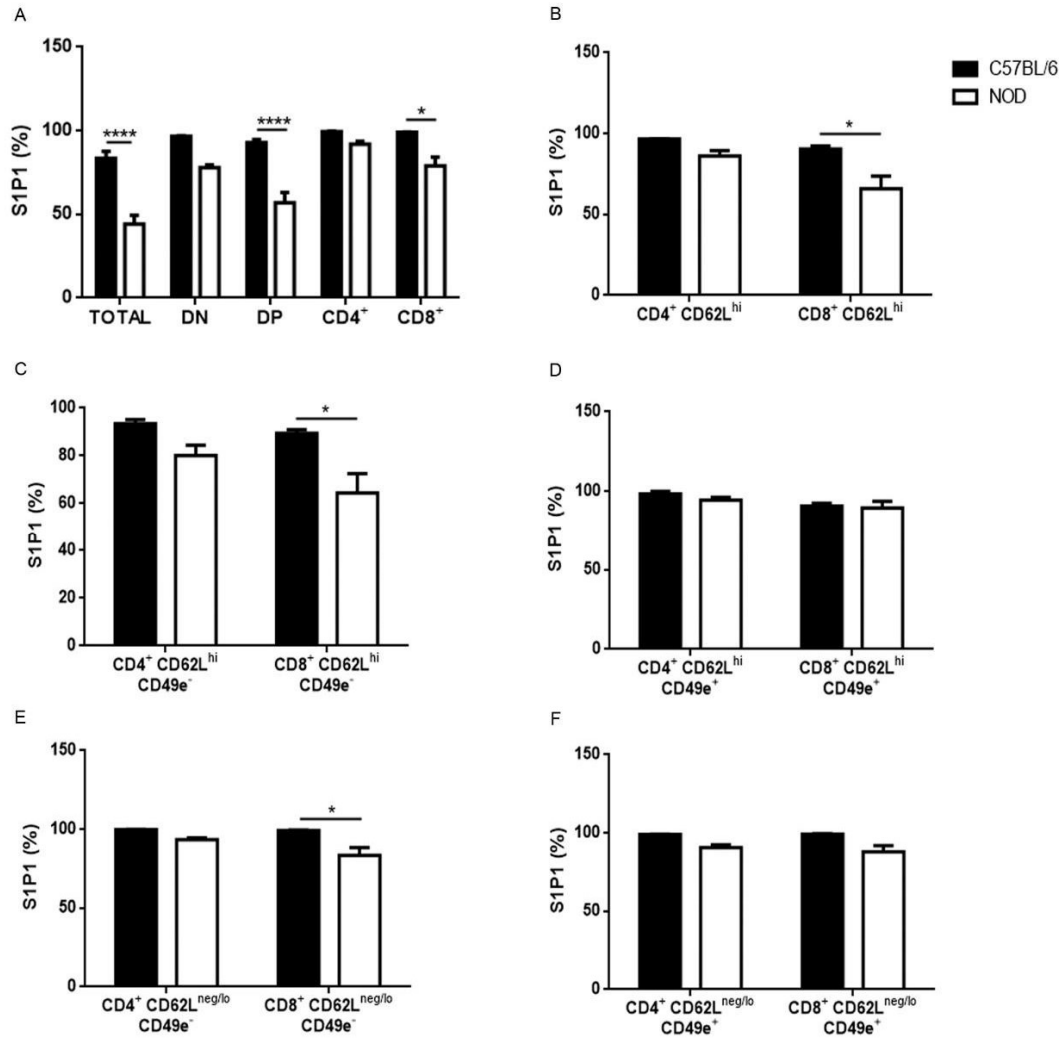


Figure S8. NOD mice have decreased percentage of CD8⁺CD49e⁻ cells expressing S1P1. The graphs show the S1P1 expression on thymocyte subpopulations defined by CD4 and CD8 in C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) mice, analyzed by flow cytometry. (A), S1P1 in total thymocytes, as well as CD4⁻CD8⁻ double-negative, CD4⁺CD8⁺ double-positive, CD4⁺ and CD8⁺ SP subpopulations, (B), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi} and CD8⁺CD62L^{hi} SP thymocyte subpopulations, (C), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁻ cells, (D), S1P1 in mature CD4⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{hi}CD49e⁺ subpopulations, (E), S1P1 in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁻ cells and (F), S1P1 in CD4⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ and CD8⁺CD62L^{neg/lo}CD49e⁺ subsets. Total = total thymocytes; DN = CD4⁻CD8⁻ double-negative; DP = CD4⁺CD8⁺ double-positive; CD4⁺ = CD4⁺CD8⁻ single-positive; CD8⁺ = CD4⁻CD8⁺ single-positive; % = relative cell numbers. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by 2way ANOVA followed by Tukey post-test. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. $n = 3$ C57BL/6; $n = 4$ NOD.

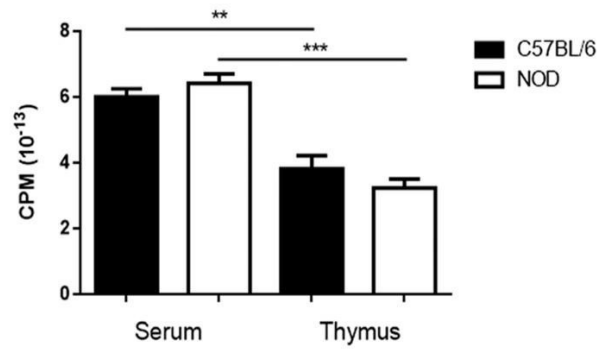


Figure S9. NOD mice have normal S1P gradient between thymus and serum. S1P was measured in thymi and sera of C57BL/6 (black bars) and NOD (white bars) by thin-layer chromatography (TLC). Four C57BL/6 and 4 NOD mice were used for these experiments. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by 2 way ANOVA followed by Tukey post-test. Differences were considered statistically significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CPM = counts per minute.

Table S1. Primers and standard curve parameters for gene amplification in thymi from C57BL/6 and NOD mice.

Mouse gene target	Primer sequences (5'-3')	Slope	Intercept	Coefficient of linearity (r^2)	Amplification efficiency (%)
S1P1	FW - GTGTAGACCCAGAGTCCTGCG	-3,06	15,9	0,99	112,4
	RV - AGCTTTTCCTTGGCTGGAGAG				
HPRT	FW - TCCCAGCGTCGTGATTAGCGATG	-2,89	13,96	0,98	121,8
	RV - GGCCACAATGTGATGGCCTCCC				
GAPDH	FW - CCACTCACGGCAAATTCAACGGC	-3,16	9,62	0,98	107,2
	RV - CCACCCTTCAAGTGGCCCCG				

8.3 Anexo 3

Revisão “Abnormal T-Cell Development in the Thymus of Non-obese Diabetic Mice: Possible Relationship With the Pathogenesis of Type 1 Autoimmune Diabetes” *Frontiers in Endocrinology* (doi: 10.3389/fendo.2018.00381), 2018. Neste documento, revisamos importantes moléculas envolvidas no processo de migração intratímica e suas alterações no timo de camundongos NOD, com ênfase nos peptídeos pertencentes a família da insulina e fatores de crescimento semelhantes a insulina, e seu possível envolvimento no desenvolvimento da autoimunidade e patogênese do diabetes tipo I.



