

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA VALENÇA MESSIAS RACHID

Papel das interações mediadas por esfingosina-1-fosfato na migração de
precursores de células T neoplásicas

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

Orientadores: Prof. Dr^a. Daniella Arêas Mendes da Cruz
Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

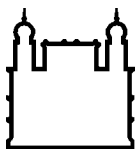
R119 Rachid, Carolina Valença Messias

Papel das interações mediadas por esfingosina-1-fosfato na migração de precursores de células T neoplásicas / Carolina Valença Messias Rachid. – Rio de Janeiro, 2016.
xii, 103 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 82-103

1. Esfingosina-1-fosfato (S1P). 2. Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1). 3. Leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T (LLL-T). 4. Migração celular. I. Título.

CDD 571.67



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA VALENÇA MESSIAS RACHID

PAPEL DAS INTERAÇÕES MEDIADAS POR ESFINGOSINA-1-FOSFATO NA MIGRAÇÃO DE PRECURSORES DE CÉLULAS T NEOPLÁSICAS

**ORIENTADORES: Prof. Dr^a. Daniella Arêas Mendes da Cruz
Prof. Dr. Wilson Savino**

Aprovada em: 14/04/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes
Prof. Dra. Fernanda Nazaré Morgado
Prof. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida (Revisor e Suplente)
Prof. Dr. Zilton Vasconcelos (Suplente)

Rio de Janeiro, 14 de Abril de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pela força para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, pela confiança, por sempre apoiarem minhas decisões e me ajudarem a seguir os meus sonhos, por sempre quererem investir no meu futuro e buscarem o melhor pra mim, e por entenderem minha ausência nos últimos meses.

Ao Fábio, meu amigo e marido, pela força, pelo apoio, pelo suporte emocional, pela paciência, pelo companheirismo, pelo amor, pelo carinho, por acreditar em mim e me ajudar a seguir os meus sonhos, por sempre estar lá para me acalmar e por sempre estar ao meu lado, dando total sentido a minha vida.

Ao meu irmão, João, por me aguentar desde sempre.

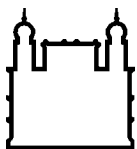
Às irmãs que escolhi, Ana Carolina, Pâmella, Mariana, e Fernanda, pela amizade sem fim nesses 18-19 anos, pelos momentos de descontração, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por estarem sempre ao meu lado fazendo minha vida mais feliz.

A todos do Laboratório de Pesquisas Sobre o Timo (LPT), por tornarem estes anos mais divertidos e mais felizes. Apesar de não citar o nome de todos os componentes do laboratório aqui, cada um, de alguma forma, tem contribuição neste trabalho; À Eliane pela ajuda nos experimentos de Western -Blot e de RT-PCR; Ao Désio pela ajuda com as culturas celulares; e à Julia pela ajuda nos experimentos em geral.

Ao Dr. Zilton Vasconcelos por ter cedido os plasmídeos e pela ajuda na eletroporação celular; ao Dr. Arnon Jurberg pela ajuda também com a eletroporação celular; ao Dr. Otacilio Moreira pela ajuda nas análises de RT-PCR quantitativo; e à Plataforma de PCR em tempo real (PDTIS - RPT09A), da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Ao Vinicius pela revisão deste trabalho, pelas inúmeras discussões científicas e pela oportunidade.

Aos meus orientadores Daniella e Savino, pela grande oportunidade, por terem investido, pelas diversas discussões científicas, pelas críticas e pela dedicação neste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

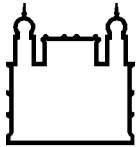
PAPEL DAS INTERAÇÕES MEDIADAS POR ESFINGOSINA-1-FOSFATO NA MIGRAÇÃO DE PRECURSORES DE CÉLULAS T NEOPLÁSICAS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carolina Valença Messias Rachid

A leucemia/linfoma linfoblástico de células T (LLL-T) é um processo patológico resultante de proliferações malignas de precursores de células T em diferentes estágios de desenvolvimento. Como os blastos de LLL-T apresentam características de precursores de células T normais, moléculas envolvidas na migração destas células podem estar envolvidas da migração e saída de blastos de LLL-T no curso da doença. Nesse sentido, foi descrito que o receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1) é essencial para a saída de timócitos do timo. Nós observamos anteriormente que células de pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) e linfoma linfoblástico de células T (LL-T) expressam o receptor S1P1, assim como três linhagens celulares (MOLT-4, Jurkat e CEM) que representam esta doença. Baixas concentrações de S1P induzem a quimiotaxia destas células, mas não altas concentrações de S1P, e esta migração é dependente do S1P1 e de polimerização de actina. Entretanto nossos dados também indicam que outros receptores de S1P podem estar envolvidos nesse processo. No presente estudo, avaliamos a expressão e o papel dos receptores de S1P na migração de precursores de células T neoplásicas. Nós observamos que as linhagens celulares acima descritas expressam não só S1P1, mas outros receptores de S1P. MOLT-4 expressa preferencialmente S1P1, S1P3 e S1P5, Jurkat expressa S1P1 e S1P3, enquanto CEM expressa todos os receptores de S1P, com exceção de S1P2. Verificamos ainda que altas concentrações de S1P induzem a fugotaxia da célula CEM e que este processo é dependente do S1P1. Em contrapartida, nossos dados mostram que a migração celular induzida por baixas concentrações de S1P induz não só a quimiotaxia, mas também a quimioquinesa desta célula. Além disso, observamos que o S1P3, único receptor expresso comumente por estas células, não está envolvido na quimiotaxia dos blastos de LLA-T. S1P ativa ainda as vias de sinalização de AKT e ERK, mas não de Rac1, e a ativação destas vias parece ser mediada pelo S1P1. No entanto, baixas e altas concentrações de S1P ativam estas vias de forma distinta. Altas concentrações de S1P parecem induzir uma ativação mais tardia de AKT e ERK, enquanto uma diminuição na atividade de Rac1 é observada. Nossos dados sugerem que S1P1 regula diferencialmente a migração dos blastos de LLA-T, dependendo da concentração de S1P no meio. Desta forma, a interação S1P/S1P1 deve ser considerada como possível estratégia terapêutica, visando a prevenção da disseminação dos blastos que pode ser resultante da quimiotaxia ou da fugotaxia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROLE OF INTERACTIONS MEDIATED BY SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE IN THE MIGRATION OF NEOPLASTIC T LYMPHOCYTES PRECURSORS

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Carolina Valença Messias Rachid

T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma (T-LLL) is a pathologic process resulting from malignant proliferations of T-cell precursors at different stages of development. As T-LLL lymphoblasts present similar characteristics of normal T-cell precursors, molecules involved on the migration of these cells might also be associated with migration and homing of T-LLL blasts. In this context, sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) has been described as essential for thymocyte egress from the thymus. We previously observed that patient's cells with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LL) express S1P1, as well as three T-ALL cell lines (MOLT-4, Jurkat, and CEM). Low S1P concentrations induce chemotaxis of T-ALL cell lines, but high S1P concentrations do not. This migration mediated through S1P1 and actin polymerization events. However, our data suggests that other S1P receptors might be involved in this process. Herein, we evaluate the expression and role of S1P receptors in the migration of neoplastic T-cell precursors. We observed that this cell lines expressed not only S1P1, but also other S1P receptors. MOLT-4 preferentially expressed S1P1, S1P3 and S1P5. Jurkat mainly expressed S1P1 and S1P3 and CEM expressed all S1P receptors, except for S1P2. We also verified that high S1P concentrations induced CEM fugetaxis and this process is dependent on S1P1. In contrast, low S1P concentrations induced not only chemotaxis but also chemokinesis. Furthermore, S1P3, the only receptor expressed commonly by these cells lines, was not involved in chemotactic responses. Moreover, S1P activated AKT and ERK signaling pathways, but it was not able to activate Rac1, and activation of these signaling pathways seems to be S1P1-dependent. However, low and high S1P concentrations activated these signaling pathways in different ways. High S1P concentrations activated AKT and ERK later than low S1P concentrations and resulted in decreased Rac1 activity. Together, our results suggest that S1P1 regulates differentially T-ALL blast migration depending on S1P concentrations on the medium. Accordingly, immune intervention upon this ligand/receptor interaction may be envisioned as a potential therapeutic strategy for preventing the spread of blasts, which can result from chemotaxis or fugetaxis process.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – O timo.....	1
1.1.1 – Maturação intratímica de células T	4
1.1.2 – Migração intratímica	8
1.1.2.1 – Moléculas de matriz extracelular	8
1.1.2.2 – Quimiocinas e receptores de quimiocinas.....	11
1.1.2.3 – A esfingosina-1-fosfato (S1P) e seus receptores.....	15
1.1.2.3.1 – S1P1 e o seu papel na migração de células T	27
1.2 – A leucemia/linfoma linfoblástico de células T (LLL-T)	30
1.2.1 – Alterações genéticas	32
1.2.2 – Características imunofenotípicas.....	34
1.2.3 – Manifestações clínicas e tratamento	34
1.2.4 – Migração de blastos de LLL-T	36
2. RACIONAL – POTENCIAL PAPEL DA S1P NA MIGRAÇÃO DOS BLASTOS DE LLL-T	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 – Objetivo geral	40
3.2 – Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 – Linhagens celulares:.....	41
4.2 – RT-PCR quantitativo:.....	43
4.3 – Ensaio de migração em câmaras Transwell™:	44
4.4 – Ensaio de migração horizontal em μ -slides:	46
4.5 – Estimulação das células:	47
4.6 – Western -Blot:.....	47
4.7 – Ensaio de ativação de Rac1:	48
4.8 – Citometria de Fluxo:	49
4.9 – Eletroporação celular:.....	51
4.10 – Análises estatísticas:.....	52
5. RESULTADOS	53
6. DISCUSSÃO	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9. ANEXOS:.....	104
9.1 – Anexo 1:	104
9.2 – Anexo 2:	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Localização do timo na cavidade torácica do ser humano.....	1
Figura 1.2: Morfologia do timo.....	2
Figura 1.3: Representação esquemática do microambiente tímico.....	4
Figura 1.4: Modelo de diferenciação intratímica de células T humanas.....	7
Figura 1.5: Papel das quimiocinas na migração intratímica de linfócitos humanos...	13
Figura 1.6: Representação esquemática da via de síntese da esfingosina-1-fosfato.....	16
Figura 1.7: Vias de sinalização ativadas pelos diferentes receptores de S1P.....	21
Figura 1.8: Esquema ilustrativo do papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1) na saída de timócitos maduros do timo.....	28
Figura 4.1: Ilustração esquemática das câmaras de migração celular em câmaras Transwell™	45
Figura 4.2: Ilustração esquemática da μ -slide de migração horizontal.....	47
Figura 5.1: Expressão gênica dos receptores de S1P em blastos humanos de LLA-T.....	54
Figura 5.2: Expressão gênica do receptor S1P1 e da migração celular induzida por S1P estão diretamente correlacionados nos blastos de LLA-T.....	55
Figura 5.3: Resposta migratória quimiotática das linhagens de LLA-T frente a diferentes concentrações de S1P.....	56
Figura 5.4: Resposta migratória quimiotática da célula CEM frente a elevadas concentrações de S1P.....	57
Figura 5.5: Altas concentrações de S1P induzem a fugotaxia das células CEM através da ativação do S1P1 em ensaios de migração em câmaras Transwell™....	58
Figura 5.6: Altas concentrações de S1P parecem induzir a fugotaxia das células CEM em μ -slides de migração horizontal.....	59
Figura 5.7: Resposta migratória induzida por S1P em ensaios do tipo <i>checkerboard</i>	60
Figura 5.8: S1P3 não parece estar envolvido na migração quimiotática induzida por S1P nas células CEM.....	62
Figura 5.9: Hipótese das respostas migratórias dos progenitores T neoplásicos induzidas por S1P.....	63

Figura 5.10: Viabilidade das linhagens CEM e SU-DHL-1, pré-tratadas ou não com W146 e/ou BML-241, que não migraram quando estimuladas com diferentes concentrações de S1P.....	64
Figura 5.11: S1P modula a atividade de AKT, ERK e Rac1.....	66
Figura 5.12 – Fenótipo da linhagem celular EL-4.....	67
Figura 5.13 – Expressão do S1P1 na linhagem celular EL-4.....	68
Figura 5.14: S1P induz a migração celular da linhagem celular EL-4.....	69
Figura 5.15: Eletroporação da linhagem celular EL-4 com vetor codificando GFP...70	
Figura 7.1: Hipótese de estudo.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Descrição da nomenclatura atualizada dos genes e dos receptores de esfingosina-1-fosfato, dos tipos de proteína G com as quais os diferentes receptores podem interagir, a expressão dos mesmos, e as suas principais funções quando estimulados por seu ligante.....	26
Tabela 1.2: Classificação dos blastos de LLL-T de acordo com os estágios de maturação de precursores T normais.....	34
Tabela 4.1: Características das linhagens celulares humanas utilizadas neste estudo.....	42
Tabela 4.2: Sequências de primers usados na análise da expressão dos receptores de S1P.....	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - cassete ligador de ATP (*ATP-binding cassette*)
- ABL1 - abelson 1 (*abelson 1*)
- AIRE – regulador de autoimunidade (*autoimmune regulator*)
- AKT – proteína quinase B (*protein kinase B*)
- APC – alofococianina (*Allophycocyanin*)
- ARF – locus ARF do cromossomo 9; gene *ARF*
- BHLHB1 - *basic helix-loop-helix*
- BML-241 – inibidor específico do S1P3
- BSA – albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
- CALM - leucemia linfóide-mielóide relacionada à montagem de clatrina (*clathrin assembly lymphoid-myeloid leukaemia*)
- CD – grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)
- cCD3 – CD3 citoplasmático
- sCD3 – CD3 de superfície
- CD4ISP – tímócito imaturo CD4 simples-positivo (*CD4 immature single-positive thymocyte*)
- CCL – quimiocina do tipo C-C (*C-C motif chemokine*)
- CCR – receptor de quimiocina do tipo C-C (*C-C chemokine receptor*)
- CERT – proteína transportadora e ceramida
- CHO – célula de ovário de hamster chinês (*Chinese hamster ovary cells*)
- 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*)
- cDNA – DNA complementar
- 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
- EAE – encefalomielite autoimune experimental (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)
- ECL – *enhanced chemiluminescence*
- ECM – matriz extracelular (*extracellular matrix*)
- EDP – tímócitos duplo-positivo iniciais (*early double-positive thymocyte*)

EDG – gene de diferenciação endotelial (*endothelial differentiation gene*)

EPM – erro padrão da média

ERK – proteína quinase regulada por sinal extracelular (extracelular signal regulated kinases)

FACS – citometria de fluxo (*Fluorescence activated cell sorter*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FITC – isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein -5-isothiocyanate*)

FLT3 – tirosina-quinase 3, relacionada ao FMS (*FMS-related tyrosine kinase 3*)

GFP – proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

HDAC – histona diacetilase (*histone deacetylase*)

HDL - lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein*)

HOX11 – homeobox 11 (*homeobox 11*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*international agency in cancer research*)

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

kDA – kilodaltons

KLF – fatores de transcrição do tipo Kruppel (*Kruppel-like factor*)

LLA – leucemia linfoblástica aguda

LLA-B – Leucemia linfoblástica aguda de células B

LLA-T – Leucemia linfoblástica aguda de células T

LL-T – linfoma linfoblástico de células T

LLL-T – leucemia/linfoma linfoblástico de células T

LMO – somente LIM (*LIM-only*)

LYL1 – sequência 1 derivada de leucemia linfoblástica (*lymphoblastic leukaemia-derived sequence 1*)

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinases*)

MHC – complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MK571 – inibidor do transportador ABCC1

MLL – linhagem de leucemia mista (*mixed-lineage leukaemia*)

NK – células matadoras naturais (*natural killer*)

NKT – células matadoras naturais T (*natural killer T*)

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*)

NRAS – gene NRAS;

NUP98 – gene NUP98; proteína do complexo do poro nuclear 98 (*Nuclear pore complex protein 98*)

OD – densidade óptica (*optical density*)
Palmitoil-CoA – palmitoil coenzima A
PBS – tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
PE – ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
PerCP – proteína piridina de clorofila (*Piridin-chlorophyll-a-protein*)
PI – iodeto de propídio (*Propidium iodide*)
PI3K – proteína quinase fosfatidil-inositol 3 (*phosphatidylinositol 3-kinase*)
PKA – proteína quinase A (*protein kinase A*)
PKC – proteína quinase C (*protein kinase C*)
PLC – fosfolipase C (*Phospholipase C*)
Pré-T α – cadeia invariante α do pré-receptor de células T (pre T-cell receptor alpha chain)
RE – retículo endoplasmático
REDV – motivo arginina-ácido glutâmico-ácido aspártico-valina (*arginine-glutamic acid-aspartic acid-valine motif*)
RGD – motivo de arginina-glicina-ácido aspártico (*arginine-glycine-aspartic acid motif*)
mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)
miRNA – micro-RNA
siRNA – pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*)
ROME – inibidor SPHK2
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (*real time quantitative polymerase chain reaction*)
SBF – soro bovino fetal
SIL – locus ininterrupto SCL (*SCL-interrupting locus*)
SKi – inibidor SPHK1 e 2
SP – timócitos simples-positivos (*simple-positive thymocyte*), para as moléculas CD4 e CD8
SPHK1-2 – esfingosina quinase 1 ou 2
Spns2 – homólogo 2 do spinster (*spinster homolog 2*)
S1P – esfingosina-1-fosfato (*sphingosine-1-phosphate*)
S1P1-5 – receptor 1-5 de esfingosina-1-fosfato (*sphingosine-1-phosphate receptor 1-5*)
TBST – tampão tris-salina com tween 20 (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*)
TCR – receptor de célula T (*T cell receptor*)

TEC – célula epitelial tímica (*thymic epithelial Ccell*)
cTEC – célula epitelial tímica cortical (*cortical thymic epithelial cell*)
mTEC – célula epitelial tímica medular (*medullar thymic epithelial cell*)
TNC – complexo *nurse* tímico (*nurse thymic complex*)
TNF – fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)
TRAF2 – fator 2 associado ao receptor de TNF (*TNF receptor-associated factor 2*)
VCAM-1 – molécula de adesão vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)
VDJ – variabilidade, diversidade e junção
W146 – inibidor específico do S1P1

1. INTRODUÇÃO

A leucemia/linfoma linfoblástico de células T (LLL-T) é caracterizada pela proliferação maligna de células originadas a partir de determinados precursores de células T, que adquirem diversas anormalidades genéticas. O estudo de moléculas envolvidas na migração destas células é de extrema importância para o entendimento da disseminação dos linfoblastos e a consequente infiltração dos órgãos. Uma particularidade central dos linfoblastos de LLL-T se refere à apresentação de diversas características fenotípicas de precursores de células T normais, como discutiremos a seguir.

1.1 – O timo

O timo é o órgão linfoide primário onde ocorre a maturação das células T. O órgão se encontra localizado no tórax superior, mais especificamente no tórax anterossuperior, atrás do esterno e na altura dos grandes vasos, logo acima do coração (Murphy, 2014), como pode ser observado na figura abaixo (Fig. 1.1).

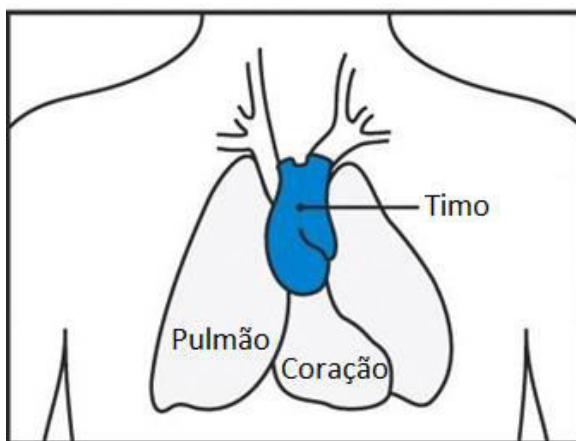


Figura 1.1: Localização do timo na cavidade torácica do ser humano. (adaptado de Murphy, 2014).

O timo é um órgão bilobado e envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que origina septos fibrosos que dividem os lobos em diversos lóbulos contínuos (Junqueira e Carneiro, 2004). Cada lóbulo tímico é formado por duas regiões que são subdivididas pela junção córtico-medular. A região mais periférica

de cada lóbulo é denominada de córtex, local em que se observam predominantemente células T (timócitos) imaturas. Já a região mais central é denominada de medula, onde se observa uma quantidade bastante inferior de timócitos, quando comparado à zona cortical, e que já alcançaram um grau mais diferenciado no processo de maturação (Abbas et al., 2008) (Fig. 1.2).

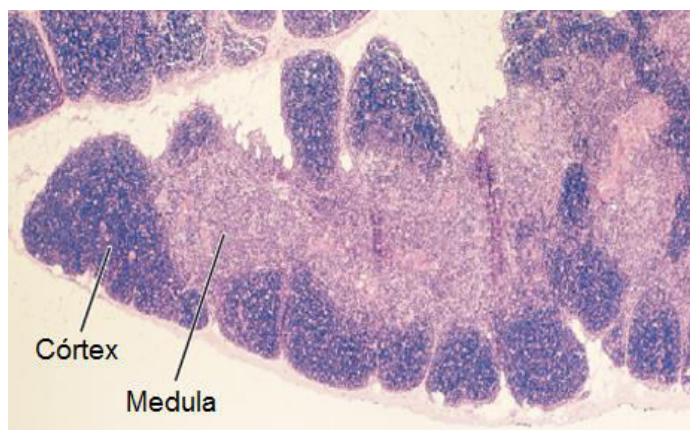


Figura 1.2: Morfologia do timo. Microscopia óptica de corte histológico do timo corado com hematoxilina e eosina. A imagem evidencia as duas regiões dos lóbulos tímicos, o córtex (região mais escura) e a medula (região mais clara) (adaptado de Abbas et al., 2008).

Os timócitos em desenvolvimento se encontram amparados por uma rede tridimensional, denominada de microambiente tímico, presente tanto na região cortical quanto na região medular. O microambiente tímico é composto por células não linfoides, moléculas de matriz extracelular (ECM) e moléculas solúveis, como citocinas, quimiocinas, esfingolipídios e hormônios (Savino et al., 2016), e apresenta a capacidade única de induzir a geração células T funcionais e com especificidades diversas (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007).

Os principais componentes celulares observados no microambiente tímico são as células epiteliais, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células B (Passos et al., 2015). As células mais abundantes no microambiente tímico são as células epiteliais tímicas (TECs), as quais podem ser subdivididas em corticais (cTECs) e medulares (mTECs), de acordo com a sua localização e função. As cTECs são observadas na região cortical do timo e estão funcionalmente envolvidas na indução de comprometimento dos progenitores linfoides, incluindo as fases iniciais do processo de diferenciação de células T e o processo de seleção positiva. Já as mTECs são observadas na região medular e suportam, juntamente com as células dendríticas, o processo de seleção negativa, que ocorre nos estágios finais

do desenvolvimento de células T (Ciofani e Zúñiga-Pflücker, 2007). Na região cortical do timo, é possível observar ainda um tipo particular de célula epitelial denominada célula *nurse* tímica (TNC), uma estrutura linfoepitelial formada por uma TEC que é capaz de abrigar, em camundongos, de 20 a 200 timócitos. Acredita-se que as TNCs criem um ambiente propício para a diferenciação e proliferação de timócitos (Guyden e Pezzano, 2003).

Além das células epiteliais, observa-se no microambiente tímico a presença de macrófagos e células dendríticas, os quais podem ser observadas por todo o órgão. Os macrófagos estão preferencialmente localizados na região cortical e, aparentemente, a função destas células é fagocitar células apoptóticas (Savino et al., 2004). Já as células dendríticas se concentram na junção cortico-medular e na medula, e são consideradas os principais mediadores do processo de seleção negativa que ocorre durante a diferenciação de células T. (Savino et al., 2000; Passos et al., 2015). Assim como as células dendríticas, as células B se encontram localizadas na medula e parecem apresentar também um papel no processo de seleção negativa (Passos et al., 2015). Os fibroblastos, encontrados em todas as regiões do timo, são capazes de produzir diferentes componentes da ECM como fibronectina, laminina, colágeno do tipo I e colágeno do tipo IV (Savino et al., 2000). Na figura 1.3A observamos uma representação esquemática dos componentes celulares do microambiente tímico e a sua localização no órgão.

Além dos fibroblastos, os demais componentes celulares acima descritos são também responsáveis pela produção das moléculas de ECM que formam uma rede de sustentação no microambiente tímico. Estudos mostraram que estes componentes de ECM apresentam distribuição heterogênea nos lóbulos tímicos, formando uma rede tridimensional mais densa na região medular. Receptores do tipo integrinas para componentes de ECM podem ser observados em diversas células do microambiente tímico. A presença destes receptores confirma a ideia de que os componentes de ECM ajudam a manter a rede celular do microambiente tímico compartimentalizada (Savino et al., 2004). Além dos componentes de ECM, as células do microambiente tímico são ainda capazes de produzir diferentes citocinas que também apresentam uma distribuição heterogênea e atuam no processo de diferenciação dos timócitos (Savino et al., 2002).

Desta forma, a arquitetura tímica possibilita que timócitos, em diferentes fases do processo de diferenciação intratímica, interajam com diferentes nichos compostos por componentes distintos do microambiente tímico, guiando assim a

maturação dos timócitos. Assim, a comunicação entre os timócitos e os componentes do microambiente tímico, através de interações receptor-ligante mediadas por interações célula-célula, célula-ECM, citocinas e possíveis neuropeptídeos, é essencial para a maturação de células T (Savino et al., 2004). Na figura abaixo (Fig. 1.3B) observamos a representação esquemática das diferentes interações entre timócitos e os componentes do microambiente tímico.

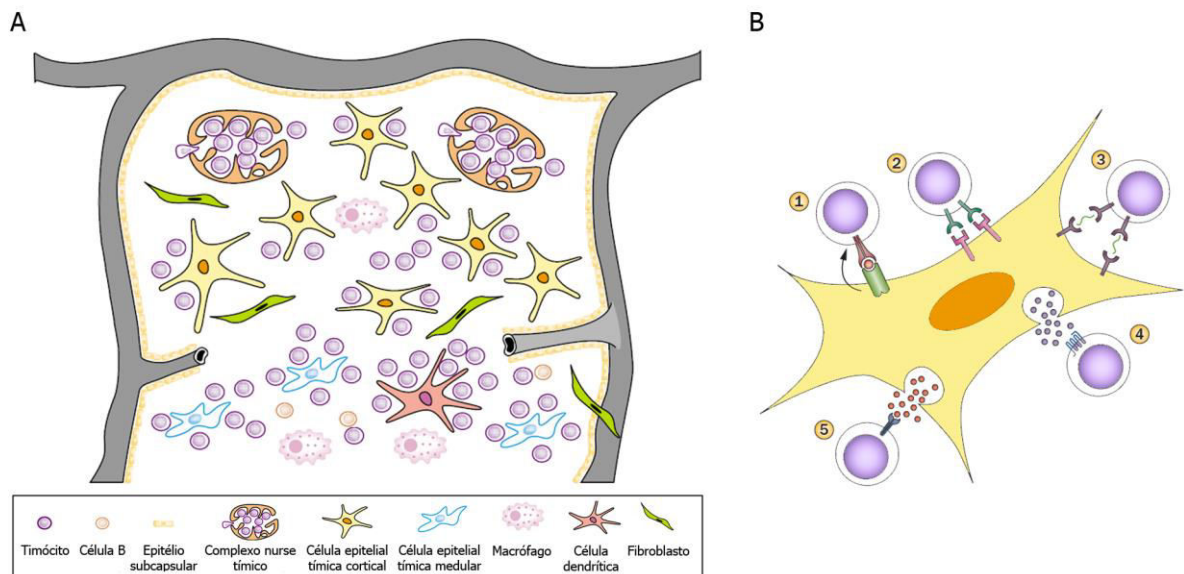


Figura 1.3: Representação esquemática do microambiente tímico. (A) Representação esquemática dos componentes celulares do microambiente tímico e suas respectivas localizações. (B) Possíveis interações entre timócitos e os componentes do microambiente tímico. 1- interação célula-célula via TCR e MHC/peptídeos endógenos; 2- interação célula-célula direta, como notch1 e a proteína delta-1; 3- interação célula-célula mediada por ECM; 4- interação via quimiocinas e/ou fatores solúveis que ativam proteína G, e 5- interações via citocinas ou hormônios. Abreviações: TCR = receptor de célula T; MHC = complexo principal de histocompatibilidade; ECM = matriz extracelular (adaptado de Savino et al., 2002; Savino et al, 2016).

1.1.1 – Maturação intratímica de células T

Todas as células sanguíneas são geradas a partir de células-tronco hematopoiéticas, as quais amadurecem e geram os progenitores linfoides comuns, capazes de dar origem a células T e B (Abbas et al., 2008). O processo de maturação intratímica de células T humanas se inicia com a entrada de precursores linfoides CD34⁺, provenientes da medula óssea, na junção córtico-medular (Legrand et al., 2007). A proteína CD34 é expressa em células-tronco hematopoiéticas e continua a ser expressa em células precursoras comprometidas com linhagens

específicas, sendo que a intensidade da sua expressão diminui conforme as células precursoras avançam no processo de maturação (Spits, 2002). Acredita-se que a escolha do caminho de diferenciação entre a linhagem de células B e T seja dependente do fator notch1, um receptor transmembranar envolvido na regulação do destino de diversas linhagens celulares. Aparentemente a ligação entre notch1 e seu ligante, a proteína delta-1, induz a diferenciação de células CD34⁺ em precursores de células T e células *natural killer* (NK), inibindo o desenvolvimento de células B (Jaleco et al., 2001). Entretanto, outros ligantes da família notch, como delta-4 e jagged2, parecem estar também envolvidos neste comprometimento (Van de Walle et al., 2011). Ao entrar no timo e se comprometer com a linhagem T/NK, estes precursores se tornam capazes de gerar não só células T, mas também células NK e células dendríticas. Assim, o comprometimento das células CD34⁺ que entram no timo com a geração de apenas células T ocorre somente após a recombinação somática dos segmentos variabilidade (V), diversidade (D) e junção (J) dos *loci* do receptor de células T (TCR) (Spits, 2002).

O TCR é um heterodímero e a recombinação dos segmentos VDJ presentes nas cadeias α , β , γ e δ pode dar origem a dois tipos de receptor de células T, o TCR $\alpha\beta$ e o TCR $\gamma\delta$. O mecanismo de recombinação VDJ permite a geração de um grande número de TCR distintos, formando um diverso repertório de células T. Até 10²⁰ recombinações podem ocorrer durante a diferenciação de células T, o que está associado à origem de cerca de 10¹² clonotipos de células T em humanos (Savino et al., 2016). A geração de células T com TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ parece ser dependente de interações entre os diferentes receptores Notch e seus ligantes e da força destas interações (Van de Walle et al., 2011, Van de Walle et al., 2013). Células T com TCR $\alpha\beta$ constituem a grande maioria da população de células presentes nos órgãos linfoides e reconhecem peptídeos derivados de antígenos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ou II, presentes em células apresentadoras de antígenos. Já as células T com TCR $\gamma\delta$ não são restritas ao MHC e apresentam um papel importante na proteção de tecidos associados a mucosas (Dobrovinskaya et al., 2015). Como o TCR $\alpha\beta$ é muito mais frequente dentre a população de células T, descreveremos aqui o processo de diferenciação das células T $\alpha\beta$.

Diferentes estágios de maturação de células T podem ser discriminados no timo através da expressão de moléculas na superfície celular e do *status* de rearranjo do TCR (Fig. 1.4). Após comprometimento com a linhagem T, precursores

CD34⁺ passam a expressar a proteína CD1a, entrando no estágio pré-T1, onde se inicia o rearranjo dos genes que codificam cadeias β do TCR (Galy et al., 1993; Taghon et al., 2012). Até este estágio, os timócitos em diferenciação não expressam os correceptores CD4 e CD8, sendo assim reconhecidos como as células duplo-negativas clássicas. No estágio pré-T2, os timócitos CD4 simples-positivos imaturos (CD4ISP) expressam o correceptor CD4, mas não CD8 (Galy et al., 1993; Kraft et al., 1993; Taghon et al., 2012). Ao final do rearranjo da cadeia β do TCR, ocorre o processo de seleção- β . Durante este processo, timócitos que sofreram rearranjo produtivo para a cadeia β são selecionadas para iniciar futuramente o rearranjo da cadeia α . Este processo ocorre através da expressão do gene da cadeia β rearranjada na superfície celular juntamente com uma cadeia invariante pré-T α e o complexo CD3. Esta expressão conjunta promove sinais intracelulares que induzem proliferação e sobrevivência celular. Os timócitos que não realizarem um rearranjo funcional da cadeia β não receberão sinais de sobrevivência e morrerão (Spits, 2002). Estudos de expressão gênica mostraram que o pico de expressão da cadeia pré-T α ocorre no estágio pré-T1 e pré-T2, sugerindo que este processo ocorra no decorrer destes estágios, já que após o estágio pré-T2 ocorre um declínio na expressão da cadeia pré-T α (Dik et al., 2005).

O estágio CD4ISP é seguido pelo estágio EDP, duplo-positivo inicial, no qual os timócitos passam a expressar não apenas CD4, mas também a cadeia α do correceptor CD8, possuindo o fenótipo CD4⁺CD8 α ⁺. Posteriormente, estes precursores passam a expressar a cadeia β do correceptor CD8, sendo então chamadas de duplo-positivas (DP) e apresentando o fenótipo CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ (Galy et al., 1993). Neste estágio, ocorre o início do rearranjo da cadeia α do TCR, e, ao final do rearranjo, os timócitos passam pelo processo de seleção positiva (Spits, 2002). Timócitos DP que possuem TCR capaz de interagir com afinidade e/ou afeidez fraca ou moderada pelo complexo peptídeo próprio/MHC (expresso por células epiteliais tímicas) recebem sinais de sobrevivência e continuam no processo de diferenciação no timo. Já os timócitos DP que não são positivamente selecionados morrem por apoptose; este fenômeno é chamado de morte por negligência. Em seguida, os timócitos que apresentam interação de forte afinidade entre o TCR e o complexo peptídeo-próprio/MHC (expresso em células dendríticas, macrófagos ou células epiteliais tímicas) morrem por apoptose em um processo conhecido como seleção negativa (Spits, 2002; Klein et al., 2014; Abbas et al., 2015). Este processo evita o desenvolvimento de células reativas a antígenos próprios, constituindo um processo

central de tolerância imunológica (Savino et al., 2016). Existem evidências de que o processo de seleção negativa para antígenos próprios ubíquos tenha início na região cortical, entretanto a medula tímica é importante para a deleção de timócitos capazes de reconhecer antígenos próprios adicionais. O microambiente medular contém, como citado anteriormente, grande quantidades de células dendríticas. Essas células, juntamente com as mTEC, que expressam antígenos restritos a tecidos sob controle do fator de transcrição AIRE (regulador de autoimunidade), são fundamentais no processo de seleção negativa (Halkias et al., 2014).

Após os processos de seleção, os timócitos DP se diferenciam em células CD4 ou CD8 simples-positivas (SP) (Spits, 2002). Os sinais envolvidos neste processo são dependentes de uma maquinaria transcricional e da interação do TCR com MHC de classe I ou II. Timócitos DP que, durante os processos de seleção, interagem com moléculas de MHC de classe I se tornam células T CD8 SP, enquanto os que interagem com moléculas de MHC de classe II se tornam células T CD4 SP (Abbas et al., 2015; Savino et al., 2015). Posteriormente, timócitos SP terminam o seu processo de maturação na medula, no qual perdem a expressão de CD1 e CD69 e passam a expressar CD45RA (Halkias et al., 2014) e CD62L, emigrando então do timo para a circulação e órgãos linfoides periféricos.

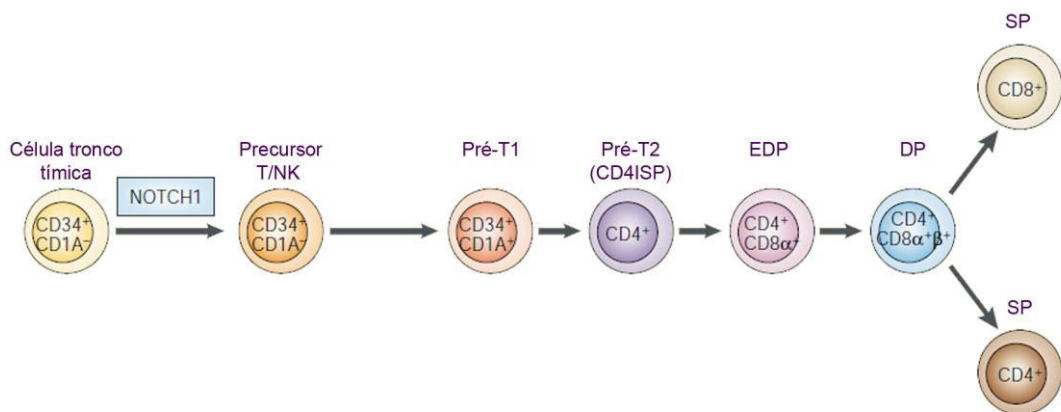


Figura 1.4: Modelo de diferenciação intratímica de células T humanas. Precursores linfoides $CD34^+CD1A^-$ entram no timo através de vasos sanguíneos e recebem estímulos através do receptor NOCHT1, se comprometendo com a linhagem T/NK. Após comprometimento com a linhagem T/NK, precursores passam a expressar CD1A e iniciam o rearranjo das cadeias β do TCR (Pré-T1). No estágio pré-T2, as células passam a expressar CD4 e iniciam a seleção β . No estágio seguinte, o EDP, as células expressam tanto CD4, quanto a cadeia α do correceptor CD8, possuindo fenótipo $CD4^+CD8\alpha^+$. No estágio DP os precursores EDP passam a expressar a cadeia β do correceptor CD8, terminam a seleção β e iniciam o rearranjo da cadeia α do TCR. Estas células passam ainda pelos processos de seleção positiva e negativa. Após a seleção positiva, perdem a expressão de CD4 ou

CD8, se tornando células SP. Abreviações: TCR = receptor de células T; CD4ISP = simples-positiva imatura; EDP = duplo-positiva imatura; SP = simples-positiva. (Adaptado de Spits, et al, 2002).

Outras moléculas expressas na superfície de timócitos humanos são também utilizadas na distinção dos estágios de diferenciação, como, por exemplo, CD2, CD5 e CD7. As moléculas CD2 e CD5 são expressas em todos os estágios de diferenciação a partir dos precursores T/NK, enquanto a molécula CD7 só não é expressa nos precursores mieloides (Spits, 2002).

1.1.2 – Migração intratímica

Durante o processo de diferenciação intratímica de células T, timócitos em diferentes estágios de maturação migram através dos diferentes compartimentos tímicos, interagindo com os microambientes cortical e medular. Esta migração é regulada principalmente por componentes da ECM, moléculas de adesão e moléculas solúveis, como as quimiocinas. Estas moléculas são cruciais para o processo de diferenciação, uma vez que permitem que timócitos entrem em contato com diferentes células do microambiente tímico em momentos distintos do processo de diferenciação. Além disso, alterações em moléculas envolvidas no processo de migração celular podem gerar mudanças no padrão de diferenciação de células T. Estes eventos de migração celular incluem tanto a migração que ocorre no interior do timo quanto na entrada e na saída do órgão (Savino et al., 2002).

1.1.2.1 – Moléculas de matriz extracelular

A adesão das células migrantes ao substrato é um evento essencial no processo de migração celular (Savino et al., 2002) e é mediada por receptores de adesão celular, onde se destacam as integrinas. As integrinas são receptores heterodiméricos, compostos por uma subunidade α e uma subunidade β , capazes de mediar a adesão de células à componentes da ECM, mas que também apresentam um papel fundamental nas interações celulares (Barczyk et al., 2010).

Como citado anteriormente, os principais componentes de ECM do timo – colágeno, laminina e fibronectina – se encontram mais concentrados na região medular dos lóbulos tímicos. Essas moléculas formam fibrilas no parênquima tímico,

sendo mais finas na região cortical e mais espessas na região medular (Savino et al., 2004).