Abnormal T-Cell Development in the Thymus of Non-obese Diabetic Mice: Possible Relationship With the Pathogenesis of Type 1 Autoimmune Diabetes

Daniella A. Mendes-da-Cruz^{1,2*}, Julia P. Lemos^{1,2}, Geraldo A. Passos^{3,4} and Wilson Savino^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Vincent Geenen,
University of Liège, Belgium

Reviewed by:

Karsten Kretschmer,
Technische Universität Dresden,
Germany
Nils Lambrecht,
VA Long Beach Healthcare System
and University of California, Irvine,
United States

*Correspondence:

Daniella A. Mendes-da-Cruz
daniella@ioc.fiocruz.br
Wilson Savino
savino.w@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 31 January 2018

Accepted: 22 June 2018

Published: 12 July 2018

Citation:

Mendes-da-Cruz DA, Lemos JP,
Passos GA and Savino W (2018)
Abnormal T-Cell Development in the
Thymus of Non-obese Diabetic Mice:
Possible Relationship With the
Pathogenesis of Type 1 Autoimmune
Diabetes. *Front. Endocrinol.* 9:381.
doi: 10.3389/fendo.2018.00381

¹ Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ² National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ³ Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Ribeirão Preto Medical School, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease caused by the destruction of insulin-producing cells in the pancreas, by direct interactions with autoreactive pancreas infiltrating T lymphocytes (PILs). One of the most important animal models for this disease is the non-obese diabetic (NOD) mouse. Alterations in the NOD mouse thymus during the pathogenesis of the disease have been reported. From the initial migratory disturbances to the accumulation of mature thymocytes, including regulatory Foxp3⁺ T cells, important mechanisms seem to regulate the repertoire of T cells that leave the thymus to settle in peripheral lymphoid organs. A significant modulation of the expression of extracellular matrix and soluble chemoattractant molecules, in addition to integrins and chemokine receptors, may contribute to the progressive accumulation of mature thymocytes and consequent formation of giant perivascular spaces (PVS) that are observed in the NOD mouse thymus. Comparative large-scale transcriptional expression and network analyses involving mRNAs and miRNAs of thymocytes, peripheral T CD3⁺ cells and PILs provided evidence that in PILs chemokine receptors and mRNAs are post-transcriptionally regulated by miR-202-3p resulting in decreased activity of these molecules during the onset of T1D in NOD mice. In this review, we discuss the abnormal T-cell development in NOD mice in the context of intrathymic expression of different migration-related molecules, peptides belonging to the family of insulin and insulin-like growth factors as well as the participation of miRNAs as post-transcriptional regulators and their possible influence on the onset of aggressive autoimmunity during the pathogenesis of T1D.

Keywords: non-obese diabetic mouse, type 1 diabetes, thymus, autoimmune diabetes, insulin, insulin-like growth factor, miRNA

INTRODUCTION

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial disease caused by autoimmune destruction of pancreatic beta cells, which results in a breakdown of insulin production and glucose metabolism (1). The mechanisms involved in autoimmunity during the pathogenesis of T1D include factors of humoral immunity, such as the presence of circulating autoantibodies (anti-insulin, among other islet autoantibodies), that can be used as biomarkers of the disease (2–4). Mechanisms involving cellular immunity are evidenced by the presence of mononuclear cell infiltrates in the islets of Langerhans. CD8 T cells are the most predominant infiltrating-cells, followed by macrophages, CD4 T cells, B lymphocytes and plasma cells (5). In addition to the cellular infiltrate, the upregulation of MHC class I on β -cells may increase their susceptibility to T-cell-mediated killing (6). Most of the studies in humans were performed in pancreas samples removed post-mortem. Due to the limited availability concerning the samples and difficulties in studying the mechanisms of autoimmunity in humans, the use of experimental models are essential for studies on the pathogenesis of T1D. Among the available experimental models, the non-obese diabetic (NOD) mouse is particularly well characterized. They spontaneously develop the disease and present several characteristics that are similar to the pathogenesis of the human T1D (7, 8). Briefly, insulinitis starts in general at 3 weeks of age in female mice, concomitantly with the appearance of initial thymic alterations, and the disease onset occurs at 10–12 weeks, depending on the colony. At this point, different alterations in the thymus have been described, as we discuss below. Nevertheless, before entering this discussion, it seems worthwhile to provide a basic background on some physiological aspects of the thymus, including the intrathymic T-cell differentiation, as well as production of hormones by thymic cells.

THE THYMUS AND THYMOCYTE DEVELOPMENT

The thymus is a primary lymphoid organ where T cells are generated. Inside the thymic tissue, precursor cells pass through distinct differentiation stages until becoming mature CD4 or CD8 single-positive (SP) thymocytes expressing the T-cell receptor (TCR), which are ready to emigrate to peripheral lymphoid organs and properly finish their maturation (9). Cell differentiation occurs in parallel with cell migration, so that the immature double-negative (DN) for the CD4⁻CD8⁻ co-receptors and double-positive (DP) CD4⁺CD8⁺ thymocytes are localized in the cortical region of the thymic lobules, while more mature CD4SP or CD8SP thymocytes are localized in the medulla (10). DP thymocytes express low amounts of TCR after gene rearrangement. This expression is increased during differentiation to TCR^{high} CD4SP or CD8SP cells. Differentiating cells undergo apoptosis if their TCR interact with high avidity with self-antigens coupled to major histocompatibility complex (MHC) class I or class II molecules expressed by microenvironmental cells in the thymus, in a process

called negative selection. Alternatively, some clones that recognize self-antigens with high avidity become regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (Treg), a mechanism that seems to depend on TCR signaling avidity and duration, TGF- β -mediated survival and cytokines, such as IL-2, IL-7, and IL-15 (11, 12). These thymus-derived Treg cells account for the majority of Tregs in the periphery, compared with Tregs differentiated from conventional naive T cells (13). Together, these processes avoid the development of self-antigen reactive cells and therefore prevents autoimmunity (14).

In the thymus, the expression of many peripheral tissue antigens (PTAs) in medullary thymic epithelial cells (mTEC) is regulated by the autoimmune regulator (AIRE) transcription factor (15). The PTAs are presented by MHC molecules and can induce negative selection of autoreactive thymocytes (16). The homozygous loss or mutations in the Aire gene cause the autoimmune polyendocrinopathy–candidosis–ectodermal dystrophy (APECED) syndrome in humans, characterized by the development of autoimmune diseases including T1D in 10–20% of the cases (17–19). In mice, Aire disruption leads to immune cell infiltration in several organs and APECED-autoimmune like manifestations (15, 20).