Timócitos expressam diferentes integrinas e são capazes de migrar frente aos seus ligantes (Savino et al., 2003). A grande maioria dos timócitos humanos expressa as integrinas $\alpha 4\beta 1$ (98,3%) e $\alpha 5\beta 1$ (63,2%) (Mojcik et al., 1995). A integrina $\alpha 4\beta 1$ é capaz de promover a adesão destas células a moléculas de VCAM-1 e a fibronectina (Salomon et al., 1994; Savino et al., 2004). A integrina $\alpha 5\beta 1$, entretanto, promove a adesão destas células a moléculas de fibronectina apenas (Savino et al., 2004). A molécula VCAM-1 é produzida por células epiteliais tímicas presentes na região cortical e na junção córtico-medular do timo e por células dendríticas na medula (Salomon et al., 1997). Duas isoformas de fibronectina podem ser observadas no timo humano, uma reconhecida pela integrina $\alpha 4\beta 1$ e outra pela $\alpha 5\beta 1$. A isoforma da fibronectina reconhecida pela integrina $\alpha 5\beta 1$, através de um motivo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), se encontra distribuída no parênquima tímico. Enquanto a isoforma derivada do *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA) da fibronectina, reconhecida pela integrina $\alpha 4\beta 1$, através do motivo arginina-ácido glutâmico-ácido aspártico-valina (REDV), se encontra aparentemente restrita na região medular do timo (Savino et al., 2004). Duas populações de timócitos $\alpha 4\beta 1^+$ e $\alpha 5\beta 1^+$ podem ser observadas: uma que expressa baixas densidades e outra que expressa altas densidades das respectivas integrinas. Dentre a população $\alpha 4\beta 1^+$, a $\alpha 4\beta 1^{\text{low}}$ é constituída basicamente por timócitos DP e por timócitos CD4^{high} e CD8 SP , enquanto a $\alpha 4\beta 1^{\text{high}}$ é composta por timócitos CD8 e CD4^{low} SP. Já dentre a população $\alpha 5\beta 1^+$, a $\alpha 5\beta 1^{\text{low}}$ é predominantemente DP, com poucos timócitos DN e CD4 SP , enquanto a população $\alpha 5\beta 1^{\text{high}}$ é formada por timócitos DN e por timócitos CD4 e CD8 SP (Mojcik et al., 1995). Timócitos $\alpha 4\beta 1^+$ capazes de aderir à fibronectina são imaturos, apresentando fenótipo $\text{CD4}^{\text{high}}\text{CD8}^{\text{high}}\text{CD3}^{\text{low}}$, enquanto os não aderentes apresentam um fenótipo mais maduro CD4^{int} e/ou CD8^{int} e CD3^{high} (Salomon et al., 1994). Além disso, estes timócitos CD4^{int} e/ou CD8^{int} e CD3^{high} apresentam maior capacidade migratória do que adesiva frente à fibronectina, que é mediada por ambos os receptores $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (Crisa et al., 1996).

Timócitos humanos imaturos aderem e migram frente à fibronectina através de interações mediadas pela integrina $\alpha 4\beta 1$, enquanto timócitos maduros aparentemente usam ambas as integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (Crisa et al., 1996). Além disso, a adesão de timócitos imaturos, provenientes de camundongos irradiados, a

monocamadas de células epiteliais tímicas é fortemente bloqueada por anticorpos monoclonais anti- $\alpha 4$ ou por peptídeos bloqueadores da integrina $\alpha 4\beta 1$ (Dalmau et al., 1999). A adesão de timócitos a cultura de células epiteliais tímicas se encontra aumentada na presença de componentes de ECM como a fibronectina. O pré-tratamento destas células epiteliais tímicas com anticorpos anti- $\alpha 5\beta 1$ apresentam um efeito oposto, ou seja, os timócitos aderem menos a cultura de células epiteliais tímicas (Savino et al., 2002).

Timócitos humanos expressam também as integrinas $\alpha 3\beta 1$ (18%) e $\alpha 6\beta 1$ (19%), responsáveis por promover a adesão celular a moléculas de laminina (Mojcik et al., 1995). Diferentes isoformas de laminina são geradas por heterotrímeros $\alpha\beta\gamma$ a partir da transcrição de diferentes genes para cada cadeia polipeptídica. Atualmente cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ foram quimicamente caracterizadas e 18 isoformas reportadas, das quais as integrinas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ são capaz de reconhecer 10 dessas isoformas. A nomenclatura atual usa numerais arábicos baseados nos números das três cadeias. Por exemplo, a LM-111 é formada pelas cadeias $\alpha,1 \beta 1$ e $\gamma 1$ (Savino et al., 2015). Estudos iniciais de imunolocalização mostram uma expressão heterogênea de laminina no timo humano, no qual a medula apresenta uma rede mais densa do que o córtex (Berrih et al., 1985). Análises de expressão gênica indicam que genes que codificam diversas cadeias de laminina são constitutivamente expressos no timo humano (Ocampo et al., 2008), no qual foi observada por RT-PCR, a presença da LM-111 (laminina-1) nos lóbulos e nos septos tímicos e da LM-211 (laminina-2), restrita à região cortical (Savino et al., 2002). A presença de da LM-332 (laminina-5) foi observada na região medular, onde é produzida por mTECs, na lâmina basal do córtex subcapsular e em células epiteliais ao redor de vasos sanguíneos (Vivinus-Nebot et al., 1999; Kutlesa et al., 2002). Ainda no timo humano, foram observadas a presença das LM-411 e LM-421 restritas as células endoteliais e das LM-511 e LM-521 restritas ao epitélio subcapsular e a vasos sanguíneos (Kutlesa et al., 2002).

Camundongos *dy/dy*, que não produzem LM-211, apresentam um desenvolvimento anormal de timócitos, devido a uma atrofia tímica precoce, com uma diminuição relativa no número de timócitos DN e um aumento no número de timócitos DN em apoptose (Magner et al., 2000). Estudos mostraram ainda que, em camundongos, anticorpos monoclonais anti-LM-332 bloqueiam significativamente a expansão de timócitos e a diferenciação de timócitos no estágio DN para o estágio DP. Esses dados sugerem que a progressão do estágio DN para o estágio DP

requer interações mediadas por laminina (Kim et al., 2000). Além disso, timócitos CD8 SP humanos foram a única subpopulação capaz de aderir a LM-332 (Kutlesa et al., 2002), sugerindo que a mesma possa também estar envolvida na diferenciação de subpopulações timócitos mais maduros (Savino et al., 2015).

Dados da literatura mostram ainda que LM-111 é capaz de induzir a migração de timócitos de camundongo e humanos *ex vivo* (Smaniotto et al., 2005; Lepelletier et al., 2007; Ocampo et al., 2008), enquanto a LM-332 é capaz de induzir apenas a migração timócitos SP humanos e anticorpos monoclonais para as cadeias $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ e $\beta 4$ de integrinas foram capazes de inibir esta migração (Vivinus-Nebot et al., 2004). De forma similar a LM-211 foi capaz de induzir, *in vitro*, a migração de timócitos em desenvolvimento de TNC isolados de timos humanos e este efeito foi bloqueado pelo uso de anticorpos monoclonais contra as cadeias $\alpha 6$, $\alpha 3$ e $\beta 4$ das integrinas (Ocampo et al., 2008). Estes dados sugerem o papel dos receptores do tipo integrina no processo de migração de timócitos induzido por laminina.

1.1.2.2 – Quimiocinas e receptores de quimiocinas

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que regulam o tráfego celular através da sua interação com receptores transmembranares acoplados a proteína G (Annunziato et al., 2001). Estas proteínas podem estar expostas na superfície celular ou ligadas a moléculas de ECM, podendo ainda ser secretadas no microambiente. Tradicionalmente, as quimiocinas e seus receptores são divididos em quatro subfamílias (CC, CXC, C e CX3C), identificadas de acordo com o padrão dos resíduos de cisteína presentes nos ligantes (Halkias et al., 2014). Além de regularem o tráfego e recrutamento de leucócitos, as quimiocinas estão também envolvidas em outros processos celulares, como angiogênese, metástase e organogênese dos órgãos linfoides primários e secundários. Alguns estudos sugerem que áreas distintas do timo produzem diferentes tipos de quimiocinas. Desta forma, as quimiocinas seriam também responsáveis por organizar as diferentes populações de timócitos em discretos microambientes (Annunziato et al., 2001).

A quimiocina CXCL12 é expressa de forma ubíqua em diversos tecidos, incluindo o timo. Esta quimiocina se liga especificamente ao receptor CXCR4 (Kim et al., 1998), que é expresso em todas as regiões do timo, principalmente, na região cortical. CXCL12 é ainda um importante fator quimiotático para progenitores CD34⁺

derivados da medula óssea (Aiuti et al., 1999), sendo prevalentemente encontrada na junção córtico-medular. Estes progenitores são os que respondem melhor à migração celular induzida por CXCL12, seguidos de timócitos imaturos, enquanto timócitos DP e SP migram pouco frente a essa quimiocina (Annunziato et al., 2001). Este fato está de acordo com a expressão do receptor CXCR4, que é altamente expresso nas populações de timócitos mais imaturas e apresenta uma queda na sua expressão conforme os timócitos avançam no processo de diferenciação (Aiuti et al., 1999).

A quimiocina CCL25 é produzida por células dendríticas da região medular do timo e interage com o receptor CCR9, o qual, dentre os órgãos linfoides, é expresso somente no timo. Esta quimiocina é capaz de atrair todas as subpopulações de timócitos, possuindo um efeito maior em células DP e CD4 e CD8 SP (Youn et al., 1999). Como parece haver uma diminuição na expressão de CCR9 em timócitos CD4 e CD8 SP que passam a expressar elevadas quantidades de TCR, e que conseqüentemente terminaram seu processo de maturação no timo, acredita-se que CCL25 não esteja envolvida na saída de timócitos do timo (Annunziato et al., 2001). Com base nestes dados, acredita-se que CCL25 induza a migração de células DP do córtex para a medula e contribua para a retenção das células CD4 e CD8 SP na medula. Em camundongos, foi demonstrado que CCL25 é capaz de induzir a migração de progenitores de células T fetais para o timo (Youn et al., 1999), e acredita-se que o mesmo ocorra em humanos. A expressão de CCL25 no parênquima tímico e do seu receptor em progenitores CD34⁺ na oitava semana de gestação coincide com o aparecimento dos progenitores linfóides no timo fetal humano (Halkias et al., 2014). Como timócitos humanos imaturos são responsivos à mesma, pode ser que esta quimiocina, juntamente com CXCL12, seja responsável pelo recrutamento de progenitores linfoides (Youn et al., 1999).

Já a quimiocina CCL22 é produzida por uma população de células epiteliais tímicas medulares e é capaz de interagir com o receptor CCR4. CCL22 é capaz de estimular a migração de células DP e de células CD4 e CD8 SP, sendo as células DP mais responsivas que as SP. Estes dados sugerem que CCL22 estimule a migração de células DP do córtex para a medula do timo (Annunziato et al., 2001), agindo assim juntamente com a CCL25.

As quimiocinas CCL19 e CCL21 são produzidas por uma população de células epiteliais medulares, distintas das produtoras de CCL22, interagem com o receptor CCR7, e são capazes de induzir a migração, principalmente, de células

CD4 e CD8 SP maduras. Estudos mostraram ainda que as células SP que migram frente a CCL19 e CCL21 expressam quantidades elevadas de CD3 (Annunziato, et al, 2001), o que sugere que estejam envolvidas na saída de timócitos maduros do timo para a circulação. Em camundongos, estas quimiocinas estão ainda envolvidas na migração de timócitos imaturos na região cortical, uma vez que camundongos deficientes em CCR7 apresentam um acúmulo de timócitos DN na junção córtico-medular (Misslitz et al., 2004).

Enquanto isso, as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 são capazes de interagir com o receptor CXCR3 e são produzidas por diferentes populações de células epiteliais medulares. CXCL10 foi ainda encontrada em pequena quantidade na região cortical. A expressão do CXCR3 foi evidenciada, principalmente, na região medular, e poucas células expressando este receptor foram observadas na região cortical. CXCL9, CXCL10 e CXCL11 foram capazes de induzir a migração de timócitos CD8 SP, sendo que a CXCL11 foi menos ativa. Estas quimiocinas foram também capazes de induzir a migração de timócitos TCR $\gamma\delta^+$ e de células NK (Romagnani et al., 2001).

Por fim, a quimiocina CCL11, encontrada na região medular do timo humano, também induz a migração de timócitos CD4 e CD8 SP. Como esperado, timócitos CD8 SP são mais responsivos, uma vez que expressam níveis mais elevados do seu receptor CCR3 (Franz-Bacon et al., 1999). Um modelo de migração intratímica das diferentes subpopulações de timócitos humanos pode ser observado abaixo na figura 1.5.

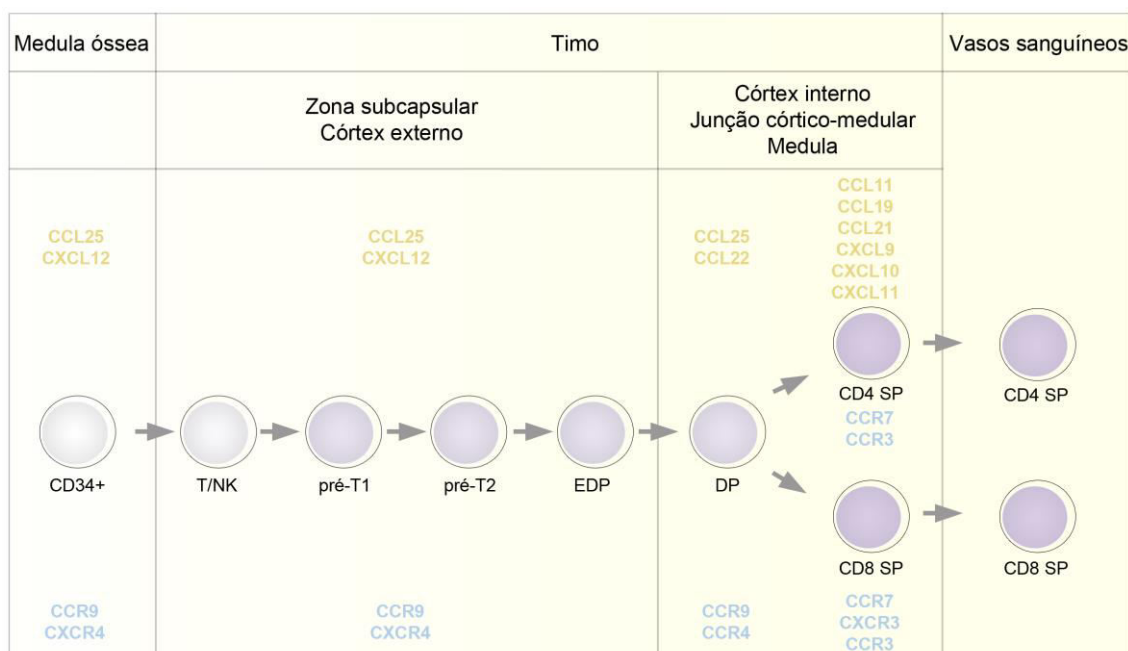


Figura 1.5: Papel das quimiocinas na migração intratímica de linfócitos humanos. Interações entre CCL25-CCR9 e CXCL12-CXCR4 parecem ser responsáveis pela migração de precursores CD34+ para o timo e pela migração dos timócitos pré-T1, pré-T2 e EDP do córtex externo para o córtex interno, onde ocorre a seleção positiva. As interações entre CCL25-CCR9, juntamente com interações com CCL22-CCR4 induzem a migração de timócitos DP para a medula onde são negativamente selecionados. Enquanto as interações entre CCL11-CCR3 induz a migração de timócitos CD4 e CD8 SP; interações CCL19/CCL21-CCR7 induzem a migração de timócitos CD4 ou CD8 SP que sobreviveram aos processos de seleção positiva e negativa para vasos sanguíneos na junção córtico-medular, favorecendo sua migração para os órgãos linfoides secundários; e interações entre CXCL9/CXCL10/CXCL11-CXCR3 induzem ainda a migração de timócitos CD8 SP e TCR $\gamma\delta$ + para a periferia. Abreviações: EDP = duplo-positivo imaturo; DP = duplo-positivo; SP = simples-positivo.

Todas as quimiocinas acima descritas foram também identificadas em camundongos e aparentemente apresentam papel semelhante na migração intratímica nestes animais (Savino, et al, 2002). Tanto em humanos quanto em camundongos, as quimiocinas podem ser apresentadas por componentes da ECM (como fibronectina e laminina) que ajudam no estabelecimento de gradientes de concentração destas proteínas solúveis (Savino, et al, 2002; Savino, et al, 2004). Em ensaios de migração celular *ex vivo*, observou-se que o efeito das quimiocinas em conjunto com moléculas de ECM geralmente é sinérgico, ou seja, maior que a soma de cada estímulo individual (Mendes-da-Cruz et al., 2006; Mendes-da-Cruz et al., 2008; Smaniotto et al., 2010). Por exemplo, apenas CXCL12 já é capaz de induzir a migração de timócitos, mas quando em combinação com laminina ou fibronectina uma resposta migratória sinérgica pode ser observada em diferentes subpopulações de timócitos, mas principalmente nos timócitos DP. O mesmo efeito foi também observado para CCL19 e CCL22, mas neste caso as subpopulações mais responsivas foram as CD4 e CD8 SP (Yanagawa et al., 2001; Savino et al., 2004).

As quimiocinas podem ainda exibir um papel oposto à sua função quimiotática dependendo da concentração utilizada, isto é, ao invés de atrair as células, as quimiocinas podem também as repelir. Neste caso, o fenômeno observado é denominado de fugotaxia e foi observado inicialmente para CXCL12. Enquanto baixas concentrações de CXCL12 induzem a atração de timócitos SP, elevadas concentrações induzem a repulsão destas células. Especula-se que a quimiorrepulsão induzida por CXCL12 possa estar envolvida na saída de timócitos SP do timo (Poznansky et al., 2002; Vianello et al., 2005). O processo de fugotaxia

foi descrito ainda para outros tipos de moléculas. IL-8, por exemplo, também induz ambos os processos migratórios sendo atraente e repulsiva para neutrófilos (Tharp et al., 2006).

Vale ressaltar que diversos outros fatores podem modular a interação de timócitos com o microambiente e a migração intratímica dos precursores de células T. Estes fatores incluem outras citocinas, galectinas, metaloproteinases, glicosilaminoglicanos, semaforinas (Halkias et al., 2014) e lipídios, como a esfingosina-1-fosfato que foi implicada como principal responsável pela saída de timócitos maduros do timo (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004).

1.1.2.3 – A esfingosina-1-fosfato (S1P) e seus receptores

Os esfingolipídios são moléculas de lipídios essenciais da membrana plasmática e se encontram concentrados em microdomínios de membrana ricos em colesterol. Estes lipídios podem ser rapidamente metabolizados, quando estimulados por vários receptores presentes na membrana plasmática, através da ativação de uma cascata enzimática (Rivera et al., 2008). Dentre os esfingolipídios, destaca-se a esfingosina-1-fosfato (S1P), um esfingolipídio bioativo oriundo desta cascata enzimática que regula diversos processos celulares, como migração, diferenciação, sobrevivência, inflamação, angiogênese, homeostase do cálcio e imunidade (Fyrst e Saba, 2010). Dados da literatura mostram ainda que a S1P apresenta um papel importante também no desenvolvimento durante a angiogênese, cardiogênese, neurogênese e no desenvolvimento límbico (Mendelson et al., 2013).

A síntese de esfingolipídios é iniciada no retículo endoplasmático (RE) através da condensação da L-serina e da palmitoil coenzima A (palmitoil-CoA), reação esta que é catalisada pela enzima serina palmitoil-transferase. O produto desta reação, 3'-ceto esfinganina, é reduzido pela 3'-ceto-dihidroesfingosina redutase, formando a molécula dihidroesfingosina. O produto desta última reação é acetilado pela ceramida sintase dando origem a dihidroceramida. Esta molécula é convertida a ceramida por uma dihidroceramida desaturase (Watterson et al., 2003; Takabe et al., 2008; Strub et al., 2010). A produção de ceramidas pode ser estimulada por diversos fatores, como TNF- α , hipóxia e alguns agentes quimioterápicos. Ao final da síntese da ceramida, uma proteína citoplasmática, a proteína transportadora de ceramida (CERT), transporta moléculas de ceramidas do

RE para o complexo de Golgi, onde as mesmas são convertidas a esfingomielina, através da esfingomielina sintase. A degradação da esfingomielina ocorre por ação da enzima esfingomielinase que hidrolisa o substrato a 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 degradação da esfingomielina, culminando com a produção de esfingosina. A esfingosina sofre então a ação da enzima esfingosina quinase (SPHK), a qual existe sob duas isoformas, SPHK1 e SPHK2, gerando a S1P. Essa molécula pode ser convertida de volta a esfingosina pela ação da esfingosina-1-fosfato fosfatase (S1P fosfatase), ou pode ser degradada irreversivelmente pela enzima esfingosina liase em fosfoetanolamina e palmitaldeído (Watterson et al., 2003; Strub et al., 2010). Uma representação esquemática da via de síntese e degradação da S1P pode ser observada na figura 1.6.