While migrating through the thymic lobules, developing thymocytes also interact with other microenvironmental cells such as dendritic cells (DCs) and macrophages, as well as with extracellular matrix (ECM) molecules and soluble proteins such as cytokines, chemokines, growth factors and thymic hormones (thymulin and thymopoietin, for example). Other hormones produced by endocrine glands (growth hormone, glucocorticoids, prolactin, oxytocin and insulin) can also be produced locally, and play a role in the physiology of the thymus and the generation of the T-cell repertoire (10).

INTRATHYMIC EXPRESSION OF PEPTIDES AND RECEPTORS FROM THE INSULIN/IGF FAMILY

Insulin is a polypeptidic hormone produced as a pre-prohormone, the pre-proinsulin, which is processed to proinsulin that is cleaved, in turn, to mature insulin. Only pancreatic beta cells are capable to secrete mature insulin in response to glucose (21). Despite that, proinsulin gene is naturally expressed at low levels in fetal and postnatal thymi in humans, rats and mice (22). Although the expression of proinsulin in the thymus is not necessary for T cell differentiation and growth (23, 24), variations in the expression of the insulin gene in the thymus, but not in the pancreas, in both humans and mice, can modulate self-tolerance to insulin, with the expression levels being inversely correlated with T1D susceptibility (21, 25).

In humans, the insulin gene is under the control of a variable number of tandem repeats (VNTR) minisatellites, mapping 5' to the insulin gene promoter. VNTR, commonly known as IDDM2 susceptibility locus, are extremely polymorphic regions both in size and sequence (25, 26), and three allele classes have been characterized: class I, composed by 20–63 repeats of the consensus unit ACAGGGGTCTGGGG, class II alleles containing

64–139 repeats and class III alleles containing 140 to >200 repeats. Although VNTR have little effect in pancreatic insulin transcription, class I alleles in the thymus correlate with low and class III with high levels of insulin mRNA (25, 27).

There is no VNTR regions in mice, but two nonallelic insulin genes *Ins1* and *Ins2* encoding proinsulin 1 and 2 respectively (28, 29). Both insulin genes are expressed by 1–3% of mTECs in the thymus under control of AIRE (15, 30, 31), but *Ins2* expression is predominant in the thymus. Although suggested that this predominant expression leads to a higher tolerance to proinsulin 2 (32), it was demonstrated that proinsulin 2 expression leads to T cell tolerance to an epitope shared by both proinsulin 1 and 2 (33). The copy numbers of insulin gene in the mouse thymus inversely correlates to the numbers of insulin-specific autoreactive T cells in the periphery, so that mice expressing low levels of thymic insulin, (even though pancreatic insulin remains unaltered), present peripheral reactivity to insulin, whereas mice with normal thymic insulin expression have no significant response (34). This effect is transferable by thymic transplantation (35), showing that thymic insulin expression plays a critical role in thymic selection and T1D susceptibility.

Insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2 are polypeptidic growth factors, members of the family of insulin-related peptides, produced in many tissues where they can play endocrine and paracrine functions (36). Both IGF-1 and 2 can bind to type 1 and 2 IGF receptors (IGF-1R/IGF-2R) with high affinity and to insulin receptors (INS-R), with low affinity (37). All the genes of the insulin family are expressed in the thymus during the fetal life; IGF2 is predominantly expressed in the rat, mouse and human thymi by TEC and Thymic Nurse Complexes (TNC), followed by IGF1, expressed by TECs and macrophages. The proinsulin genes are expressed by mTECs and DCs (38–41). In general, protein levels are related with gene levels in the case of these molecules.

After birth, IGF-2 gene expression and protein levels decrease and reach the same levels of IGF-1 (32). IGF-2 participates both in T cell development and negative selection (42). Studies using fetal thymic organ cultures (FTOC) demonstrated that the blockage of IGF-mediated signaling between TEC and thymocytes inhibits early T cell proliferation and differentiation (23). Specific anti-IGF-1 antibodies treatment lead to a decreased DN relative cell numbers while the inhibition of IGF-2, IGF-1R or IGF-2R impaired differentiation from the DN to the DP stage. The same study showed a decrease in total T cell numbers under treatment with anti-IGF-1R and anti-IGF-2R antibodies. Moreover, transgenic IGF-2 expression resulted in abnormalities in the terminal differentiation and increased proliferation of TECs. The deposition of fibronectin and laminin is enhanced in human TEC cultures and in the thymus of IGF-2 transgenic mice, in parallel with the enhancement of thymocyte adhesion to TEC monolayers and thymocyte migration (43).

IGF-2 expression by the thymic epithelium is under control of AIRE, and the IGF-2 gene is located adjacent to the *Ins* gene (44, 45). Its predominant expression among insulin family members could be explained by IGF-2 close homology to the

other members with high conserved peptides sequences of the family. This could lead to the development of tolerance to IGF-2 and related molecules, including insulin (45). *Igf-2^{-/-}* mice present weaker tolerance to insulin when compared with wild type animals and the production of specific antibodies to IGF-2 is more difficult than to IGF-1 or insulin (46–48).

IGF-1 and its receptor are implicated in several growth hormone (GH) effects in the thymus, as TEC proliferation and thymocyte/TEC adhesion (49), as we further discuss below.

GH/IGF-1 AXIS IN THE THYMUS

Growth hormone is a member of a family of growth factors that includes prolactin and other hormones. It is produced and stored mainly in the anterior pituitary under control of hypothalamic hormones, as the GH-releasing hormone, hypothalamic GH release-inhibiting factor and somatostatin (50), although the production by other cell types was observed, including leukocytes and TECs (51). The early experiments showing that GH is thymotropic revealed that GH-deficient mice present thymus atrophy and this effect is also observed after GH anti-serum treatment of mice with intact pituitary (52).

The GH receptor (GHR) is expressed in cortical and medullary TECs (53, 54) as well as in thymocytes (51, 55), and plays a role in thymic function and T-cell differentiation. The decline of GH production is related with thymic involution (56). Moreover, transgenic mice overexpressing GH have an enlarged thymus, as well as mice and humans treated with recombinant forms of the hormone (57). GH can also modulate the thymic microenvironment by increasing the secretion of cytokines, chemokines and thymulin, consequently modulating thymocyte adhesion and migration (57–60).

As mentioned above, some of the GH effects in the thymus are mediated by IGF-1. Murine TEC lines treated with GH or IGF-1, present an enhancement in ECM molecules production as type IV collagen, fibronectin and laminin, besides the expression of the integrins VLA-5 (alpha 5 beta 1 integrin, a fibronectin receptor) and VLA-6 (alpha 6 beta 1 integrin, a laminin receptor). Treatment with GH also augmented the thymocyte/TEC adhesion, a phenomenon that was blocked by anti-IGF-1 and anti-IGF-1R antibodies (61).

Since the interactions of thymocyte and TECs are crucial for thymocyte development and thymus physiology, one can argue that together, the GH/IGF-1 axis, besides IGF-2 and insulin can shape the T-cell repertoire. Moreover, it is conceivable that defects in the negative selection against PTAs related to this family might cause autoimmunity, as for example T1D, in the case of insulin-related peptides expressed intrathymically.