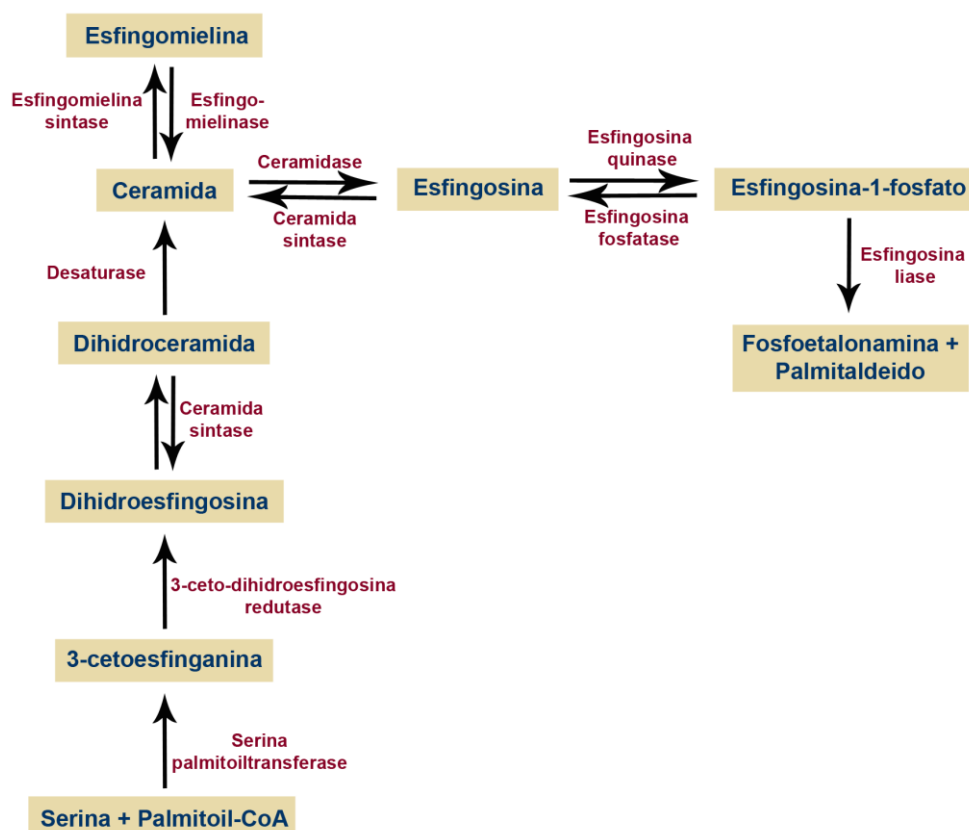


Figura 1.6: Representação esquemática da via de síntese da esfingosina-1-fosfato. No retículo endoplasmático, L-serina e palmitoil-CoA são condensadas, gerando 3-cetoesfinganina, através da enzima serina palmitoiltransferase. 3-cetoesfinganina é reduzida, pela enzima 3-ceto-dihidroesfingosina redutase, a dihidroesfingosina, a qual é convertida, pela ceramida sintase, em dihidroceramida, sendo esta última por sua vez convertida a ceramida, através da ação da

desaturase. No complexo de Golgi, a ceramida pode ser convertida em esfingomielina, pela esfingomielina sintase, ou em esfingosina, através da ceramidase. Esfingosina é fosforilada pela esfingosina quinase, gerando S1P, a qual pode ser desfosforilada pela esfingosina fosfatase ou degradada irreversivelmente em fosfoetanolamina e palmitaldeído pela ação da esfingosina liase. Abreviaturas: S1P = esfingosina-1-fosfato.

Acredita-se que todas as células sejam capazes de gerar S1P como um metabólito intermediário do metabolismo de esfingolipídios (Hannun e Obeid, 2008), sendo este lipídio capaz de agir diretamente em alvos intracelulares (Liu et al., 2012). A concentração intracelular da S1P é determinada pela ativação das enzimas descritas acima no metabolismo dos esfingolipídios (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). A S1P é também capaz de interagir diretamente com cinco receptores membranares acoplados a proteína G (Liu et al., 2012).

A concentração extracelular desta molécula parece ser oriunda de mastócitos, células endoteliais (Brinkmann, 2007; Thuy et al., 2014), macrófagos, neutrófilos (Thuy et al., 2014), pericitos (Zachariah e Cyster, 2010) e, principalmente, de plaquetas ativadas e eritrócitos (Pappu et al., 2007; Thuy et al., 2014). Aparentemente eritrócitos são as principais fontes de S1P extracelular na corrente sanguínea, pois não possuem a enzima esfingosina liase, responsável pela degradação irreversível deste lipídio. Eritrócitos são ainda capazes de importar, estocar e proteger altas concentrações de S1P (Spiegel e Milstien, 2011; Thuy et al., 2014). Vale ressaltar que quando presente nos compartimentos vasculares, a S1P é carregada por lipoproteínas, principalmente pelo HDL (lipoproteínas de alta densidade), e em menor quantidade pela albumina (Murata et al., 2000). Já na linfa, a principal fonte de S1P são as células endoteliais linfáticas (Spiegel e Milstien, 2011).

A S1P gerada no compartimento intracelular não é capaz de atravessar passivamente a membrana plasmática das células de mamíferos e interagir com seus receptores, pois possui um grupamento polar. Embora os mecanismos de exportação da S1P não sejam completamente entendidos, alguns estudos vêm sugerindo que os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) possam estar envolvidos neste processo, assim como o homólogo 2 do spinstar (Spns2) (Kim et al., 2009; Hisano et al., 2012b; Nishi et al., 2014). Os transportadores ABC são também conhecidos como transportadores dependentes de ATP, porque utilizam a

energia da hidrólise do ATP para transportar para dentro ou fora da célula diversos substratos (Liu et al., 2012). Transportadores ABC contêm dois domínios transmembranares, com seis cadeias α -hélices, que formam um canal para o transporte do substrato através das membranas, e dois sítios citosólicos de ligação ao ATP (Kim et al., 2009). Estudos mostraram que a exportação de S1P na linhagem celular RBL-2H3, uma linhagem de mastócitos de rato, é dependente do transportador ABCC1, uma vez que a sua saída é inibida por MK571, um inibidor deste transportador, e pelo tratamento com siRNA específico para este transportador. ABCC1 foi ainda implicado na liberação de S1P pela linhagem celular MCF-7, isolada de câncer de mama, quando estimulada com estradiol, assim como ABCG2, pela linhagem celular ELT3, isolada de leiomioma, quando tratada com 4 β -phorbol-12,13-dibutyrate, e por fibroblastos humanos primários tratados com dexametasona. Além disso, gliburida, inibidor do transportador ABCA1, inibe a liberação de S1P de plaquetas ativadas e eritrócitos. Em astrócitos, a liberação de S1P parece ser dependente de ambos os transportadores acima citados, e a liberação deste lipídio através do transportador ABCA1 parece estar acoplada à formação do HDL (Kim et al., 2009; Nishi et al., 2014). Entretanto, a expressão individual de ABCA1, ABCC1, ABCG2 em células CHO (células de ovário de hamster chinês), que expressam SPHK1, não é capaz de induzir a liberação de S1P por estas células (Nishi et al., 2014). Além disso, camundongos deficientes nos receptores ABCA1 ou ABCC1 não apresentam diferenças nas concentrações plasmáticas de S1P, sugerindo que estes transportadores não sejam necessários para manutenção da S1P plasmática, ou que exista outro mecanismo compensatório de transporte (Kim et al., 2009; Nishi et al., 2014).

Estudos recentes identificaram o homólogo 2 do spinster como 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 *zebrafish* durante estudo de reguladores do desenvolvimento cardíaco (Hisano et al., 2012b). Mutações no gene spns2 induz a geração de *zebrafish* com dois corações (*cardia bifida*), fenótipo similar ao observado em *zebrafish* com mutações no gene s1pr2, sugerindo uma possível interação dos dois genes. Durante o estágio de blástula, quando o embrião recebe uma injeção de S1P próxima dos blastômeros, este fenótipo é revertido. Foi verificado ainda que células CHO que expressam SPHK1 são capazes de sintetizar S1P, mas não de liberar este lipídio e o mesmo acumula dentro da célula. A

introdução de Spns2 de *zebrafish* ou humano nestas células induziu a liberação de S1P (Kawahara et al., 2009). Além disso, camundongos deficientes em Spns2 apresentam uma redução na concentração de S1P no plasma e na linfa, assim como os níveis de S1P associados ao HDL e a albumina. A redução nos níveis de S1P no plasma e na linfa está associada a uma diminuição na secreção de S1P pelas células endoteliais e não pelas células sanguíneas. (Fukuhara et al., 2012; Hisano et al., 2012a; Mendoza et al., 2012).

Muitos métodos foram usados para quantificar a concentração de S1P extracelular e, embora os números exatos variem, a sua concentração no plasma e na linfa alcança, respectivamente, a ordem de micromolar e nanomolar. A determinação da concentração de S1P no fluido intersticial dos órgãos linfoides é bem mais difícil, pois se deve obter volume de amostra suficiente sem romper as células, o que ocasionaria a liberação de S1P intracelular, e sem causar inflamação. Uma forma de quantificar os níveis intersticiais de S1P é acessar a expressão do receptor 1 de S1P (S1P1) em célula T *naïve*, uma vez que este receptor é internalizado quando exposto a S1P (Schwab e Cyster, 2007). Timócitos internalizam quase completamente S1P1 quando expostos a 1nM de S1P por 20 minutos *ex vivo*. Embora 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. Estes dados sugerem que a concentração de S1P nos órgãos linfoides seja menor que na circulação. A validação deste método é suportada por estudos que mostram que quando a concentração de S1P aumenta nos órgãos linfoides a expressão de S1P1 desaparece da 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). Schwab e colaboradores (2005) demonstraram que o plasma de camundongos apresenta 330 ng/g (860 nM) de S1P, enquanto o timo, os linfonodos e o baço apresentam respectivamente 30, 40 e 150 ng/g de S1P (Schwab et al., 2005). Já Murata e colaboradores (2000) observaram que a concentração de S1P no plasma humano é de aproximadamente 400 nM, enquanto no soro humano a concentração deste lipídio é de cerca de 800 nM. Este fato ocorre provavelmente devido a liberação de S1P por plaquetas (Murata et al., 2000). A concentração de S1P nos órgãos linfoides humanos não é conhecida. Desta forma, um gradiente de S1P é observado entre os compartimentos vasculares (plasma/soro) e extravasculares (tecidos), uma vez que os níveis de S1P são

mantidos em altas concentrações no plasma e no soro e em baixas concentrações nos tecidos (Schwab e Cyster, 2007; Cyster e Schwab, 2012).

Além do S1P1, outros quatro receptores capazes de se ligar a S1P extracelular foram identificados no final do século XX. Em 1990 foi descoberto o S1P1, seguido pela identificação, em 1997, dos receptores S1P2 e S1P3. Por fim, em 2000, mais dois receptores foram descritos, os receptores S1P4 e S1P5. Apesar de ter sido descoberto em 1900, apenas em 1998 o S1P1 foi identificado como um receptor da S1P (Kihara et al., 2015). Os receptores S1P1-5 possuem 7 domínios transmembranares, estando a sua região amino-terminal voltada para região extracelular e a C-terminal voltada para região intracelular (Watterson et al., 2003), semelhantes aos receptores de quimiocinas. Os receptores de S1P são capazes de interagir com diferentes proteínas G (proteína $G_{i/o}$, G_s , G_q , $G_{12/13}$), permitindo que este lipídio seja capaz de regular diversos processos fisiológicos (Takabe et al., 2008). A interação dos receptores de S1P com a proteína $G_{i/o}$ pode ativar as vias de sinalização de: fosfolipase C (PLC), que pode culminar com o aumento de cálcio intracelular e/ou ativação de PKC; Ras, que leva a ativação das MAPK; e PI3K, que pode levar à ativação de AKT, induzindo a ativação de eNOS e da GTPase Rac. A proteína $G_{i/o}$ pode ainda inibir a adenilato ciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMP cíclico intracelular e da inativação de PKA. Já a proteína G_s induz a ativação da adenilato ciclase, que leva ao aumento da produção de AMP cíclico intracelular e consequentemente a ativação de PKA. Enquanto a proteína G_q , assim como a proteína G_i , induz a ativação de PLC, que pode culminar com o aumento de cálcio intracelular e/ ativação de PKC como citado acima. Por fim, a proteína $G_{12/13}$ leva á ativação da GTPase Rho e a consequente inibição da GTPase Rac (Cuvillier, 2012). As vias de sinalização ativadas pelos receptores de S1P podem ser observadas abaixo na figura 1.7.

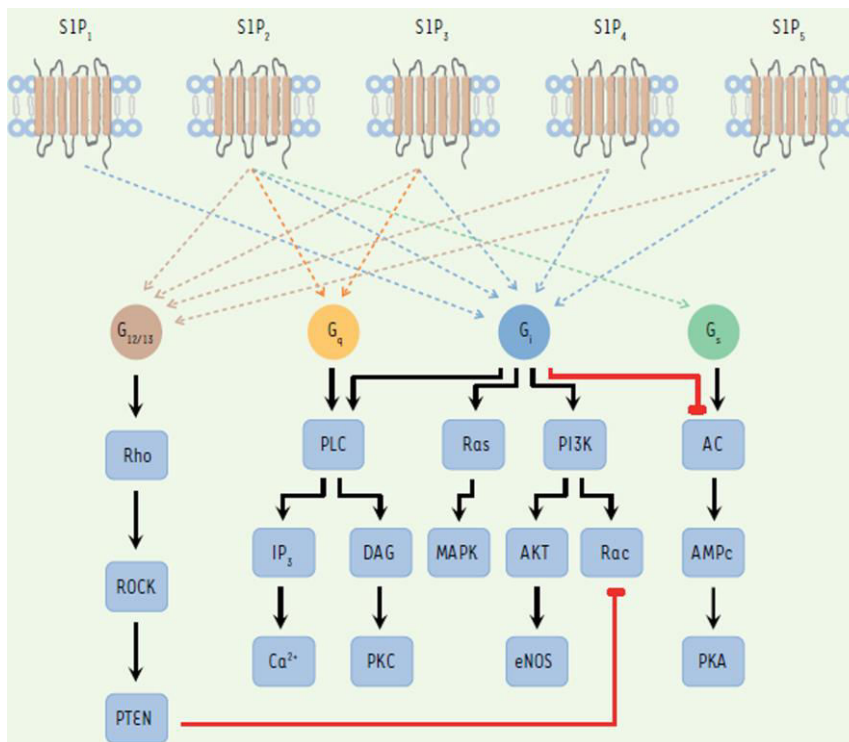


Figura 1.7: Vias de sinalização ativadas pelos diferentes receptores de S1P. Os receptores de S1P são capazes de interagir com diferentes proteínas G que induzem a ativação de diferentes vias de sinalização. A proteína $G_{i/o}$ ativa as vias de sinalização de: PLC que pode culminar com o aumento de cálcio intracelular e/ou ativação de PKC; Ras ativa MAPK; PI3K ativa AKT, que por sua vez ativa eNOS e/ou Rac; e inibe AC que diminui os níveis de AMPc que inibe PKA. Já a ativação da proteína G_s , ativa AC que aumenta os níveis de AMPc que ativa PKA. A proteína G_q ativa a via de PLC acima descrita. Enquanto a proteína $G_{12/13}$ ativa Rho, inibindo Rac. Abreviações: PLC = fosfolipase C; PKC = proteína quinase C; Ras = GTPase Ras; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K = proteína quinase fosfatidil-inositol 3; AKT = proteína quinase B; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; Rac = GTPase Rac; AC = adenilato ciclase; AMPc = AMP cíclico; PKA = proteína quinase A; Rho: GTPase Rho. (Adaptado de Cuvillier, 2012).

O S1P1, como citado acima, foi o primeiro receptor de S1P a ser descrito, e é o mais frequentemente estudado. O gene para o S1P1 (*S1PR1*) se encontra localizado no locus cromossomal 1p21, codifica 382 aminoácidos e apresenta peso molecular de 42,8 kDa. Este receptor é altamente conservado entre as espécies, apresentando 94% de similaridade com o receptor murino. S1P1 é o único dentre os receptores de S1P capaz de interagir exclusivamente com a proteína $G_{i/o}$ (Kihara et al., 2014). A expressão do S1P1 é ubíqua em adultos, sendo observada principalmente em células endoteliais, no coração, no cérebro e em células do sistema imune. Suas principais funções estão relacionadas ao desenvolvimento e integridade do sistema vascular, à neurogênese e ao tráfego de diversas células hematopoiéticas (células T, células B, células NKT, DC, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, osteoclastos e

progenitores hematopoiéticos), através do gradiente de S1P, em condições homeostáticas e patológicas (Chun et al., 2010a; Kihara et al., 2014). O papel do S1P1 no desenvolvimento sistema vascular foi inicialmente descrito em camundongos *knockouts* para o gene *S1pr1*. Estes animais não são viáveis e morrem ainda no útero, 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). Ainda no sistema vascular, S1P1 aumenta a integridade vascular através da reorganização do citoesqueleto e de mudanças nas junções formadas por caderina do endotélio vascular (VE-caderina) (Garcia et al., 2001; Sanna et al., 2006), e inibe angiogênese ao bloquear as respostas celulares induzidas por VEGF e estabilizar a VE-caderina nas junções celulares (Gaengel et al., 2012). Já a importância do S1P1 na neurogênese foi descrita em embriões de camundongos duplo-*knockouts* para os genes que codificam as enzimas SPHK1 e SPHK2, que apresentam defeitos no tubo neural que geram exencefalia. Estes defeitos são causados por uma perda celular massiça com presença de células apoptóticas e redução no número de células em mitose. O mesmo fenômeno foi observado em camundongos *knockouts* para o gene *S1pr1* (Mizugishi et al., 2005). No sistema imune, além de controlar a migração de diversas células hematopoiéticas, processo que será explorado mais adiante com enfoque na migração das células T, o S1P1 está envolvido também no status de diferenciação de células T. A inativação gênica do S1P1 em células T suprime a habilidade de estas células apresentarem fenótipo T_H17 *in vitro*, e quando encefalomielite autoimune experimental (EAE) é induzida em camundongos que possuem S1P1 com defeito de internalização, ocorre um aumento na polarização para o fenótipo T_H17 (Garris et al., 2013). Sinais induzidos por S1P1 suprimem ainda o desenvolvimento de células T regulatórias e induz a polarização para o fenótipo T_H1 (Liu et al., 2010).

Por sua vez, o gene para o S1P2 (*S1PR2*) se encontra localizado no locus cromossomal 19p13.2, codifica 353 aminoácidos e apresenta aproximadamente 39 kDa. Assim como S1P1, S1P2 é altamente conservado entre as espécies e se encontra presente em diversos tecidos (Chun et al., 2010a; Kihara et al., 2014). S1P2 é capaz de interagir tanto com $G_{i/0}$ quanto como G_s , G_q , $G_{12/13}$, entretanto, interage de forma mais eficiente com a proteína $G_{12/13}$. Camundongos *knockouts* para o gene *S1pr2* apresentam defeitos graves no ouvido interno, causados por deformidades na *stria vascularis* (vasculatura), que leva à surdez e a problemas de

equilíbrio (Kono et al., 2007). S1P2 apresenta também papel na integridade vascular com efeito contrário ao do S1P1. Em modelo de injúria pulmonar aguda, a deleção de S1P2 reduz o edema e o mesmo efeito pode ser observado quando o receptor S1P1 é ativado com agonista específico. Estes dados sugerem que, enquanto S1P1 aumenta, S1P2 reduz a integridade vascular (Sammani et al., 2010). Além disso, a indução da expressão de S1P2 por TNF induz a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, indicando papel de S1P2 como regulador da ativação do endotélio (Zhang et al., 2013a, Zhang et al., 2013b). S1P2 participa ainda da manutenção óssea, junto com S1P1, ao controlar a migração de osteoclastos. O remodelamento ósseo ocorre com osteoblastos formando o osso e osteoclastos reabsorvendo o mesmo. Precusores de osteoclastos migram da corrente sanguínea para medula óssea como resultado de quimiorrepulsão mediada por S1P2, o qual é ativado por altas concentrações de S1P. Na medula óssea, osteoclastos migram e aderem à superfície óssea, ou retornam à corrente sanguínea devido à quimiotaxia induzida por S1P (Ishii e Kikuta, 2013). S1P2 controla também a retenção, a proliferação e apoptose de células B no centro germinativo dos folículos linfoides (Green et al., 2011). Recentemente, S1P2 foi implicado na regeneração muscular, ao ativar vias de sinalização que culminam com o crescimento de células satélites (Loh et al., 2012), e na metástase, ao diminuir a expressão do supressor metastático Brms1 (Ponnusamy et al., 2012).