THYMIC ALTERATIONS IN NOD MICE

Several morphological and phenotypic alterations are observed in the NOD mouse thymus. The most evident is the formation of giant perivascular spaces (PVSs), which are filled with mature CD4SP and CD8SP cells, B cells and regulatory *Foxp3⁺* cells (62–64). We have described that cells inside giant PVSs present

TABLE 1 | Alterations observed in the NOD mouse thymus.

	Alteration*	Affected compartments	References
THYMIC PARENCHYMA STRUCTURES			
PVS	↑↑↑	Medullary region	(62)
TECs	↓	Medullary region	(62)
CELL MIGRATION-RELATED MOLECULES			
VLA-5	↓↓↓	Mainly CD4SP CD8SP and Foxp3 ⁺ regulatory T cells	(64, 65)
VLA-4	↑	DP, CD4SP and CD8SP thymocytes	(64, 65)
VLA-6	↑↑↑	All thymocyte subpopulations	(64)
CXCR4	↓	CD8SP thymocytes	(64)
CXCL12	↑	Mainly inside giant PVSs	(64)
Fibronectin	↑	Mainly inside giant PVSs	(64, 65)
Laminin	↑	Mainly inside giant PVSs	(64, 65)
Type I and IV collagens	↑	Mainly inside giant PVSs	(62)
INSULIN FAMILY-RELATED PEPTIDES AND RECEPTORS			
Insulin	↓↓	mTECs	(66)
IGF-1, IGF-2, INS-R, IGF-1R, IGF-2R	ND	–	–
GH, GHR	ND	–	–
miRNAs			
miR-19a	↓/-	Thymocytes TCR ⁺ /NKT17	(67)
miR-19b	↓/-	Thymocytes TCR ⁺ /NKT17	(67)
miR-133b	-/↑↑	Thymocytes TCR ⁺ /NKT17	(67)
miR-124a	↑/-	Thymocytes TCR ⁺ /NKT17	(67)
miR-326	↓/-	Thymocytes TCR ⁺ /NKT17	(67)

*Alteration comparing NOD with other inbred mouse strains; PVS, perivascular space; TEC, thymic epithelial cell; IGF, insulin-like growth factor; INS-R, insulin receptor; IGF-R, insulin-like growth factor receptor; GH, growth hormone; GHR, growth hormone receptor; NKT17, IL-17-producing natural killer T cells; ND, not described.

a defect in the membrane expression of the integrin-type fibronectin receptor VLA-5 (CD49e/CD29) that may lead to their accumulation and retention in the thymus (65). The formation of giant PVSs also changes the TEC network and ECM contents, both inside PVS and in the thymic parenchyma. Particularly, there is an important deposition of fibronectin inside these spaces (Table 1).

The accumulation of thymocytes and enlargement of PVS starts to be observed at 4 weeks of age in female mice, which are more susceptible for T1D. Clear-cut giant PVS are observed in pre-diabetic mice (9–12 weeks of age), that already present insulinitis (62).

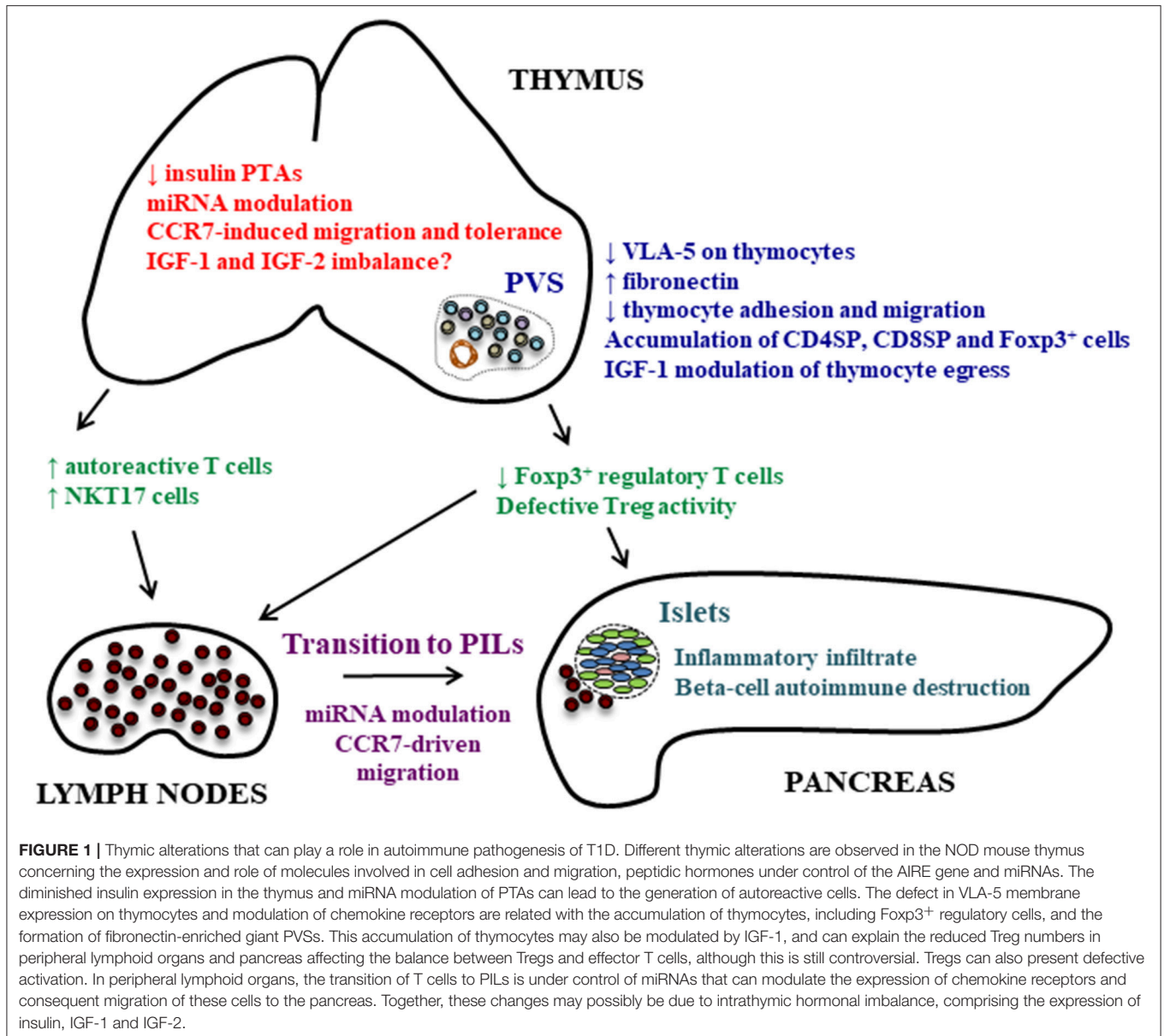
Ex vivo functional assays revealed that NOD thymocytes have a defect in the migratory capacity toward fibronectin, but not laminin. Interestingly, migration toward the chemokine CXCL12 is enhanced, and a synergic effect is observed when CXCL12 is combined with ECM molecules. In the case of fibronectin combined with CXCL12, despite the synergic effect, migration of NOD thymocytes is reduced compared with controls (64, 65).