O gene para o S1P3 (*S1PR3*) se encontra localizado no locus cromossomal 9q.22.1.q.22.2, codifica 378 aminoácidos e apresenta 42kDa e 87% de homologia com o receptor murino. Este receptor é capaz de interagir com as proteínas $G_{i/o}$, G_q e $G_{12/13}$, se ligando de forma mais eficiente a G_q . Camundongos *knockouts* para o gene *S1pr3* não revelaram nenhum fenótipo ou defeito no desenvolvimento evidente (Kihara et al., 2014). Entretanto, camundongos duplo-*knockouts* para os genes *S1pr2* e *S1pr3* apresentam fertilidade reduzida (Ishii et al., 2002). Assim como S1P1 e S1P2, S1P3 é importante para manutenção da integridade vascular. O silenciamento gênico de S1P3 diminui a permeabilidade vascular e alveolar nos pulmões (Sammani et al., 2010). Desta forma, enquanto S1P1 aumenta a integridade vascular, S1P2 e S1P3 diminuem a mesma. Foi demonstrado ainda que, no sistema cardiovascular, S1P3 é responsável pela regulação do ritmo cardíaco de roedores (Sanna et al., 2004) e pode estar envolvido tanto nos mecanismos de vasoconstrição quanto nos mecanismos de vasodilatação (Nofer et al., 2004; Salomone et al., 2008). Além disso, S1P3 apresenta papel protetor ao diminuir a taxa de infartos em modelos de isquemia e reperfusão miocárdica, ao inibir a

apoptose de cardiomiócitos e o recrutamento de leucócitos (Nofer et al., 2004; Theilmeier et al., 2006). S1P3 está ainda envolvida no rolamento de leucócitos, por induzir a expressão de P-selectina no endotélio (Nussbaum et al., 2015), e na migração de monócitos (Keul et al., 2011).

Já o gene para o S1P4 (*S1PR4*) se encontra localizado no locus cromossomal 19p13.3, codifica 384 aminoácidos e apresenta 42 kDa (Kihara et al., 2014). S1P4 é capaz de interagir com as proteínas G_i e $G_{12/13}$, ativando as vias de sinalização acima descritas. Sua expressão é restrita a células e tecidos linfóides, mas recentemente foi observado em outros tecidos (Kihara et al., 2014), como em células satélites musculares, no qual junto com S1P1 induz a migração celular (Calise et al., 2012), e em artérias pulmonares de rato, na qual causa vasoconstrição (Ota et al., 2011). S1P4 foi ainda associado à migração de células CHO que superexpressam este receptor (Kohno et al., 2003), à migração de neutrófilos em camundongos deficientes para esfingosina liase (Allende et al., 2011) e à trombopoiese. Este receptor é altamente expresso durante a diferenciação de plaquetas e camundongos *knockouts* para o gene *S1pr4* que sofreram indução de trombocitopenia apresentam atraso na recuperação do número de plaquetas (Golfier et al., 2010). Além disso, células T e células dendríticas destes animais são capazes de migrar mais que as de camundongos normais. Estes animais apresentam ainda resposta T_H2 exacerbada e T_H1 reduzida em diferentes modelos de inflamação, possivelmente devido a uma interação defeituosa entre as células T e células dendríticas ou à menor capacidade das células dendríticas de produzirem IL-17 (Schulze et al., 2011).

Por fim, o gene para o S1P5 (*S1PR5*) se encontra localizado no locus cromossomal 19p13.2, codifica 398 aminoácidos e apresenta 39 kDa. Sua expressão é restrita ao cérebro e ao baço. S1P5 é capaz de se interagir com as proteínas G_i e $G_{12/13}$, porém se liga preferencialmente à última. Camundongos *knockouts* para o gene *S1pr5* são viáveis e férteis, entretanto apresentam uma redução no número de células NK circulantes (Kihara et al., 2014). Assim como os demais receptores de S1P, S1P5 apresenta papel na motilidade celular ao promover a saída de células NK da medula óssea e de linfonodos para o sangue (Walzer et al., 2007; Jenne et al., 2009; Mayol et al., 2011). Além disso, S1P5 inibe a migração de precursores de oligodendrócitos (Novgorodov et al., 2007) e parece ser importante, pelo menos *in vitro*, para o aumento da integridade da barreira endotelial cerebral (van Doorn et al., 2012).

Na tabela 1.1, abaixo, podemos observar a nomenclatura atualizada dos genes e receptores da S1P, bem como o tipo de proteína G com que é capaz de interagir, sua expressão em diferentes órgãos e as suas principais funções.

Tabela 1.1: Descrição da nomenclatura atualizada dos genes e dos receptores de esfingosina-1-fosfato, dos tipos de proteína G com as quais os diferentes receptores podem interagir, a expressão dos mesmos, e as suas principais funções quando estimulados por seu ligante (adaptado de Chun et al., 2010b).

Nome do receptor	Nome do Gene		Proteína G acoplada	Expressão	Principais funções
	Humano	Camundongo			
S1P1	S1PR1	S1pr1	G _{i/0}	Amplamente distribuídos	Desenvolvimento e integridade vascular, neurogênese e migração celular de diversas células hematopoiéticas
S1P2	S1PR2	S1pr2	G _{i/0} , G _s , G _q e G _{12/13}	Amplamente distribuídos	Migração celular de osteoclastos, integridade vascular, audição e equilíbrio
S1P3	S1PR3	S1pr3	G _{i/0} , G _q e G _{12/13}	Amplamente distribuídos	Regulação da integridade e do tônus vascular, regulação do ritmo cardíaco, proteção na injúria da isquemia e reperfusão miocárdica e migração celular
S1P4	S1PR4	S1pr4	G _i e G _{12/13}	Tecidos linfoides	Migração de células T, de células dendríticas e de células satélites musculares e vasoconstrição de artérias pulmonares
S1P5	S1PR5	S1pr5	G _i e G _{12/13}	Cérebro e baço	Migração de células NK e de precursores de oligodendrócitos integridade da barreira endotelial cerebral

1.1.2.3.1 – S1P1 e o seu papel na migração de células T

Como citado anteriormente, o S1P1 está envolvido na migração de diversas células do sistema imune, como, por exemplo, das células T. Células T de camundongos expressam predominantemente os receptores S1P1 e S1P4 (Graeler e Goetzi, 2002). Há cerca de 12 anos, Matloubian e colaboradores demonstraram que células hematopoiéticas de camundongos que não expressavam o receptor S1P1 desapareciam do sangue e dos órgãos linfoides periféricos destes animais (Matloubian et al., 2004). Em paralelo, observou-se no timo destes animais o acúmulo de timócitos CD4 e CD8 SP, que apresentavam fenótipo de timócitos maduros, ou seja, de timócitos que estavam prontos para deixar o órgão (Matloubian et al., 2004). Foi observado ainda, por citometria de fluxo (Allende et al., 2004) e por RT-PCR, que timócitos DP de camundongos normais expressam menor densidade do receptor S1P1 que os timócitos CD4 e CD8 SP. Estes timócitos foram ainda capazes de migrar frente a diferentes concentrações de S1P, enquanto os timócitos de camundongos cujas células hematopoiéticas não expressam o receptor S1P1 não foram capazes de migrar frente a este lipídio (Matloubian et al., 2004).

Além disso, a transferência de células T que não expressam o receptor S1P1 para camundongos normais induziu o acúmulo destas células nos órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos periféricos e mesentéricos e nas placas de Peyer) (Matloubian et al., 2004). Estes dados suportam a hipótese de que o receptor S1P1 seja um dos principais responsáveis pela saída de células T do timo e dos órgãos linfoides periféricos. Desta forma, postulou-se que timócitos DP expressam menores quantidades de S1P1, e timócitos SP passariam a expressar altas quantidades deste receptor (Allende et al., 2004), deixando, assim, o timo em resposta ao gradiente de S1P gerado entre os vasos sanguíneos e os tecidos linfoides (Fig. 1.8a).

Em resumo, pericitos e células endoteliais produzem S1P próximo a 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., 2012b). 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 para os vasos sanguíneos, onde este lipídio é encontrada em elevadas concentrações (Hisano et al., 2012b). O resumo da saída de timócitos maduros do timo mediada pela interação S1P-S1P1 pode ser observada na figura 1.8b.

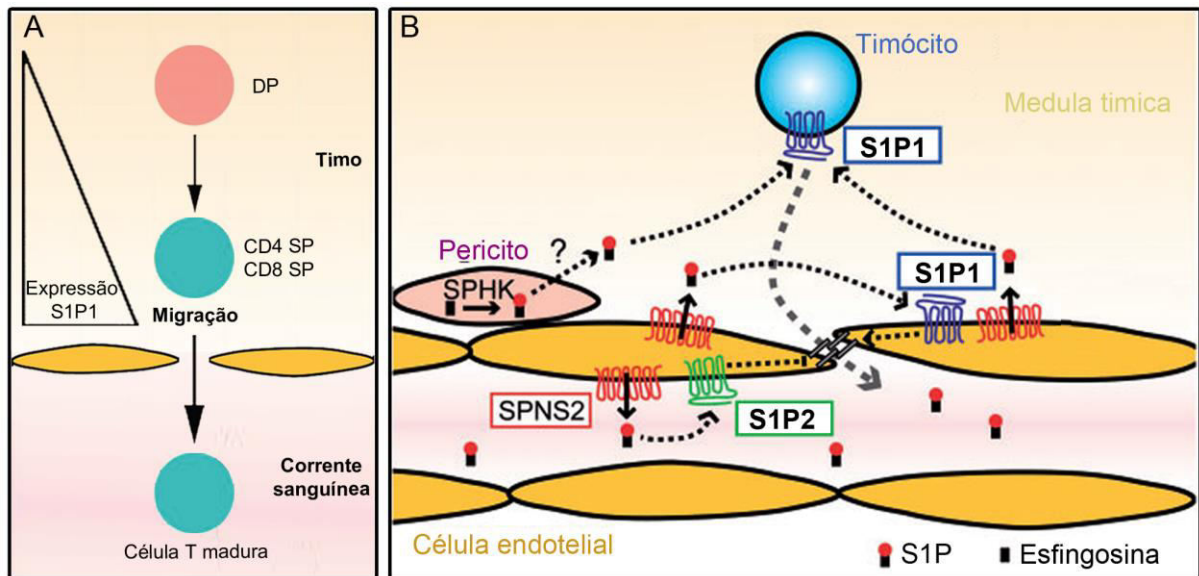


Figura 1.8: Esquema ilustrativo do papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1) na saída de timócitos maduros do timo. (A) Timócitos DP expressam baixas quantidades do S1P1; no estágio SP, timócitos CD4 e CD8 passam a expressar altas quantidades do receptor, podendo, assim, deixar o timo. (B) Timócitos maduros presentes na medula tímica deixam o timo devido a um gradiente de S1P entre o órgão e a corrente sanguínea. O transporte da S1P, produzida pelas células endoteliais, para o meio extracelular é mediado pelo SPNS2. O balanço entre a sinalização de S1P1 e S1P2 nas células endoteliais determina a permeabilidade vascular e ativação do receptor S1P1 nos timócitos maduros induz a saída destas células do timo. Abreviaturas: DP = duplo-positivo; SP = simples-positivo; SPNS2 = homólogo 2 do spinstar; S1P = esfingosina-1-fosfato; S1P1 = receptor 1 de esfingosina-1-fosfato; S1P2 = receptor 2 de esfingosina-1-fosfato (adaptado de Allende et al., 2004; Hisano et al., 2012b).

A expressão do S1P1 em timócitos é controlada pelo fator de transcrição KLF2, o qual faz parte da família de fatores de transcrição do tipo Kruppel (KLFs), que apresentam papéis fundamentais no desenvolvimento de linhagens celulares específicas. KLF2 é normalmente expresso em timócitos maduros, em células T *naive* e em células T de memória, de forma similar ao S1P1. Durante a diferenciação de células T, a expressão de KLF2 é observada após o processo de seleção positiva. Carson e colaboradores observaram que a deficiência de KLF2 em células T não interfere na diferenciação de células T. Entretanto, um número reduzido de células CD4 e CD8 SP foi encontrado na periferia, enquanto um número

elevado destas células foi observado no timo. Células T CD4 e CD8 que se acumulam no timo apresentam um fenótipo CD69^{high} e CD62L^{low}, característica de timócitos semi-maduros, mas apresentam também CD24^{low} e Qa2^{high}, característica de timócitos maduros. Em paralelo à baixa expressão de CD62L, estas células apresentam ainda uma expressão reduzida de CCR7, integrina β_7 e S1P1. Além disso, foi observado que KLF2 é capaz de ativar o promotor de S1P1, regulando positivamente a expressão de S1P1 (Carlson et al., 2006). Indiretamente, a interação entre CCL19 e CCR7 parece regular também a expressão do receptor S1P1. Estudos *in vitro* mostraram que esta interação leva à fosforilação de ERK5 (sinal extracelular regulado por quinase 5) que culmina com aumento na expressão de KLF2 e consequentemente de S1P1 (Shannon et al., 2012).

Enquanto KLF2 controla a expressão transcricional do S1P1, CD69 age diretamente no receptor (Carlson et al., 2006). Como citado anteriormente, durante a diferenciação intratímica o processo de maturação dos timócitos SP é caracterizada pela queda da expressão de CD69, um sinal de retenção tecidual, e pelo aumento da expressão de CD62L e da integrina B₇, que facilitam a recirculação de células T maduras. Camundongos cujos linfócitos são deficientes em S1P1 possuem fenótipo alterado, com células T e B apresentando níveis elevados de CD69 (Alfonso et al., 2006). Shioh e colaboradores (2006) verificaram que após tratamento de células T com poli(I:C), um composto que mimetiza moléculas de RNA de dupla-fita, ocorre uma diminuição da expressão proteica do S1P1 e a inibição da função quimiotática de S1P. Este evento se mostrou dependente de CD69, uma vez que camundongos deficientes nesta molécula não apresentam esta resposta (Shioh et al., 2006). Além disso, CD69 interage diretamente com S1P1 ao co-immunoprecipitar com o receptor em questão. Esses dados indicam que CD69 forma um complexo com S1P1, que leva a internalização e degradação do receptor. Desta forma, CD69 regula negativamente a função de S1P1 e promove a retenção de células T nos órgãos linfoides (Shioh et al., 2006).

Recentemente, nós observamos, por citometria de fluxo e qRT-PCR quantitativo, que timócitos humanos também expressam o receptor S1P1 (Mendes-da-Cruz et al., 2014). Assim como em camundongos, timócitos DP expressam menores quantidades do receptor S1P1 quando comparado com timócitos CD4 e CD8 SP. Funcionalmente, observamos que timócitos humanos também são capazes de migrar frente a S1P e que esta migração está diretamente relacionada à expressão do receptor S1P1 nestas células. Em outras palavras, timócitos DP, que

expressam menos S1P1, migram menos frente a S1P que timócitos CD4 e CD8 SP, que expressam níveis mais altos de S1P1 (Mendes-da-Cruz et al., 2014 - Anexo 1).

Diversos estudos vêm mostrando uma relação entre a S1P, a SPHK e o câncer. Muitos destes estudos têm sugerido que a sinalização induzida pela SPHK1/S1P tem um papel fundamental no processo de carcinogênese, pois induz a proliferação (Kohno et al., 2006; Gao e Smith, 2011; Guan et al., 2011) e a migração (Park et al., 2007; Bao et al., 2012) de células neoplásicas e a resistência das mesmas a drogas quimioterápicas (Pchejetski et al., 2005; Sukocheva et al., 2009). Além disso, esta sinalização previne a apoptose (Cuvillier e Levade, 2001; Betito e Cuvillier, 2006) e estimula a angiogênese tumoral (Chae et al., 2004; Ho et al., 2005). Cabe ressaltar que o aumento da capacidade migratória de células neoplásicas está diretamente relacionado ao aparecimento de metástases. Os efeitos da S1P na migração de células cancerígenas dependem dos receptores capazes de interagir com este lipídio, e que estão preferencialmente expressos nestas células. Neste sentido, os receptores S1P1 e S1P3 são capazes de induzir a migração celular, enquanto o S1P2 é capaz de inibir este processo (Brocklyn, 2010).

Estudos mostraram que a S1P é capaz de induzir a migração das linhagens celulares DU145, de câncer de próstata humano (Sekine et al., 2011), ML-1, de carcinoma de tireoide folicular (Bergelin et al., 2010), WiT49, de tumor de Wilms (Li et al., 2009), Jurkat, de leucemia linfoblástica aguda de células T (Iino et al., 2014), e KM-H2 e SUP-HD1, de linfoma Hodgkin (Kluk et al., 2013). Nós observamos que pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) e com linfoma linfoblástico de células T (LL-T) expressam o receptor S1P1 (Mendes-da-Cruz et al., 2014 - Anexo 1), e sugerimos que o S1P1 possa estar regulando o padrão migratório de precursores de células T não apenas em condições fisiológicas, mas também em condições patológicas.

1.2 – A leucemia/linfoma linfoblástico de células T (LLL-T)

O câncer infanto-juvenil ou tumores pediátricos são aqueles que acometem crianças e adolescente com menos de 19 anos de idade, sendo considerado raro quando comparado aos tumores observados em adultos, uma vez que correspondem a 2-3% de todos os tumores malignos. Nos países em desenvolvimento, o câncer infanto-juvenil é a principal causa de óbito entre 0 e 14 anos, e é a segunda causa de óbito nos países desenvolvidos, ficando atrás apenas

dos acidentes (INCA, 2008). Devido à vasta gama de diversidade morfológica, a classificação do câncer infanto-juvenil é baseada no aspecto morfológico do tumor. De acordo com a Classificação Internacional de Câncer Infantil, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), os tumores pediátricos são classificados em doze grupos: I-Leucemias; II- Linfomas e neoplasias reticuloendoteliais; III- Neoplasias do sistema nervoso central e neoplasias intracraniais e intraespinhais mistas; IV- Tumores do sistema nervoso simpático; V- Retinoblastoma; VI- Tumores renais; VII- Tumores hepáticos; VIII- Tumores ósseos malignos; IX- Sarcomas de partes moles; X- Neoplasias de células germinativas, trofoblásticas e gonadais; XI- Carcinomas e outras neoplasias malignas, e XII- Outras neoplasias malignas inespecíficas (INCA, 2008).

Dentre os tumores pediátricos, o mais frequente nas populações é a leucemia, que corresponde de 25-35% dos mesmos. A leucemia é caracterizada pela proliferação anormal de clones de leucócitos do sangue, e pode ser classificada como aguda ou crônica. A leucemia aguda se caracteriza por um aumento rápido no número de células imaturas do sangue, o que faz com que a medula óssea seja incapaz de gerar célula sanguíneas saudáveis. Já a forma crônica da leucemia se caracteriza por um grande aumento no número de células maduras anormais, podendo levar meses ou anos para progredir. As leucemias agudas podem ser de natureza mieloide ou linfoide, sendo a leucemia linfoblástica aguda (LLA) o câncer infanto-juvenil mais comum (INCA, 2015). A LLA pode afetar tanto células B quanto células T. Dentre as LLAs, a mais frequente é a LLA de células B (LLA-B) que representa 80-85% das LLAs, enquanto a LLA de células T (LLA-T) representa 15-20% das LLAs (Graux, 2011).

Alguns fatores ambientais associados ao desenvolvimento de LLA em crianças são a exposição no útero a radiações ionizantes, pesticidas e solventes (Onciu, et al, 2009), uso de vitaminas pré-natais, o uso de álcool e tabaco pelos pais, dieta maternal, dentre outros. Além disso, em menos de 5% dos casos, os pacientes apresentam síndromes genéticas herdadas (Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Síndrome de quebra de Nijmegen e Ataxia-telangiectasia). Observou-se que há uma pequena predominância de crianças do sexo masculino e brancas afetadas por esta doença (Pui et al., 2008).

Os linfomas linfoblásticos de células T (LL-T) apresentam características clínicas, imunofenotípicas e morfológicas semelhantes às LLA-T (Burkhardt, 2010). Desde 1997, ambos são considerados como duas formas distintas de uma mesma

doença (Harris et al., 1999), a qual é atualmente denominada de leucemia/linfoma linfoblástico T (LLL-T) (Zerbini et al., 2011). Desta forma, acredita-se que o linfoma representa uma manifestação precoce e localizada da LLL-T, enquanto a leucemia representaria um estágio mais tardio da doença com disseminação sistêmica (Hoelzer e Gökbuget, 2009).

Como citado acima, a LLL-T são proliferações malignas originadas de um único precursor hematopoiético comprometido com a linhagem de células T, o qual adquire diversas anormalidades genéticas durante o seu processo de maturação (Graux, 2011). Estas anormalidades genéticas parecem ocorrer em pontos cruciais da diferenciação de timócitos em células T maduras, e a expressão de certos oncogenes parece estar intimamente relacionada à parada da diferenciação nestes estágios particulares (Ferrando et al., 2002). Como consequência deste evento, pode ocorrer o acúmulo de blastos na medula óssea, levando a uma supressão da hematopoiese normal (Graux, 2011). Além disso, blastos de LLL-T podem ser encontrados no sangue e/ou se acumular em tecidos, formando uma massa mediastinal que pode envolver o timo, linfonodos ou sítios extranodais (You et al., 2015). Diversos grupos realizam a distinção entre a leucemia e o linfoma baseados no envolvimento da medula óssea. Assim, pacientes que apresentam menos de 25% de blastos na medula óssea e que não apresentam blastos periféricos são diagnosticados com LL-T, enquanto os pacientes que apresentam 25% ou mais blastos na medula óssea são diagnosticados com LLA-T. É importante salientar que além do envolvimento da medula óssea, a distinção entre leucemia e linfoma leva em consideração ainda a presença da massa mediastinal, a qual se encontra presente em praticamente todos os casos de linfoma e em aproximadamente metade dos casos de leucemia (Hoelzer e Gökbuget, 2009; Burkhardt, 2010).

1.2.1 – Alterações genéticas

A transformação de células T é um processo que ocorre em diversas etapas em que diferentes alterações genéticas cooperam para alterar os mecanismos normais de controle do crescimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular durante o desenvolvimento de timócitos (Vlierberghe e Ferrando, 2012). Estas transformações culminam com a geração de células que possuem um controle anormal destes eventos celulares (Aifantis et al., 2008).

Cariótipos anormais podem ser observados em aproximadamente 50% dos casos de LLA-T, e parecem ocorrer devido a translocações de cromossomos. Estas translocações frequentemente envolvem a justaposição de promotores e elementos potenciadores dos genes do receptor de célula T (TCR), no cromossomo 7 (TCR β e TCR γ) e no cromossomo 14 (TCR α e TCR δ), com fatores de transcrição gênica, como TAL1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), LYL1 (*lymphoblastic leukaemia-derived sequence 1*), HOX11 (*homeobox-11*). Alguns destes fatores de transcrição gênica são normalmente expressos em tímócitos e são reguladores da ontogenia de células T. Outros, porém, são expressos de forma ectópica por células de LLA-T (Aifantis et al., 2008).

A translocação cromossômica, nos pacientes, parece ainda induzir a fusão de genes e deleções crípticas. A fusão de genes induz a codificação de novas proteínas quiméricas com propriedades oncogênicas, como a SIL-(*SLC-interrupting locus*)-TAL-1, presente em 9-30% dos casos de LLA-T infantis (Graux et al., 2006). Já as deleções crípticas levam a perda de genes de supressão tumoral. As deleções mais comuns ocorrem nos cromossomos 6q e no locus ARF (ou INK4 ou CDKN2A) do cromossomo 9p21, os quais contêm genes que codificam proteínas importantes na regulação do ciclo celular, como o inibidor de quinase dependente de ciclina, p16 (Cayuela et al., 1996; Gardie et al., 1998).

Além disso, mais de 50% dos casos de LLA-T envolvem mutações nas proteínas NOTCH, que são reguladores essenciais do comprometimento de progenitores hematopoiéticos com a linhagem de linfócitos T (Weng et al., 2004).

Evidências recentes sugerem, ainda, que a duplicação gênica pode também estar associada ao aparecimento de LLA-T (Clappier et al., 2007; Lahortiga et al., 2007; O'Neil et al., 2007).

É interessante ressaltar que recentemente um pequeno grupo de miRNA, com propriedades de supressão tumoral e oncogênicas, foi descrito no contexto das transformações malignas de células T. Sanghvi e colaboradores (2014) descreveram um conjunto de miRNA supressores tumorais na LLA-T (miR-29, miR-31, miR-150, miR-155 and miR-200) que atuam na ativação dos oncogenes MYB e HBP1 (Sanghvi et al., 2014). Além disso, o miR-193 foi também implicado na supressão do oncogene MYB e do fator anti-apoptótico MCL1 (Mets et al., 2015). Já Mavrakis e colaboradores (2011) identificaram miRNA (miR19b, miR-20a, miR-26a, miR-92 and miR-223) que suprimem os genes supressores tumorais PHF6, PTEN, BIM e FBXW7 na LLA-T (Mavrakis et al., 2011). Outros miRNA com propriedades

oncogênicas foram implicados no desenvolvimento desta doença, como miR-128-3p, que regula negativamente PHF6 (Mets et al., 2014), e, miR-17-92 que esta envolvido na regulação de NOCTH1 (Nagel et al., 2009).

1.2.2 – Características imunofenotípicas

Os blastos de LLL-T possuem características imunofenotípicas correspondentes a estágios distintos de maturação de células T e são caracterizados pela expressão de antígenos associados a linhagem de células T. O padrão de expressão destes antígenos é utilizado para classificar os blastos de LLL-T de acordo com os estágios de desenvolvimento de timócitos normais. Os antígenos comumente utilizados para esta caracterização são CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD34 (Onciu, 2009). Como pode ser observado na tabela 1.2, os blastos de LLL-T podem ser subdivididos em pró-T, pré-T, blastos T corticais e blastos T medulares.

Tabela 1.2: Classificação dos blastos de LLL-T de acordo com os estágios de maturação de precursores T normais.

Subtipo de LLL-T	CD1a	CD2	cCD3	sCD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD34
Pró-T	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Pré-T	-	+	+	-	-	±	-	-	±
Blasto T cortical	+	+	+	-	+	±	+	+	-
Blasto T medular	-	+	+	+	± ^a	±	+	± ^a	-

^a, O estágio medular pode apresentar a expressão de CD4 ou CD8. Abreviações: cCD3 = CD3 citoplasmático; sCD3 = CD3 de superfície (Onciu, 2009).

1.2.3 – Manifestações clínicas e tratamento

Os sintomas mais comuns da LLA são febre, fadiga e letargia, dores nos ossos e nas juntas e diátese hemorrágica. Pacientes com LLA-T podem apresentar ainda uma massa mediastinal, com ou sem efusão pleural, o que pode causar um desconforto respiratório, e outros sinais de síndrome da veia cava superior. Já as anormalidades laboratoriais mais comuns são anemia, trombocitopenia, neutropenia e leucopenia ou leucocitose e elevados níveis de lactose desidrogenase e ácido

úrico no soro (Onciu, 2009). Pacientes podem ainda apresentar infiltração no sistema nervoso central no diagnóstico (Vlierberghe e Ferrando, 2012).

A escolha do tratamento de pacientes com LLA se baseia nas características apresentadas (idade, contagem de leucócitos e presença ou ausência de infiltração do sistema nervoso central ou do testículo), nas características da leucemia (linhagem e sub-grupo genético) e resposta inicial a terapia. Em geral, o tratamento de LLAs se baseia na quimioterapia intensiva de curta duração, com altas doses de metotrexato, citarabina, ciclosfosfamida e dexametasona ou prednisona, vincristina, L-asparaginase e/ou antraciclina. Em seguida o paciente passa pela intensificação ou terapia de consolidação para eliminar a leucemia residual, prevenir ou erradicar infiltração do sistema nervoso central e assegurar a continuidade da remissão. Pode ainda ser aplicado o uso de radiação em pacientes com evidências de infiltração no sistema nervoso central ou no testículo, entretanto, o uso desta técnica é muito controversa, principalmente em crianças (Onciu, 2009), pois pode causar sequelas neurocognitivas e neoplasias secundárias (Patrick e Vora, 2015). Em pacientes adultos, o uso de fatores de crescimento, como G-CSF, que acelera a recuperação hematopoiética, melhorou as taxas de sucesso do tratamento. Pacientes pediátricos com características de alto risco, com falha na indução da quimioterapia ou com doença residual mínima persistente após duas semanas de tratamento recebem uma terapia mais agressiva e são considerados para o transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico (Onciu, 2009).

O prognóstico da LLA-T apresenta uma melhora gradual com a introdução da quimioterapia intensiva, com as taxas de cura em protocolos de tratamento modernos alcançando 75% em crianças e 50% em adultos. Entretanto, a resolução da LLA-T em pacientes com resistência primária ou reincidência ainda é baixa (Vlierberghe e Ferrando, 2012). A maioria das reincidências em pacientes com LLA-T ocorre dentro de dois anos após o diagnóstico, e apenas 15-23% dos casos não apresentam uma nova recaída nos cinco anos subsequentes, mesmo com quimioterapia intensiva e transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico. Geralmente isto ocorre devido a baixa eficácia da quimioterapia convencional e novas drogas ativas em pacientes reincidentes, como clofarabina, bortezomib e nelarabina, estão sendo testadas (Patrick e Vora, 2015). Desta forma, os esforços de pesquisas atualmente estão voltados para procura de alvos para o desenvolvimento de drogas menos tóxicas e mais eficazes, o que requer um alto

grau de especificidade e o melhor entendimento dos eventos moleculares que levam ao desenvolvimento desta doença (Vlierberghe e Ferrando, 2012).

Novas abordagens para o tratamento de LLA-T incluem como alvos vias de sinalização. Nesse sentido, vias de sinalização envolvidas na migração celular induzida por S1P estão também envolvidas em processos importantes para o desenvolvimento de células T normais e neoplásicas (Pyne et al., 2015). Inibidores das SPHKs reduzem a ativação de AKT e ERK e induzem eventos de apoptose e autofagia em linhagens celulares e células de pacientes com LLA-T (Evangelisti et al., 2014).

1.2.4 – Migração de blastos de LLL-T

Células T maduras se movimentam constantemente entre o sangue e os tecidos, num processo denominado de recirculação de linfócitos. Esta recirculação não ocorre ao acaso, mas é guiada por mecanismos que direcionam estas células para sítios específicos nos tecidos (Butcher e Picker, 1996). Este processo, assim como na migração intratímica, é regulado por moléculas de adesão e quimiocinas, entre outras moléculas. Células endoteliais e subpopulações de células T expressam moléculas de adesão/integrinas e quimiocinas/receptores de quimiocinas que permitem a migração das células T para tecidos e compartimentos específicos. A desregulação deste processo de migração celular apresenta um papel fundamental no câncer, podendo resultar em invasão tumoral e metástase (Pals et al., 2007).

Hasegawa e colaboradores (2000) mostraram que células de pacientes com leucemia de células T de adultos que apresentam envolvimento dos órgãos linfoides expressam significativamente mais CCR7 do que células de paciente sem envolvimento dos órgãos linfoides. Ainda comparativamente, as células de pacientes com envolvimento dos órgãos linfoides foram capazes de aderir significativamente mais a diferentes substratos. Ensaio de migração mostraram ainda que as células de pacientes com envolvimento dos órgãos linfoides apresentaram maior capacidade migratória frente a CCL9 e CCL21, ligantes do receptor CCR7, do que as células de pacientes sem envolvimento dos órgãos linfoides. Estes dados sugerem que CCR7 pode ter um papel importante no processo de infiltração de órgãos linfoides nos casos de leucemia de células T de adultos (Hasegawa et al., 2000).

Crazzolara e colaboradores (2001) mostraram que células de pacientes de LLA-T com infiltração extra-medular apresentam maior intensidade de fluorescência para o CXCR4 do que células de pacientes sem infiltração extra-medular. Além disso, ensaios de migração transendotelial mostraram que as células de pacientes de LLA-T que migraram frente à quimiocina CXCL12, ligante do receptor CXCR4, foram células que expressavam quantidades elevadas do receptor. Estes dados sugerem que CXCR4 e seu ligante possam apresentar um papel fundamental na invasão extra-medular, já que CXCL12 é produzida em outros tecidos além da medula óssea. Alguns outros exemplos de tecidos capazes de produzir CXCL12 são linfonodos, fígado, baço, pulmão, rins e cérebro (Crazzolara et al., 2001).

Recentemente, demonstramos que células de pacientes de LLA-T expressam menos neuropilina-2 e semaforina-3F do que células de pacientes com LL-T. Além disso, a semaforina-3F foi capaz de inibir a migração de células de pacientes de LLA-T induzida por CXCL12. Neuropilinas e semaforinas foram inicialmente descritas como moduladores da orientação axonal, angiogênese e organogênese. Nós verificamos que timócitos humanos expressam o receptor neuropilina-2, o qual regula a migração destas células, uma vez que a presença de seu ligante, a semaforina-3F, inibe a migração induzida por CXCL12 e S1P (Mendes-da-Cruz et al., 2014 - Anexo 1).

2. RACIONAL – POTENCIAL PAPEL DA S1P NA MIGRAÇÃO DOS BLASTOS DE LLL-T

Os dados acima citados sugerem que moléculas envolvidas na regulação da migração de células T em condições fisiológicas podem também estar regulando o padrão migratório em condições patológicas, mais especificamente na capacidade de células neoplásicas infiltrarem diferentes órgãos. Nós observamos recentemente que células de pacientes com LLA-T e com LL-T expressam o receptor S1P1 e respondem migrando frente a S1P (Mendes-da-Cruz et al., 2014 - Anexo 1). Nós observamos ainda que S1P é capaz de induzir a migração de diferentes linhagens celulares de LLA-T (MOLT-4, Jurkat e CEM) e esta migração está diretamente relacionada à expressão do S1P1. S1P foi capaz de induzir a migração destas células frente a baixas concentrações (10 e 100 nM) e esta migração foi acompanhada de eventos de polimerização de actina. Entretanto, elevadas concentrações de S1P (500 e 1.000 nM) não foram capazes de induzir a migração celular (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. S1 e 2). Desta forma, altas concentrações de S1P poderiam estar sendo repulsivas para as células, mas nossos dados mostram que estas elevadas concentrações não induzem a polimerização de actina. Além disso, o pré-tratamento das células com W146, um inibidor específico do S1P1, foi capaz de inibir a migração induzida por S1P em baixas concentrações. Entretanto, nas concentrações em que não se observou migração induzida por S1P, células pré-tratadas com W146 foram capazes de migrar (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 3A). Neste caso a migração observada nas células previamente tratadas com W146 poderia estar sendo mediada por outros receptores de S1P, em um possível mecanismo compensatório.

Nesse sentido, as interações mediadas pelo receptor S1P1 regulam a migração e a saída de timócitos normais do timo em condições fisiológicas e aparentemente em condições patológicas. Nós observamos que o receptor S1P1 está envolvido na migração de blastos de LLA-T, entretanto, nossos dados indicam que outros receptores de S1P podem estar envolvidos neste processo. Desta forma, nós hipotetizamos que não só S1P1, mas também os demais receptores S1P poderiam estar regulando o padrão migratório no caso da LLL-T. Além disso, de acordo com a nossa hipótese, a intensidade da expressão do receptor S1P1 seria

um fator determinante na capacidade de infiltração da medula óssea e de outros órgãos, e conseqüentemente na determinação da gravidade da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo analisar a expressão e o papel dos receptores de S1P na migração de blastos de LLA-T.

3.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica dos receptores de S1P (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 e S1P5) em linhagens celulares humanas de LLA-T.
- Analisar a capacidade migratória de linhagens celulares humanas de LLA-T frente à S1P em ensaios de quimiotaxia e fugotaxia.
- Analisar possíveis vias de sinalização ativadas por S1P e envolvidas nos processos de migração celular em linhagens humanas de LLA-T.
- Analisar as funções de S1P1-5 e seus ligantes no processo de migração celular em um modelo *in vivo* de LLL-T.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Linhagens celulares:

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram: HPB-ALL, MOLT-4, Jurkat e CEM – linhagens humanas de LLA-T; SU-DHL1 - linhagem humana de linfoma anaplásico de células grandes; e EL-4 – linhagem murina de linfoma de células T. As linhagens HPB-ALL, MOLT-4, Jurkat, CEM e SU-DHL-1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Vahid Asnafi (Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hopital Necker-Enfants Malades, Paris, França). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 7-7.5, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), 2 g/L HEPES (Sigma-Aldrich) e 2 mg/mL de ciprofoxacino a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂. A linhagem MOLT-4 foi a única suplementada com 20% de SBF. Todas as linhagens foram passadas de 2-3 vezes por semana.

A linhagem celular HPB-ALL foi descrita em 1978 e estabelecida a partir de células de sangue periférico de um paciente de 14 anos do sexo masculino, diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda e timoma em 1973. As células foram obtidas antes do tratamento do paciente, que morreu 7 meses após o diagnóstico (Morikawa et al., 1978).

A linhagem celular MOLT-4 foi descrita em 1972 e estabelecida a partir de células de sangue periférico de um paciente de 19 anos do sexo masculino, diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda que recebeu tratamento quimioterápico desde agosto de 1970. A amostra do sangue do paciente foi retirada em Março de 1971 (Minowada et al., 1972).

A linhagem celular Jurkat foi descrita em 1977 e estabelecida a partir de sangue periférico de um paciente de 14 anos do sexo masculino, diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda. Após quimioterapia e radioterapia preventiva, o paciente sofreu quatro recaídas em 7 meses. A linhagem foi estabelecida a partir de células obtidas durante a primeira recaída (Schneider et al., 1977). Esta linhagem é algumas vezes denominada de JM; Jurkat e JM foram obtidas do mesmo paciente e são *sister* clones.

A linhagem celular CEM, originalmente denominada CCRF-CEM, foi descrita em 1965 e estabelecida a partir do sangue periférico de um paciente de aproximadamente 3 anos, do sexo feminino. A paciente foi primeiramente diagnosticada com linfossarcoma e passou por um tratamento de radioterapia, mas o quadro evoluiu para leucemia aguda. Após diversos tratamentos quimioterápicos e recaídas, uma amostra de sangue da paciente foi obtida e as células colocadas em cultura em 1964 (Foley et al., 1965).

A linhagem celular SU-DHL-1, foi descrita em 1974 e estabelecida a partir da efusão pleural de um paciente de 10 anos, do sexo masculino. O paciente foi inicialmente diagnosticado com linfoma histiocítico difuso. Após quimioterapia e radioterapia o paciente apresentou ótima melhora inicial, entretanto, apresentou repetidamente novas manifestações tumorais nos pulmões, abdômen inferior, sistema nervoso central e regiões subcutâneas. O paciente acabou falecendo em janeiro de 1974 após diversas remissões e recaídas. A amostra da efusão pleural do paciente foi obtida em setembro de 1973 (Epstein et al., 1974). Posteriormente, o diagnóstico foi corrigido e a linhagem passou a representar um linfoma anaplásico de células grandes (Drexler e MacLeod, 2004).

A linhagem celular EL-4 que foi estabelecida em 1945 a partir de um linfoma induzido em camundongo C57BL/6 com 9:10-dimetil-1:2-benzantraceno. Após obtenção da linhagem, a mesma foi mantida em camundongos através de injeções intraperitoneais ou subcutâneas (Gorer, 1950).

Um resumo das principais características das linhagens celulares humanas utilizadas neste estudo pode ser observado na tabela abaixo (tabela 4.1):

Tabela 4.1: Características das linhagens celulares humanas utilizadas neste estudo.

Linhagem	Diagnóstico	Idade do paciente	Sexo do paciente	Origem da linhagem
HPB-ALL	Leucemia linfoblástica aguda de células T	14 anos	Masculino	Sangue periférico
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda de células T	19 anos	Masculino	Sangue periférico
Jurkat	Leucemia linfoblástica aguda de células T	14 anos	Masculino	Sangue periférico
CEM	Leucemia linfoblástica aguda de células T	3 anos	Feminino	Sangue periférico
SU-DHL-1	Linfoma anaplásico de células grandes	10 anos	Masculino	Efusão pleural

Descrição do nome das linhagens, da doença que representam, da idade dos pacientes quando as células foram obtidas, do sexo dos pacientes e do local de que as células foram retiradas.

4.2 – RT-PCR quantitativo:

Com o objetivo de verificar a expressão de mRNA dos receptores da S1P nas linhagens celulares, nós realizamos RT-PCR quantitativo. Primeiramente, foi realizada a extração do mRNA das linhagens através do RNeasy Mini Kit (Quiagen®, Hilden, Alemanha). O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante. A quantidade e a pureza do mRNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Posteriormente, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA). Inicialmente foi preparado um mix contendo 2 µg de RNA, 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, EUA), 1 µL de Oligo(dT)₂₀ primer (Invitrogen), e volume suficiente de H₂O/DEPC para um volume final de 10 µL. O mix foi incubado a 65 °C por 5 minutos. Ao final da incubação, as amostras foram colocadas diretamente no gelo por 1 minuto e em seguida centrifugadas. Ao mix, foram adicionados 9 µL de uma solução contendo 4 µL de 5X RT buffer (Invitrogen), 2 µL de 50 mM MgCl (Invitrogen), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL de RNaseOUT™ (Invitrogen), gerando um mix com volume final de 19 µL. Este mix foi incubado a 42 °C por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado ao mix 1 µL da enzima Super Script II RT (Invitrogen). Com um volume final de 20 µL, o mix foi incubado em um termociclador com as seguintes condições: 42 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos e resfriado a 4 °C. Após estas incubações, as amostras foram congeladas a – 20 °C.