Another experimental strategy trying to understand the role of VLA-5 in thymocyte accumulation in giant PVS in NOD mice comprised ECM-transmigration assays, which mimic the migration of thymocytes through fibronectin-enriched PVSs and then the transmigration through endothelium. These experiments revealed that NOD thymocytes that first encounter fibronectin molecules transmigrate less than controls (64). Conversely, differences in transmigration assays were not observed when laminin was applied, reinforcing the concept that VLA-5/fibronectin interactions can play a role in the accumulation of thymocytes in PVS during the pathogenesis of T1D (Figure 1).

As mentioned above, thymic insulin expression plays a role in thymic selection processes and T1D development. The expression levels of insulin genes are also altered in the NOD mouse thymus. The *Ins2* gene expression is normal at 2 weeks of age but become lower at 3 weeks, which may favor loss of tolerance to insulin in NOD mice (66, 68). Moreover, *Ins2*^{-/-} NOD mice have accelerated insulinitis and autoimmune diabetes onset in females, increased disease in males, with enhanced prevalence of insulin autoantibodies and stronger insulin response (33). Conversely, insulinitis and diabetes onset were delayed in NOD *Ins1*^{-/-} mice, which can be explained by the dominance of the *Ins2* gene in the thymus, whereas *Ins1* is more prominent in pancreatic beta cells (69). Prevention of both insulinitis and diabetes can be seen in transgenic NOD mice expressing increased levels of *Ins2* under the MHC class II promoter (70), and also after intrathymic administration of insulin (71).

The expansion of autoreactive T cell clones in NOD mice can also be affected by proinsulin gene expression. Although the numbers of CD4SP and CD8SP thymocytes do not change, proinsulin-1 or-2 deficiency in NOD mice causes changes in the T-cell repertoire generated in the thymus and peripheral lymphoid organs, and is associated with a significant expansion of insulin-reactive CD8SP T cell clones in the pancreatic draining lymph node (72).

The effects of IGF-1 on cell trafficking were also analyzed in the adoptive T cell transfer model in NOD mice (73). T cells from diabetic NOD Thy-1.2 mice were injected into congenic NOD Thy-1.1 mice. In this model, reconstitution of the thymus of irradiated recipients with donor cells was not influenced by IGF-1 treatment, but the percentage of donor T cells was significantly reduced in the spleen of IGF-1 treated mice in contrast to the thymus, suggesting that IGF-1 could influence T cell trafficking from the thymus to peripheral lymphoid organs. This might be due to effects of IGF-1 upon the Sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate axis, as demonstrated for myoblast differentiation (74).



The role of IGF-2 specifically in the thymus of NOD mice is not yet defined. However, transcriptome studies revealed that IGF-2 mRNA is downregulated when comparing mTECs from newborn and 5 week old NOD mice (75). A downmodulation was also observed for *Ins1* and *Ins2* mRNA expression. Interestingly, the same was observed in BALB/c mice for both IGF-2 and *Ins-2*, but not for *Ins-1* mRNA. Moreover, the reconstruction of post-transcriptional miRNA-mRNA interaction networks revealed that some miRNAs, including the miR-647 that targets IGF-2 mRNA, were included in the network of BALB/c, but not in the NOD mice (75). In this context, since the expression of PTA mRNAs (and the respective proteins) in mTECs is important for the negative selection process, the mechanisms that inhibit

the regulatory action of miRNAs may be acting in these cells.

The expression of other miRNAs is altered in the thymus of NOD mice when comparing with C57BL/6 mice (Table 1). The miR-19a, miR-19b and miR-326 are downregulated whereas miR-124a is upregulated on TCR⁺ thymocytes. MiR-133b is upregulated only in natural killer T (NKT) cells in the thymus (67). This miRNA targets and regulates the transcription factor Th-POK, which negatively regulates the differentiation of IL-17 producing NKT cells (NKT17). Thus, the diminished expression of Th-POK can induce the differentiation of NKT17 cells and explain the enhanced numbers of these cells in the thymus and peripheral lymphoid organs of NOD mice (67), which can be related with exacerbation of diabetes (76).

THE ROLE OF MIRNAS THROUGHOUT TRANSITION OF THYMOCYTES INTO PANCREAS INFILTRATING LYMPHOCYTES

During the period of evolution of autoimmune reactivity in NOD mice, even before the appearance of clinical signs of T1D, thymocytes that differentiate into peripheral CD3⁺ T lymphocytes sequentially modulate (up- or down-regulate), a significant set of mRNAs that encode proteins involved in the intrathymic negative selection, T cell maturation, differentiation and autoreactivity (77). Among the peripheral T lymphocytes residing in the spleen and/or in the lymph nodes some autoreactive clones will evolve into PILs in mice and humans (1, 78, 79). Insulin-specific CD4 and CD8 T cells targeting multiple epitopes are predominant in the islet infiltrating T cells in pre-diabetic NOD mice pancreas (80), with proinsulin 2 being proposed as the major isoform recognized by those cells (33).

During the transition of peripheral T lymphocytes into PILs, a large set of mRNAs is transcriptionally modulated causing changes in the transcriptome profile of these cells with parallel modulation of miRNAs. These transcriptional changes are robust enough to hierarchize the different cell types (thymocytes, CD3⁺ peripheral T lymphocytes and PILs) and the different stages of NOD mice regarding the onset of T1D (pre- or diabetic animals) according to their respective mRNA or miRNA expression signatures (81). The miRNA modulation strongly suggests that transition into PILs would be under posttranscriptional control, i.e., the effect of specific miRNAs upon target mRNAs that encode proteins involved in this process.

The reconstruction of miRNA-mRNA interaction networks, based on differential expression profiling of peripheral T lymphocytes during their transition into PILs in NOD mice predicted mRNA targets in an unbiased way. As these cells develop into CD3⁺ peripheral T cells and then into PILs, thymocytes exhibited miRNA interactions with mRNA targets that encode proteins related to apoptosis, cell adhesion, positive and negative selection in the thymus. The interactions involving miR-202-3p with CCR7 mRNA were highlighted in the work of Fornari et al. (81), showing that CCR7 is involved with the control of central tolerance and mice lacking this chemokine receptor generated autoreactive T cells (82). Moreover, CCR7 directs T-cells toward the pancreas of NOD mice, since desensitization of CCR7 blocked T-cell migration from the bloodstream into pancreatic islets (83).

A second interaction emphasized was miR-202-3p-CD247 mRNA in NOD mice (81). Under disturbance during TCR signaling, the CD3 zeta chain enhanced autoimmune diabetes in mice (84).