Após a síntese do cDNA, foi realizado um RT-PCR quantitativo em volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL do Fast Syber® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems – Life Technologies, Carlsbad, EUA), 1 µL de cada *primer* (Invitrogen), 3 µL de cDNA e 7,5 µL de H₂O/DEPC. Os cDNAs foram diluídos 1:10 e a concentração final dos primers foi de 180 nM. Os ciclos de amplificação foram realizados no sistema de detecção de sequências StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95 °C por 20 segundos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 03 segundos e de 60 de 30 segundos. Após os ciclos de amplificação foi realizada a curva de *melting*.

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). Para análise dos genes utilizamos o gene controle ABL, o qual é recomendado para o diagnóstico de leucemias pelo *Europe Against Cancer Program* (Beillard et al., 2003) e as análises de *Fold Change* foram realizadas usando HPB-ALL como calibrador. As análises estatísticas foram realizadas com os valores de ΔCt . As sequências específicas dos primers utilizados estão indicadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Sequências de primers usados na análise da expressão dos receptores de S1P.

Alvo	Sequência
S1P1	F: GGCTCTCCGAACGCAACTT R: CAGGCTTTTTGTGTAGCTTTTCC
S1P2	F: CAGGTTGCCAGAAACAGGTA R: CAGGTTGCCAGAAACAGGTA
S1P3	F: AGCGGCACTTGACAATGATCA R: ACATCCCGATCAGGAGGAAGA
S1P4	F: CCCTCTACTCCAAGCGCTACA R: CCATAGAGGCCCATGATGGT
S1P5	F: TGAAGGAGTAGTTCCCGAAGG R: AAGCTTCTATGGCTCCCACCTC
ABL	F: TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT R: GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

4.3 – Ensaios de migração em câmaras Transwell™:

As células foram privadas de SBF por 2 horas, e neste período mantidas em cultura em RPMI puro e a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂. Após a privação de SBF, as células foram centrifugadas por 5 minutos à 400 g. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o pellet de células formado foi ressuspenso em RPMI. As células foram, então, diluídas no corante Azul de Trypan 0,04%, e as células viáveis (apresentam exclusão do corante) foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico de campo claro. Em seguida, 2 X 10⁶ células por poço foram tratadas ou não com 100 µM de W146 (Sigma-Aldrich), um inibidor específico do S1P1, ou com 100 µM de BML-241(Sigma-

Aldrich), inibidor específico do S1P3, por 1 hora a 37 °C. Os tratamentos foram realizados em 100 µL/poço de RPMI-BSA livre de ácidos graxos 0,1%.

Os ensaios funcionais de migração celular em câmaras de transmigração Transwell™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca ou Corning Costar, Cambridge, EUA) foram realizados em insertos com poros de 8 µm que foram previamente tratados com PBS-BSA livre de ácidos graxos 0,1% por 45 minutos à 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para os ensaios de quimiotaxia, 2 X 10⁶ células em 300 µL (inserto da Nunc) do meio de migração (RPMI-BSA livre de ácidos graxos 0,1%) foram adicionados a câmara superior e 500 µL do meio de migração puro ou contendo S1P (1, 10, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000 nM) foram adicionados a câmara inferior. Para os ensaios de fugotaxia ou quimiorrepulsão, 2 X 10⁶ células em 100 µL (inserto Corning Costar) do meio de migração puro ou contendo S1P (10, 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 nM) foram adicionados a câmara superior e 600 µL de meio de migração puro foi adicionado a câmara inferior. Para os ensaios do tipo *checkboxboard*, 2 X 10⁶ células em 100 µL (inserto Corning Costar) do meio de migração puro ou contendo S1P (100 ou 5.000 nM) foram adicionados a câmara superior e 600 µL de meio de migração puro ou contendo S1P (100 ou 5.000 nM) foi adicionado a câmara inferior. A placa foi incubada por 4 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Uma ilustração esquemática das câmaras de migração celular em Transwell™ pode ser observada na figura 4.1.

Ao final da migração, as células encontradas na câmara inferior, foram recolhidas e centrifugadas por 5 minutos à 450 g. Após a centrifugação, parte do sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta e 100 µL do mesmo foi deixado para ressuspender as células. As células foram, então, submetidas a contagem em câmara de Neubauer.



Figura 4.1: Ilustração esquemática das câmaras de migração celular em câmaras Transwell™. (A) A ilustração representa ensaio de quimiotaxia, no qual podemos verificar a presença de células na câmara superior e de S1P na câmara inferior. (B) A ilustração representa ensaio de fugotaxia, no qual podemos verificar a presença de células e S1P na câmara superior e de apenas RPMI-BSA 0,01% na câmara inferior.

Com o intuito de verificar a viabilidade das células que não migraram, em alguns ensaios foi realizada marcação destas células com o Kit I de Anexina-V FITC (Becton Dickinson) para análise da morte celular. As células que não migraram foram recolhidas da câmara superior do inserto Transwell™ e centrifugadas por 5 minutos à 450 *g*. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta. As células foram, então, ressuspensas em 100 µL de tampão anexina 1X e adicionadas diretamente ao tubo de citometria de fluxo. Em seguida, as células foram incubadas com 1 µL de Anexina-V FITC por 10 minutos a temperatura ambiente e protegidas de luz. Após este período adicionou-se 10 µL de iodeto de propídeo (PI) em todos os tubos de citometria de fluxo. As amostras foram imediatamente adquiridas por citometria de fluxo no FACSCanto™II (BD – Becton & Dickenson).

4.4 – Ensaio de migração horizontal em μ -slides:

As células CEM foram privadas de SBF por 2 horas, e neste período mantidas em cultura em RPMI puro e a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida as células foram centrifugadas por 5 minutos à 400 *g*. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em RPMI puro. As células foram, então, diluídas no corante Azul de Trypan 0,04%, e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico de campo claro.

Para os ensaios de migração horizontal foram utilizadas μ -slides I (ibidi, Wisconsin, EUA). Ao canal central foram adicionados 120 µL de RPMI-BSA livre de ácidos graxos 0,1% (meio de migração). Na primeira câmara foram adicionados 2 X 10⁴ células em 400 µL de meio de migração contendo S1P (100 ou 5.000 nM) e na segunda câmara foram adicionados 400 µL de meio de migração puro. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após incubação as células presentes no canal central foram contadas. Uma ilustração esquemática das μ -slides utilizadas nos ensaios de migração horizontal pode ser observada na figura 4.2.

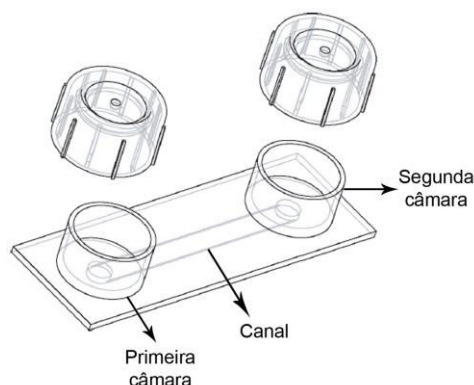


Figura 4.2: Ilustração esquemática da μ -slide de migração horizontal. Na μ -slide é possível observar o canal central, a primeira câmara e a segunda câmara.

4.5 – Estimulação das células:

A célula CEM foi mantida sem soro por 2 horas e posteriormente pré-tratada ou não com W146 (100 μ M) por 1 hora a 37°C. O tratamento com W146 foi realizado em 100 μ L de RPMI-BSA livres de ácidos graxos 0,1% para cada 2×10^6 células. Após o tratamento as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida, 2×10^6 células foram ressuspensas em RPMI-BSA livre de ácidos graxos 0,1% com S1P (10, 100 ou 1.000 nM) para cada ponto da cinética (1 a 60 minutos). O volume final de estímulo foi de 1 mL. Após estímulo as células foram centrifugadas por 3 minutos à 400 g, lavadas com 1 mL de PBS gelado (Sigma-Aldrich) e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta e em seguida foi realizada a extração de proteína.

4.6 – Western -Blot:

A extração de proteína foi realizada em 70 μ L de coquetel de protease de fosfatase (Sigma-Aldrich), com a ajuda de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha, imediatamente após a estimulação das células. A dosagem de proteína total foi realizada em um fluorômetro Qubit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A desnaturação das proteínas (10 μ g/poço) foi realizada a 70°C por 10 minutos. Em seguida as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 4-12% (Bolt 4–12% Bis-Tris Plus Gel – Novex, Carlsbad, EUA) e transferidas para membrana de nitrocelulose no sistema iBlot®1 Dry Blotting (Invitrogen).

As membranas foram bloqueadas em leite desnatado 5% diluído em TBST 1X (solução tampão tris-salina com tween 20) por duas horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram marcadas com anticorpos primários anti-AKT, anti-phospho-AKT, anti-p44/42 MAPK, anti-phospho-p44/42 (1:1.000 – Cell Signaling, Danvers, EUA) ou anti- β -actina (1:10.000 – Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha) diluídos em leite desnatado 2,5% em TBST por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas duas vezes por 10 minutos e duas vezes por 5 minutos em TBST. Anticorpos anti-coelho (Cell Signaling) e anti-camundongo (Southern Biotech, Birmingham, EUA) conjugados a peroxidase (1:1.000) foram utilizados como anticorpos secundários e foram incubados com as membranas por 90 minutos a temperatura ambiente. Assim como os anticorpos primários, os anticorpos secundários foram diluídos em desnatado 2,5% em TBST. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas e incubadas com ECL (*Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection Reagents* – Amersham Buckinghamshire, Reino Unido) por 3 minutos a temperatura ambiente. Após incubação as membranas foram expostas ao filme de raio-X (*Hyperfilm ECL* – Amersham). Quando necessário, ajustes no brilho e no contraste da imagem inteira foram realizadas.

4.7 – Ensaios de ativação de Rac1:

A atividade de Rac-1 foi detectada com o *Rac1 G-LISA Activation Assay Kit* (Cytoskeleton, Inc., Denver, EUA). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante imediatamente após a estimulação das células e todos os tampões utilizados neste protocolo fazem parte deste kit. As células foram lisadas em 100 μ L de tampão de lise gelado (90 μ L de tampão de lise + 10 μ L inibidor de protease) e após este processo 10 μ L do lisado celular foi separado para dosagem de proteína, e o restante foi imediatamente congelado no nitrogênio líquido e mantido em freezer a -70°C até a data do ensaio.

A dosagem de proteína foi realizada numa placa de 96 poços de fundo chato, na qual foram adicionados 10 μ L do lisado proteico e 290 μ L do reagente de detecção de proteínas (*Precision Red Advanced Protein Assay Reagent*). A placa foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e as absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro de placas com filtro de 600 nm.

No dia do ensaio, o lisado proteico foi descongelado em banho maria à temperatura ambiente e, imediatamente após o descongelamento, colocado no gelo. Na placa de 96 poços revestida com a proteína de ligação a RAC-GTP foram adicionados 100 µL de água mili-Q gelada que posteriormente foi completamente removida. Com a placa no gelo, foram adicionados aos poços 50 µL do branco, 50 µL do controle positivo e 25 µg de amostra. O volume final de amostra foi de 50 µL e quando necessário foi adicionado tampão de lise para alcançar o volume necessário. O ensaio foi realizado em duplicata. A placa foi imediatamente incubada por 30 minutos, à 4°C, em um agitador de microplaca a 400 rpm. Após a incubação a solução foi removida dos poços e os mesmos foram lavados duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem. Imediatamente após a lavagem foram adicionados 200 µL do tampão apresentador de antígeno à temperatura ambiente que foi incubado por exatamente dois minutos. A solução foi descartada dos poços e os mesmos foram lavados três vezes com 200 µL do tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 50 µL do anticorpo primário anti-Rac1 (1:50) diluído no tampão de diluição do anticorpo. A placa foi então incubada por 45 minutos, à temperatura ambiente, em um agitador de microplaca a 400 rpm. Após incubação foi descartado o sobrenadante dos poços e os mesmos foram novamente lavados três vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados aos poços 50 µL do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:100) diluído no tampão de diluição do anticorpo e a placa foi incubada por 45 minutos, à temperatura ambiente, em um agitador de microplaca a 400 rpm. A solução foi descartada dos poços e os mesmos foram lavados três vezes com 200 µL do tampão de lavagem. Aos poços foram adicionados 50 µL do reagente de detecção da peroxidase (reagente A + reagente B) que foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL do tampão de parada da peroxidase foram adicionados. O sinal da atividade de Rac-1 foi medido como nível de absorvância utilizando o filtro de 490 nm em um espectrofotômetro de placas. Os valores de densidade ótica obtidos antes da adição do ligante foram arbitrariamente definidos como 100%.

4.8 – Citometria de Fluxo:

Com objetivo de analisar o fenótipo da linhagem EL-4 realizamos marcações por citometria de fluxo para as moléculas S1P1, CD3, CD4, CD8 e TCRβ. Para análise da expressão destas moléculas utilizamos os anticorpos anti-S1P1 (ABR –

Affinity BioReagents), anti-CD3-FITC (eBioscience), anti-CD4-FITC (BD Bioscience), anti-CD8-APC (eBioscience), anti-TCR β -PE (BD Bioscience) e anti-coelho-FITC (Molecular Probes). Como controle foram utilizadas as imunoglobulinas não específicas de rato: IgG2b FITC (BD Bioscience) e APC (eBioscience), e a imunoglobulina não específica de hamster IgG PE (BD Bioscience). Para controle da marcação do S1P1 foi utilizado o próprio anti-S1P1 bloqueado com o seu peptídeo neutralizante (ABR – Affinity BioReagents) que foram previamente incubados por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para a análise da expressão das moléculas CD3, CD4, CD8 e TCR β foram realizados protocolos de marcação extracelular. As linhagens foram retiradas da cultura e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, e o pellet de células formado ressuspense em RPMI 10% de SBF. As células foram então contadas na câmara de Neubauer e 10⁶ células/poço foram adicionadas a uma placa de 96 poços de fundo “U”. Em seguida, foi realizado o bloqueio de receptores Fc expressos na superfície das células com adição de 5 μ L de camundongo por poço. As amostras foram mantidas no gelo e incubadas por 20 minutos. Após esse período, as suspensões celulares foram lavadas com 150 μ L PBS e centrifugadas a 260 g por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi incubado com 10 μ L de cada anticorpo por 30 minutos a 4°C e protegidas da luz. Novamente, após esse período as suspensões celulares foram lavadas com PBS e as amostras foram transferidas para tubos de citometria de fluxo com 200 μ L de PBS com 2% formaldeído para fixação.

Para análise da expressão S1P1 foram realizados protocolos de marcação intracelular com o *Cytofix/CytopermTM Fixation/Permeabilization Kit* (BD Bioscience), pois o anticorpo reconhece a porção intracelular do receptor. Após o bloqueio dos receptores Fc, as suspensões celulares foram lavadas duas vezes com 150 μ L de PBS e centrifugadas 260 g por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi incubado com 100 μ L do tampão Fix/Perm por 20 minutos a 4°C. Ao final da incubação, as suspensões celulares foram lavadas duas vezes com 150 μ L do tampão Perm/Wash 1X, centrifugadas a 260 g por 3 minutos a 4°C e posteriormente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário para S1P1 por 30 minutos a 4°C e protegidas da luz, o qual foi diluído no tampão Perm/Wash 1X. Novamente, após esse período as suspensões celulares foram

lavadas duas vezes tampão Perm/Wash 1X e após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram incubadas com 10 µL do anticorpo secundário anti-coelho-FITC, diluído no tampão Perm/Wash 1X, por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Em seguida as suspensões celulares foram lavadas duas vezes com tampão Perm/Wash 1X. O sobrenadante foi então desprezado e as amostras transferidas para tubos de citometria de fluxo com 200 µL de PBS com 2% formaldeído para fixação.

Até a aquisição no citômetro de fluxo (FACSCanto™ II), as amostras foram armazenadas a 4°C e protegidas da luz. A análise dos dados adquiridos foi realizada através do programa FACSDiva (Becton & Dickinson).

4.9 – Eletroporação celular:

Com intuito de gerar uma célula EL-4-GFP, a linhagem celular EL-4 foi submetida a nucleofecção. As células foram retiradas da cultura e centrifugadas por 5 minutos à 400 g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em RPMI 10% SBF. As células foram contadas na câmara de Neubauer e 10⁶ células foram separadas, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Após a centrifugação todo o PBS foi descartado com auxílio de uma pipeta e as células foram ressuspensas em 100 µL do tampão caseiro 1SM (Chicaybam et al., 2013), com 4 µg do plasmídeo contendo o transposon pT2 e 0,5 µg do plasmídeo a transposase SB100X (gentilmente cedidos pelo Dr. Zilton Vasconcelos – IFF-Fiocruz). Imediatamente após a adição dos plasmídeos as células foram transferidas para uma cubeta estéril e eletroporadas no programa C-009 no dispositivo Nucleofactor™ II (Lonza, Basileia, Suíça). Após a eletroporação, 500 µL de RPMI 10% SBF foram adicionados a cubeta e todo o conteúdo foi transferido para um poço em uma placa de 24 poços já contendo 1 mL de RPMI 10% SBF. A placa foi mantida a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram retiradas da cultura e analisadas por citometria de fluxo para a expressão do GFP no FACSCanto™ II.

4.10 – Análises estatísticas:

A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes t de *student* não pareado, One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Turkey ou Dunnett ou Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni através do software GraphPad Prism 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (* ou #), $p < 0,01$ (** ou ##) ou $p < 0,001$ (***) ou ####).

5. RESULTADOS

Verificamos, anteriormente, que blastos de LLA-T expressam S1P1 e que este receptor está envolvido na migração destas células (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig S1). Com intuito de aprofundar nossos estudos no papel dos receptores de S1P na migração dos blastos de LLA-T, inicialmente, avaliamos a expressão gênica de todos os receptores de S1P nos blastos de LLA-T utilizados neste estudo por RT-PCR quantitativo. Nós detectamos níveis variáveis da expressão de todos os receptores de S1P nas quatro linhagens analisadas. A linhagem HPB-ALL expressa principalmente S1P4 e S1P5, enquanto MOLT-4 apresenta uma expressão mais intensa do S1P1, S1P3 e S1P5. A célula Jurkat expressa preferencialmente S1P1 e S1P3 e, por fim, CEM expressa todos os receptores de S1P com exceção do S1P2 (Fig. 5.1A).

Como a célula HPB-ALL expressa níveis muito baixos de S1P1 e S1P3, nós utilizamos este blasto para normalizar a expressão destes receptores nas demais linhagens celulares de LLA-T. Nós verificamos que a expressão gênica do S1P1 nas células MOLT4, Jurkat e CEM é, respectivamente, 14, 22 e 64 vezes maior que na célula HPB-ALL (Fig. 5.1B); já a expressão gênica de S1P3 é, respectivamente, 372, 965 e 136 vezes maior que no blasto HPB-ALL (Fig. 5.1C).