The evidence at this moment suggests that the transition into PILs is under post-transcriptional control exerted by miRNAs (Figure 1). Interestingly, some miRNAs such as miR-375, miR-30d and miR-9, can control insulin synthesis and secretion by pancreatic beta-cells (85) in NOD mice. Whether miRNAs also regulate the intrathymic production of proinsulin/insulin and IGF remains unknown.

FUTURE DEVELOPMENTS AND CONCLUDING REMARKS

Although the precise biological mechanism(s) underlying how differentiating thymocytes evolve to autoreactive T-cells infiltrating and destroying pancreatic beta cells are not elucidated, it is likely that disturbances of gene and miRNA signatures may be part of this process, as well as changes in the profiles of cell migration of both thymocytes and peripheral T lymphocytes. In this context, besides the questions raised throughout the text, other important questions remain unanswered, such as the possible direct role of the thymic alterations in the pathogenesis of T1D and the presence of similar alterations in humans.

In humans, serum GH levels are enhanced in T1D patients (86), and IGF-1 and IGF-1R mRNA levels are reduced in peripheral blood mononuclear cells (87). The circulation levels of GH are enhanced whereas IGF-1 levels are diminished in NOD diabetic mice 4 weeks after the appearance of glycosuria (88), suggesting similarities in hormone imbalance between T1D patients and NOD mice at least after disease diagnosis.

Hormonal imbalance in the thymus can be involved in the control of the physiology of the organ in NOD mice and humans, as the properly maturation of the cells, cell adhesion, migration, accumulation and egress, by the modulation of ECM molecules and integrins, chemokines and chemokine receptors, sphingosine-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (10, 64, 65, 89). As an example, GH/IGF-1 axis can modulate the expression of cytokines, chemokines and ECM molecules and receptors in the thymus (61). GH modulates thymocyte adhesion and migration properties, and promotes thymocyte egress (59). The effects of GH can be regulated by IGF-1, which can in turn bind IGF-R and insulin receptor (90). Lower insulin levels in the thymus are related with reactivity to insulin in the periphery, including in NOD mice (33). Together, these mechanisms can shape the T cell repertoire and change the frequency of Tregs and the ratio of Treg and effector T cells (34, 45). The diminished frequency of Tregs in NOD mice is controversial, and most studies in T1D patients have reported no differences in the frequency of Tregs in peripheral blood. Likewise, phenotype and diminished suppressive capacity have been reported in both NOD and T1D patients (64, 91–93). Whether these specific issues are related with hormonal imbalance during the pathogenesis of T1D, comprising the expression of insulin, GH/IGF-1 and IGF-2, need further investigation.

AUTHOR'S NOTE

This manuscript is dedicated to Prof. Mireille Dardenne, for her significant contribution in the field of Immunoendocrinology along the last 50 years. In 2017 we celebrated her 80th birthday.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed conceived and wrote the manuscript, and approved it for publication.

FUNDING

This work was developed in the context of the National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM) and was partially funded with grants from the Oswaldo Cruz Foundation, the Brazilian National Council for Development of Science and Technology

(CNPq) grant # 306315/2013-0 to GP, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) grant # 88881.068105/2014-01 to GP, State of Rio de Janeiro Foundation for Funding Research (FAPERJ), State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant # 13/17481-1 to GP, and the Mercosur Program for Structural Convergence (FOCEM #03/11).

REFERENCES

- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* (2014) 383:69–82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7
- Lampasona V, Liberati D. Islet autoantibodies. *Curr Diab Rep.* (2016) 16:53. doi: 10.1007/s11892-016-0738-2
- Ziegler A, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes the 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* (1999) 48:460–8.
- Cheng B-W, Lo F-S, Wang A-M, Hung C-M, Huang C-Y, Ting W-H, et al. Autoantibodies against islet cell antigens in children with type 1 diabetes mellitus. *Oncotarget* (2018) 9:16275–83. doi: 10.18632/oncotarget.24527
- Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* (2009) 155:173–81. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03860.x
- Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. *In situ* characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* (1985) 313:353–60. doi: 10.1056/NEJM198508083130604
- Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* (2016) 66:76–88. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.019
- Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T cell-mediated beta cell destruction: autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. *Front Endocrinol.* (2017) 8:343. doi: 10.3389/fendo.2017.00343
- Boursalian TE, Golob J, Soper DM, Cooper CJ, Fink PJ. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol.* (2004) 5:418–25. doi: 10.1038/ni1049
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* (2016) 12:77–89. doi: 10.1038/nrendo.2015.168
- Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* (2010) 32:95–106. doi: 10.1007/s00281-010-0200-5
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* (2012) 30:531–64. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer A-C, Abramson J, et al. Treg cell differentiation: from thymus to peripheral tissue. *Prog Mol Biol Trans Sci.* (2015) 136:175–205. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.07.014
- Geenen V. Thymus and type 1 diabetes: an update. *Diabetes Res Clin Pract.* (2012) 98:26–32. doi: 10.1016/j.diabres.2012.05.023
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* (2002) 298:1395–401. doi: 10.1126/science.1075958
- 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) 6:352. doi: 10.3389/fimmu.2015.00352
- Ahonen P. Autoimmune polyendocrinopathy - candidosis - ectodermal dystrophy (APECED): autosomal recessive inheritance. *Clin Genet.* (1985) 27:429–32. doi: 10.1016/B978-1-4557-4975-1.00061-9
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* (1997) 17:393–8. doi: 10.1038/ng1297-393
- Levi D, Polychronakos C. Expression profile of a clonal insulin-expressing epithelial cell in the thymus. *Mol Immunol.* (2013) 56:804–10. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.015.Expression
- Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, Halonen M, Moro A, Kämpe O, et al. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet.* (2002) 11:397–409. doi: 10.1093/hmg/11.4.397
- Pugliese A. The insulin gene in type 1 diabetes. *IUBMB Life* (2005) 57:463–8. doi: 10.1080/15216540500163301
- Kecha-Kamoun O, Achour I, Martens H. Thymic expression of insulin-related genes in an animal model of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* (2001) 17:146–52. doi: 10.1002/dmrr.182
- Kecha O, Brilot F, Martens H, Franchimont N, Renard C, Greimers R, et al. Involvement of insulin-like growth factors in early T cell development: a study using fetal thymic organ cultures. *Endocrinology* (2000) 141:1209–17. doi: 10.1210/endo.141.3.7360
- Carlsén M, Cilio CM. Normal T cell development in the absence of thymic insulin expression. *Ann NY Acad Sci.* (2006) 1079:205–12. doi: 10.1196/annals.1375.032
- Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet.* (1997) 15:289–92. doi: 10.1038/ng0397-289
- Bennett ST, Todd JA. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet.* (1996) 30:343–70.
- Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* (1997) 15:293–7. doi: 10.1038/ng0797-270
- Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol.* (1986) 23:305–12. doi: 10.1007/BF02100639
- Duvillé B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, et al. Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1997) 94:5137–40. doi: 10.1073/pnas.94.10.5137
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* (2001) 2:2915–22. doi: 10.1038/ni723
- Chentoufi AA, Palumbo M, Polychronakos C. Proinsulin expression by Hassall's corpuscles in the mouse thymus. *Diabetes* (2004) 53:354–9. doi: 10.2337/diabetes.53.2.354
- Kermani H, Goffinet L, Mottet M, Bodart G, Morrhaye G, Dardenne O, et al. Expression of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during Balb/c thymus ontogeny and effects of growth hormone upon *ex vivo* T cell differentiation. *Neuroimmunomodulation* (2012) 19:137–47. doi: 10.1159/000328844
- Thébault-baumont K, Dubois-laforge D, Krief P, Briand J, Halbout P, Vallon-geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2 - deficient NOD mice. *J Clin Invest.* (2003) 111:851–7. doi: 10.1172/JCI200316584.Introduction
- Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive t-cell tolerance the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* (2002) 51:1383–90. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1383
- Faideau B, Lotton C, Lucas B, Tardivel I, Elliott JF, Boitard C, et al. Tolerance to proinsulin-2 is due to radioresistant thymic cells. *J Immunol.* (2006) 177:53–60. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.53

36. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* (1993) 75:73–82. doi: 10.1016/0092-8674(93)90680-O
37. Neely EK, Beukers MW, Oh Y, Cohen P, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor receptors. *Acta Paediatr Scand.* (1991) 372:116–23.
38. Geenen V, Achour I, Robert F, Vandersmissen E, Sodoyez J-C, Defresne M-P, et al. Evidence that insulin-like growth factor 2 (IGF2) is the dominant thymic peptide of the insulin superfamily. *Thymus* (1993) 21:115–27.
39. Geenen V, Kecha O, Brilot F, Charlet-Renard C, Martens H. The thymic repertoire of neuroendocrine-related self antigens: biological role in T-cell selection and pharmacological implications. *Neuroimmunomodulation* (1999) 6:115–25. doi: 10.1159/000026371
40. Jolicoeur C, Hanahan D, Smith KM. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1994) 91:6707–11. doi: 10.1073/pnas.91.14.6707
41. Geenen V. The thymic insulin-like growth factor axis : involvement in physiology and disease. *Horm Metab Res.* (2003) 35:1–8. doi: 10.1055/s-2004-814161
42. Geenen V, Lefebvre PJ. The intrathymic expression of insulin-related genes: implications for pathophysiology and prevention of Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev.* (1998) 14:95–103.
43. 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) 12:100–12. doi: 10.1159/000083582
44. Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* (1984) 310:781–4. doi: 10.1038/310781a0
45. Chentoufi AA, Geenen V. Thymic self-antigen expression for the design of a negative/tolerogenic self-vaccine against type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol.* (2011) 2011: 349368. doi: 10.1155/2011/349368
46. Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* (1981) 68:1321–30. doi: 10.1172/JCI110379
47. Shimatsu A, Nakamura Y, Ihara C, Mizuta H, Murabe H. Serum Insulin-like growth factor-II (IGF-II) levels in patients with acromegaly and growth hormone deficiency: correlation with IGF-I and IGF binding protein-3. *Endocr J.* (1996) 43:S71-3.
48. Hansenne I, Renard-Charlet C, Greimers R, Geenen V. Dendritic cell differentiation and immune tolerance to insulin-related peptides in Igf2-deficient mice. *J Imm.* (2006) 176:4651–7. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4651
49. Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault M-C, Bach J-F, et al. Growth hormone and insuli-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells*. *J Clin Endocrinol Metab.* (1992) 75:183–8. doi: 10.1210/jcem.75.1.1619008
50. Welniak LA, Sun R, Murphy WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J Leukoc Biol.* (2002) 71:381–7. doi: 10.1189/jlb.71.3.381. (Accessed January 30, 2018).
51. de Mello-Coelho V, Gagnerault M-C, Souberbielle J-C, Strasburger CJ, Savino W, Dardenne M, et al. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* (1998) 139:3837–42. doi: 10.1210/endo.139.9.6199
52. Pierpaoli W, Sorkin E. Hormones and immunologic capacity. I. effect of heterologous anti-growth hormone (ASTH) antiserum on thymus and peripheral lymphatic tissue in mice. Induction of a wasting syndrome. *J Immunol.* (1968) 101:1036–43. (Accessed January 30, 2018).
53. Mertani HC, Delehay-Zervas MC, Martini JF, Postel-Vinay MC, Morel G. Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues. *Endocrine* (1995) 3:135–42. doi: 10.1007/BF02990065
54. Mertani HC, Morel G. *In situ* gene expression of growth hormone (GH) receptor and GH binding protein in adult male rat tissues. *Mol Cell Endocrinol.* (1995) 109:47–61. (Accessed January 30, 2018).
55. Gagnerault MC, Postel-Vinay MC, Dardenne M. Expression of growth hormone receptors in murine lymphoid cells analyzed by flow cytometry. *Endocrinology* (1996) 137:1719–26. doi: 10.1210/endo.137.5.8612507
56. Hirokawa K, Utsuyama M, Kikuchi Y. Trade off situation between thymus and growth hormone: age-related decline of growth hormone is a cause of thymic involution but favorable for elongation of lifespan. *Biogerontology* (2016) 17:55–9. doi: 10.1007/s10522-015-9590-z
57. Savino W, Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Dardenne M. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. *Ann NY Acad Sci.* (2012) 1261:49–54. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06637.x
58. Smaniotto S, Ribeiro-Carvalho MM, Dardenne M, Savino W, de Mello-Coelho V. Growth hormone stimulates the selective trafficking of thymic CD4+CD8- emigrants to peripheral lymphoid organs. *Neuroimmunomodulation* (2004) 11:299–306. doi: 10.1159/000079410
59. 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) 146:3005–17. doi: 10.1210/en.2004-0709
60. Lins MP, de Araújo Vieira LF, Rosa AAM, Smaniotto S. Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes *in vitro*. *Biol Res.* (2016) 49:37. doi: 10.1186/s40659-016-0097-0
61. de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Dardenne M, Savino W. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol.* (1997) 76:39–49. (Accessed August 5, 2015).
62. Savino W, Boitard C, Bach JF, Dardenne M. Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab Invest.* (1991) 64:405–17. (Accessed August 5, 2015).
63. Savino W, Carnaud C, Luan JJ, Bach JF, Dardenne M. Characterization of the extracellular matrix-containing giant perivascular spaces in the NOD mouse thymus. *Diabetes* (1993) 42:134–40. (Accessed August 5, 2015).
64. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol.* (2008) 180:4639–47. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4639. (Accessed August 10, 2016).
65. Cotta-de-Almeida V, Villa-Verde DMS, Lepault F, Pléau J-M, Dardenne M, Savino W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur J Immunol.* (2004) 34:1578–87. doi: 10.1002/eji.200324765
66. Brimnes MK, Jensen T, Jørgensen TN, Michelsen BK, Troelsen J, Werdelin O. Low expression of insulin in the thymus of non-obese diabetic mice. *J Autoimmun.* (2002) 19:203–13. doi: 10.1006/jaut.2002.0616
67. Di Pietro C, De Giorgi L, Cosorich I, Sorini C, Fedeli M, Falcone M. MicroRNA-133b regulation of Th-POK expression and dendritic cell signals affect NKT17 cell differentiation in the thymus. *J Immunol.* (2016) 197:3271–80. doi: 10.4049/jimmunol.1502238
68. Chen W, Bergerot I, Elliott JF, Harrison LC, Abiru N, Eisenbarth GS, et al. Evidence that a peptide spanning the B-C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. *J Immunol.* (2001) 167:4926–35. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.4926
69. Moriyama H, Abiru N, Paronen J, Sikora K, Liu E, Miao D, et al. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) 100:10376–81. doi: 10.1073/pnas.1834450100
70. French MB, Allison J, Cram DS, Thomas HE, Dempsey-collier M, Silva A, et al. Taisgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* (1997) 46:34–9.
71. Cetkovic-Cvrlje M, Gerling IC, Muir A, Atkinson MA, Elliott JF, Leiter EH. Retardation or acceleration of diabetes in NOD/Lt mice mediated by intrathymic administration of candidate β -cell antigens. *Diabetes* (1997) 46:1975–82.
72. Pearson JA, Thayer TC, McLaren JE, Ladell K, De Leenheer E, Phillips A, et al. Proinsulin expression shapes the TCR repertoire but fails to control the development of low-avidity insulin-reactive CD8⁺ T cells. *Diabetes* (2016) 65:1679–89. doi: 10.2337/db15-1498
73. Bergerot I, Fabien N, Maguer V, Thivolet C. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin Exp Immunol.* (1995) 102:335–40. (Accessed January 30, 2018).

74. Bernacchioni C, Cencetti F, Blescia S, Donati C, Bruni P. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate axis: a new player for insulin-like growth factor-1-induced myoblast differentiation. *Skelet Muscle* (2012) 2:15. doi: 10.1186/2044-5040-2-15
75. Macedo C, Oliveira EH, Almeida RS, Donate PB, Fornari TA, Pezzi N, et al. Aire-dependent peripheral tissue antigen mRNAs in mTEC cells feature networking refractoriness to microRNA interaction. *Immunobiology* (2015) 220:93–102. doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.015
76. Simoni Y, Gautron A-S, Beaudoin L, Bui L-C, Michel M-L, Coumoul X, et al. NOD mice contain an elevated frequency of iNKT17 cells that exacerbate diabetes. *Eur J Immunol.* (2011) 41:3574–85. doi: 10.1002/eji.201141751
77. Fornari TA, Donate PB, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. *Clin Dev Immunol.* (2011) 2011:1–12. doi: 10.1155/2011/158735
78. Michels AW, Landry LG, McDaniel KA, Yu L, Campbell-Thompson M, Kwok WW, et al. Islet-derived CD4T cells targeting proinsulin in human autoimmune diabetes. *Diabetes* (2017) 66:722–34. doi: 10.2337/db16-1025
79. Serreze D V, Leiter EH. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr Opin Immunol.* (1994) 6:900–6. (Accessed January 29, 2018).
80. Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D. Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. *J Autoimmun.* (1994) 7:833–43.
81. Fornari TA, Donate PB, Assis AF, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, et al. Comprehensive survey of miRNA-mRNA interactions reveals that Ccr7 and Cd247 (CD3 zeta) are posttranscriptionally controlled in pancreas infiltrating T lymphocytes of Non-Obese Diabetic (NOD) mice. *PLoS ONE* (2015) 10:e0142688. doi: 10.1371/journal.pone.0142688
82. Martin AP, Marinkovic T, Canasto-Chibuque C, Latif R, Unkeless JC, Davies TF, et al. CCR7 deficiency in NOD mice leads to thyroiditis and primary hypothyroidism. *J Immunol.* (2009) 183:3073–80. doi: 10.4049/jimmunol.0900275
83. Shan Z, Xu B, Mikulowska-Mennis A, Michie SA. CCR7 directs the recruitment of T cells into inflamed pancreatic islets of nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunol Res.* (2014) 58:351–7. doi: 10.1007/s12026-014-8500-9
84. Lundholm M, Mayans S, Motta V, Löfgren-Burström A, Danska J, Holmberg D. Variation in the Cd3 zeta (Cd247) gene correlates with altered T cell activation and is associated with autoimmune diabetes. *J Immunol.* (2010) 184:5537–44. doi: 10.4049/jimmunol.0904012
85. Zheng Y, Wang Z, Zhou Z. miRNAs: novel regulators of autoimmunity-mediated pancreatic β -cell destruction in type 1 diabetes. *Cell Mol Immunol.* (2017) 14:488–96. doi: 10.1038/cmi.2017.7
86. Hayford JT, Danney MM, Hendrix JA, Thompson RG. Integrated concentration of growth hormone in juvenile-onset diabetes. *Diabetes* (1980) 29:391–8. (Accessed May 21, 2018).
87. de Souza KSC, Ururahy MAG, da Costa Oliveira YM, Loureiro MB, da Silva HPV, Bortolin RH, et al. Low bone mineral density in patients with type 1 diabetes: association with reduced expression of *IGF1*, *IGF1R* and *TGF β 1* in peripheral blood mononuclear cells. *Diabetes Metab Res Rev.* (2016) 32:589–95. doi: 10.1002/dmrr.2772
88. Landau D, Segev Y, Eshet R, Flyvbjerg A, Phillip M. Changes in the growth hormone-IGF-I axis in non-obese diabetic mice. *Int J Exp Diabetes Res.* (2000) 1:9–18. doi: 10.1155/EDR.2000.9 (Accessed May 20, 2018).
89. Lemos J, Smaniotta S, Messias C, Moreira O, 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) 19:1446. doi: 10.3390/ijms19051446
90. de Mello Coelho V, Villa-Verde DMS, Farias-de-Oliveira DA, Marques de Brito J, Dardenne M, Savino W. Functional insulin-like growth factor-1/insulin-like growth factor-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. *Clin Neuroendocrinol.* (2002) 75:139–50. doi: 10.1159/000048230
91. Ferreira C, Palmer D, Blake K, Garden OA, Dyson J. Reduced regulatory T cell diversity in NOD mice is linked to early events in the thymus. *J Immunol.* (2014) 192:4145–52. doi: 10.4049/jimmunol.1301600
92. Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia* (2017) 60:1839–50. doi: 10.1007/s00125-017-4377-1
93. Visperas A, Vignali DAA. Are regulatory T cells defective in type 1 diabetes and can we fix them? *J Immunol.* (2016) 197:3762–70. doi: 10.4049/jimmunol.1601118

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling Editor is currently co-organizing a Research Topic with the authors DMC, WS and confirms the absence of any other collaboration.

Copyright © 2018 Mendes-da-Cruz, Lemos, Passos and Savino. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.