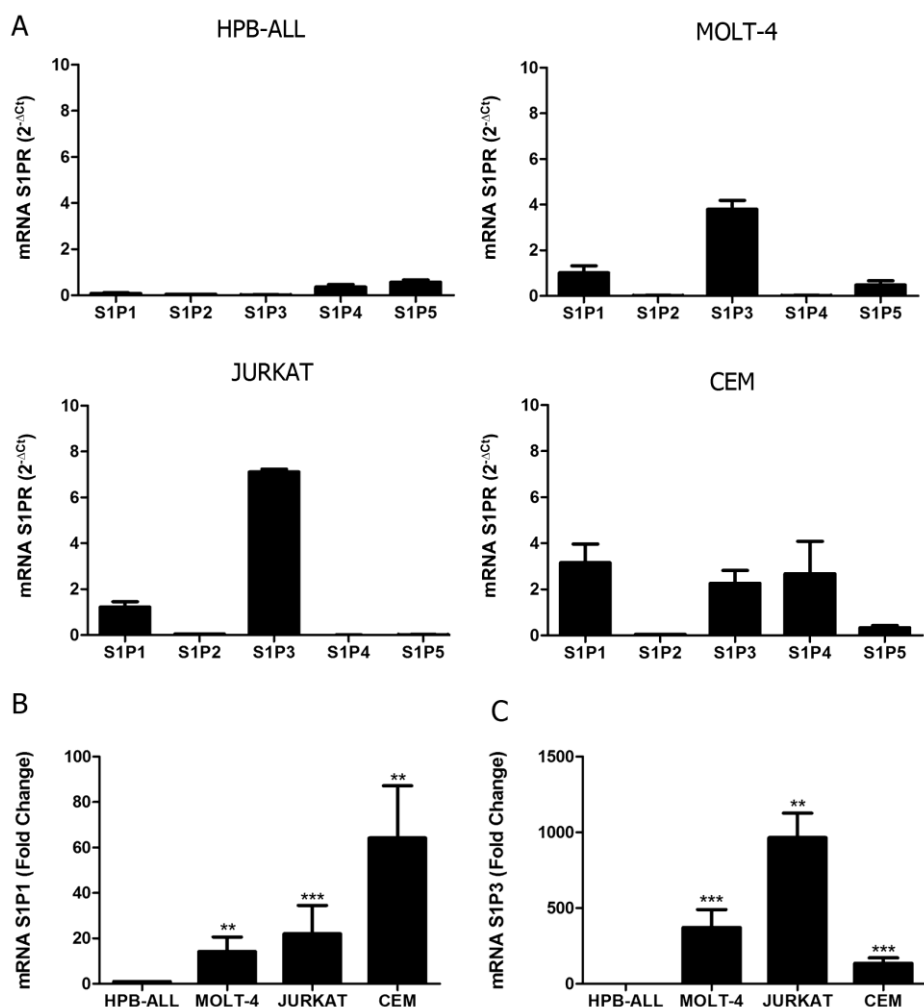


Figura 5.1: Expressão gênica dos receptores de S1P em blastos humanos de LLA-T. (A) Expressão do mRNA dos receptores de S1P foram analisados por PCR quantitativo em tempo real e comparados com o gene controle Abelson ($2^{-\Delta C_t}$) em blastos de LLA-T ($n = 1-2$, com 3-6 replicatas biológicas). (B) Expressão do mRNA do S1P1 ou do (C) S1P3 foram analisados por RT-PCR quantitativo e comparados com o gene controle Abelson. Análises de *Fold Change* foram realizadas com o uso da célula HPB-ALL como calibrador para normalizar a expressão dos receptores de S1P nos demais blastos de LLA-T. Análises estatísticas foram realizadas com os valores de ΔC_t e as diferenças significativas representadas na figura são em relação a célula HPB-ALL. Os resultados estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão, foram analisados pelo teste t de *student* não pareado e as diferenças foram consideradas significativas quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ ($n = 1-2$, com 3-6 replicatas biológicas). Abreviações: S1PR = receptores de S1P.

Nós verificamos, anteriormente, que a célula HPB-ALL, que não expressa o S1P1, não é capaz de migrar frente a S1P em ensaios de quimiotaxia. Todas as demais linhagens utilizadas apresentaram respostas quimiotáticas induzidas por S1P, contudo em diferentes proporções. As células MOLT-4 e Jurkat, que expressam níveis intermediários do S1P1, migram menos que a célula CEM, que expressa mais S1P1 (Fig. 5.2) (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig.

S1). Ao correlacionar a expressão gênica do receptor S1P1 com a resposta migratória quimiotática das linhagens celulares de LLA-T induzidas por 10 nM de S1P, menor dose capaz de induzir a migração destas células, nós verificamos que existe uma relação direta entre ambos (Fig. 5.2).

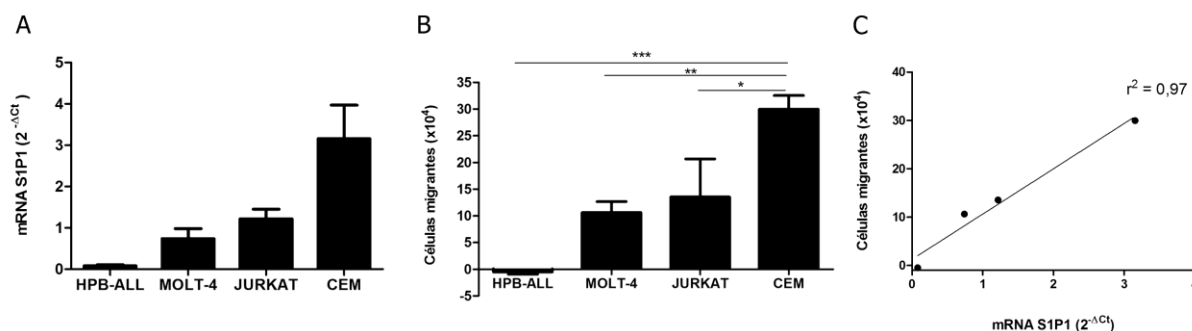


Figura 5.2: Expressão gênica do receptor S1P1 e da migração celular induzida por S1P estão diretamente correlacionados nos blastos de LLA-T. (A) Expressão do mRNA do S1P1 nos blastos de LLA-T. A expressão do mRNA do S1P1 foi analisada por RT-PCR quantitativo e comparado com o gene controle ABL ($2^{-\Delta C_t}$) (n = 1-2, com 3-6 replicatas biológicas). (B) Migração celular quimiotática em câmaras Transwell™ foram analisadas frente a 10 nM de S1P. Os valores correspondem à migração específica após subtração do número de células migrantes obtidos para cada linhagem celular em poços contendo apenas meio de migração. Os resultados estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão (n = 3). (C) Regressão linear da expressão do S1P1 e do número de células migrantes.

Nossos dados anteriores indicam ainda que S1P induz a quimiotaxia dos blastos de LLA-T em diferentes concentrações, gerando uma curva em forma de sino com um aumento da resposta migratória de 1 a 100 nM e uma diminuição de 100 a 500 nM (Fig. 5.3). O pré-tratamento destas células com W146, um inibidor específico do S1P1, inibiu a resposta migratória das mesmas frente a baixas concentrações de S1P (MOLT-4: 10 nM; JURKAT: 1 nM; CEM: 1, 10 e 100 nM), porém induziu a migração frente a concentrações mais elevadas (JURKAT: 100 nM; CEM: 500 e 1.000 nM), nas quais já não se observava uma resposta migratória. No caso das células Jurkat, a migração induzida por elevadas concentrações de S1P, após o bloqueio do receptor S1P1, retorna aos níveis basais, evidenciando uma curva em sino similar à observada quando as células não são tratadas com W146. Esta curva, porém, se encontra deslocada. Um efeito similar foi observado nas células MOLT-4 pré-tratadas com W146, embora a diferença entre a migração das células pré-tratadas e não tratadas não tenha sido considerada estatisticamente significativa. Em contrapartida, no caso da célula CEM, observamos uma curva ascendente (Fig. 5.3) (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 2 e 3 A).

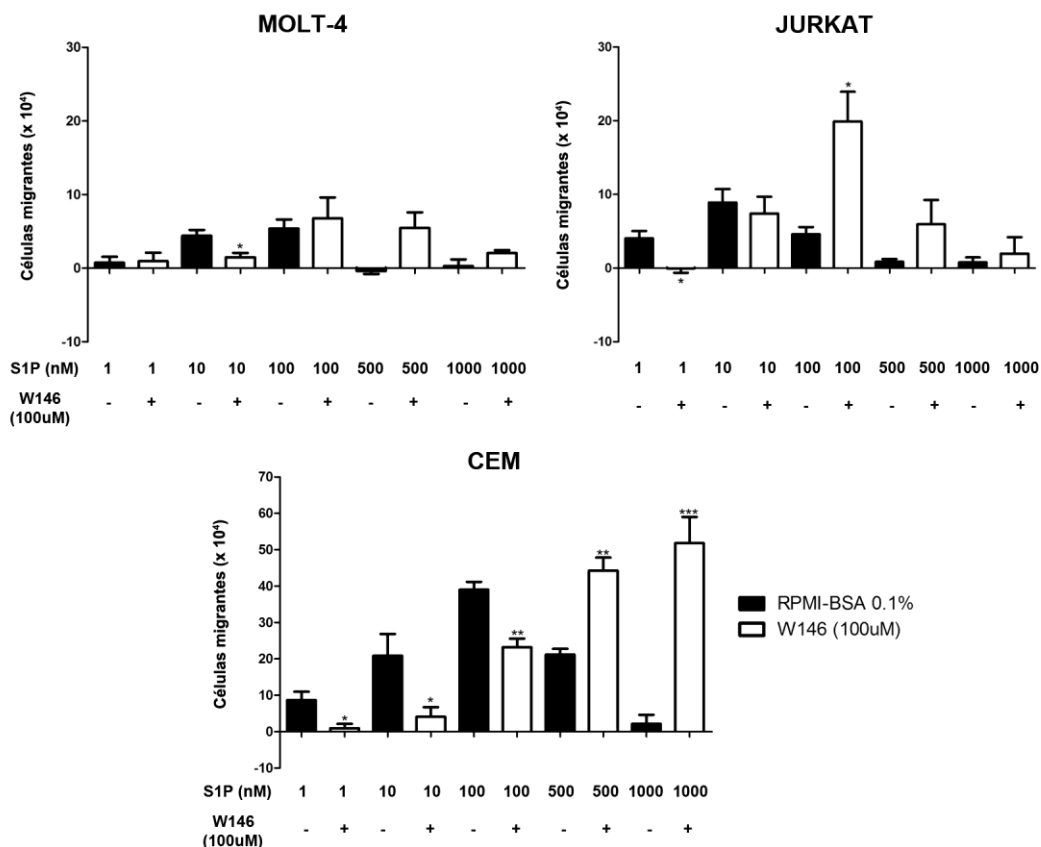


Figura 5.3: Resposta migratória quimiotática das linhagens de LLA-T frente a diferentes concentrações de S1P. Os blastos de LLA-T foram mantidas sem SBF por 2 horas e em seguida foram pré-tratadas ou não com W146 (100 μM). As células foram então aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. Para avaliação da quimiotaxia, S1P foi adicionada a câmara inferior do inserto Transwell™ e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado à câmara superior com a célula. Os valores correspondem a migração específica após subtração do número de células migrantes obtidos em poços com apenas meio de migração. As barras pretas correspondem aos blastos pré-tratados com RPMI-BSA 0,1% e as barras brancas correspondem aos blastos pré-tratados com W146 (100 μM). Os resultados estão representados sob a forma de média ± erro padrão e foram analisados pelo teste t de *student* não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando * p<0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 (n = 3).

Com o intuito de verificar se a célula CEM seria capaz de migrar frente a concentrações ainda mais elevadas de S1P que as utilizadas após o pré-tratamento com W146, nós realizamos ensaios funcionais de migração celular quimiotáticos. Como esperado, a célula CEM foi capaz de migrar frente a 100 nM de S1P, mas não frente a 2.500, 5.000 e 10.000 nM. Já as células CEM pré-tratadas com W146 migraram frente a 2.500 e 5.000 nM, mas não quando exposta a 10.000 nM de S1P, ponto no qual a migração celular retornou aos níveis basais (Fig. 5.4). Estes dados

confirmam que o pré-tratamento dos blastos de LLA-T com W146 causa um deslocamento na curva dose-resposta de S1P.

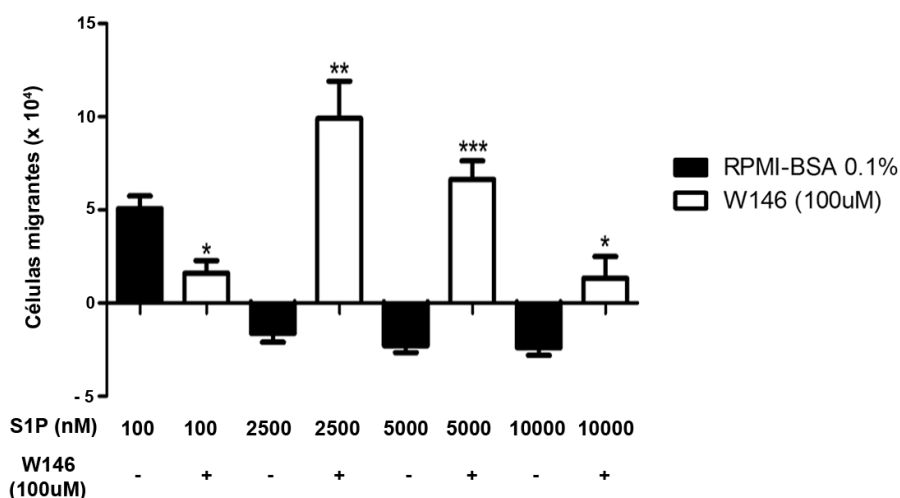


Figura 5.4: Resposta migratória quimiotática da célula CEM frente a elevadas concentrações de S1P. As células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas, e em seguida foram pré-tratadas ou não com W146 (100 µM). As células foram então aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. Para avaliação da quimiotaxia, S1P foi adicionada a câmara inferior do inserto Transwell™ e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado à câmara superior com a célula. Os valores correspondem a migração específica após subtração do número de células migrantes obtidos em poços com apenas meio de migração. As barras pretas correspondem aos blastos pré-tratados com RPMI-BSA 0,1% e as barras brancas correspondem aos blastos pré-tratados com W146 (100 µM). Os resultados estão representados sob a forma de média ± erro padrão e foram analisados pelo teste t de *student* não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando * p < 0,05, ** p < 0,01 ou *** p < 0,001 (n = 3).

Como observamos que altas concentrações de S1P não foram capazes de induzir a quimiotaxia dos blastos de LLA-T, realizamos ensaios de migração celular que abordam o processo de fugotaxia em câmaras Transwell™ com intuito de verificar se estas concentrações eram na verdade repulsivas. Este ensaio foi realizado apenas com a célula CEM, pois, dentre os blastos utilizados, este é o que expressa níveis mais elevados do receptor S1P1. Nós observamos que elevadas concentrações de S1P (1.000, 5.000 e 10.000 nM) foram capazes de induzir a quimiorrepulsão desta célula, enquanto não verificamos esse efeito com concentrações inferiores. A concentração em que verificamos um efeito mais significativo foi a de 5.000 nM (Fig. 5.5A). Este efeito, assim como o efeito quimiotático, se mostrou dependente do S1P1, uma vez que o pré-tratamento das células com W146 inibiu as respostas quimiorrepulsivas. Curiosamente, o pré-

tratamento das células com W146 inibiu também a resposta migratória do controle e de baixas concentrações de S1P (10, 100 e 500 nM) (Fig. 5.5B).

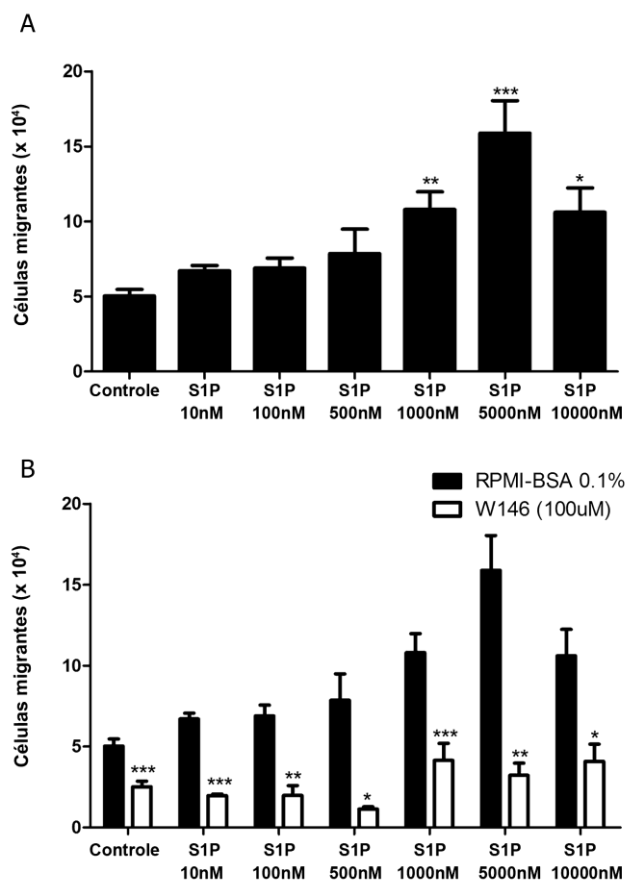


Figura 5.5: Altas concentrações de S1P induzem a fugotaxia das células CEM através da ativação do S1P1 em ensaios de migração em câmaras Transwell™. (A) As células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas, aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. Para avaliação da fugotaxia, a S1P foi adicionada a câmara superior do inserto Transwell™, juntamente, com as células, e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado à câmara inferior. Os resultados foram analisados por One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey (n = 3). (B) As células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas e pré-tratadas ou não com W146 (100 µM). As células foram então aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. Para avaliação da fugotaxia, S1P foi adicionada à câmara superior do inserto Transwell™, juntamente, com as células, e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado à câmara inferior. As barras pretas correspondem a células CEM pré-tratadas com RPMI-BSA 0,1% e as barras brancas correspondem a células CEM pré-tratadas com W146 (100 µM). Os resultados foram analisados pelo teste t de *student* não pareado e estão expressos sob a forma de média ± erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando * p<0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 (n = 3).

Além de ensaios de fugotaxia em câmaras Transwell™, realizamos ensaios de fugotaxia em μ -slides de migração horizontal. Para este ensaio, utilizamos as concentrações de 100 e 5.000 nM de S1P, pois estas são as concentrações ótimas

de quimiotaxia e fugotaxia, respectivamente, observadas em nos ensaios de migração celular em câmara Transwell™. Assim, células CEM foram adicionadas à primeira câmara juntamente com 100 ou 5.000 nM de S1P, enquanto à segunda câmara foi adicionado apenas o meio de migração. Nossos resultados, apesar de não significativos, indicam que 100 nM de S1P não induz a fugotaxia da célula CEM, ao passo que 5.000 nM de S1P parece induzir este efeito (Fig. 5.6).

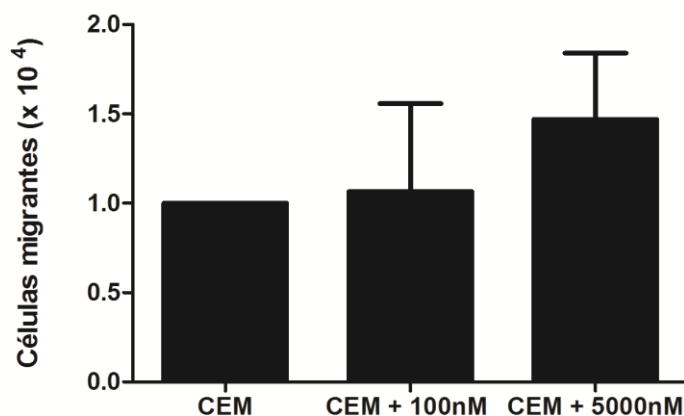


Figura 5.6: Altas concentrações de S1P parecem induzir a fugotaxia das células CEM em μ -slides de migração horizontal. As células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas, aplicadas em câmaras de migração horizontal juntamente com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 1 hora. Para avaliação da fugotaxia, S1P foi adicionada a primeira câmara da μ -slide, juntamente, com as células e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado a segunda câmara. Após a incubação, as células presentes no canal central do μ -slide foram contadas com auxílio de um microscópio invertido. O número de células migrantes presentes no canal central quando CEM foi estimulada com RPMI-BSA 0,1% foi arbitrariamente definido como 1. Os resultados representam média \pm erro padrão, foram analisados pelo One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ ($n = 3-9$).

Para confirmar que diferentes concentrações de S1P são capazes de induzir quimiotaxia e fugotaxia dos blastos de LLA-T e não apenas quimiocinese, migração celular específica e não direcionada, realizamos ensaios do tipo *checkerboard*. Nestes ensaios, a resposta migratória da célula CEM foi comparada entre os poços em que S1P foi adicionado às câmaras superior e inferior do Transwell™ ao mesmo tempo e os poços em que S1P foi adicionado somente à câmara inferior ou superior. Nossos resultados sugerem que baixas concentrações de S1P (100 nM) possivelmente induzem quimiocinese, já que eventos migratórios foram observados quando S1P foi adicionado tanto na câmara superior quanto na câmara inferior. Entretanto, baixas concentrações de S1P induziram também eventos de

quimiotaxia, pois a resposta migratória induzida pela adição de S1P apenas na câmara inferior foi maior que a resposta migratória quando S1P foi adicionado a ambas as câmaras (Fig. 5.7A). Em contraste, a concentração elevada de S1P (5.000 nM) induziu apenas fugotaxia, uma vez que as células migraram quando S1P foi adicionada a câmara superior, mas não quando S1P foi adicionada a câmara inferior e superior ao mesmo tempo (Fig. 5.7B).

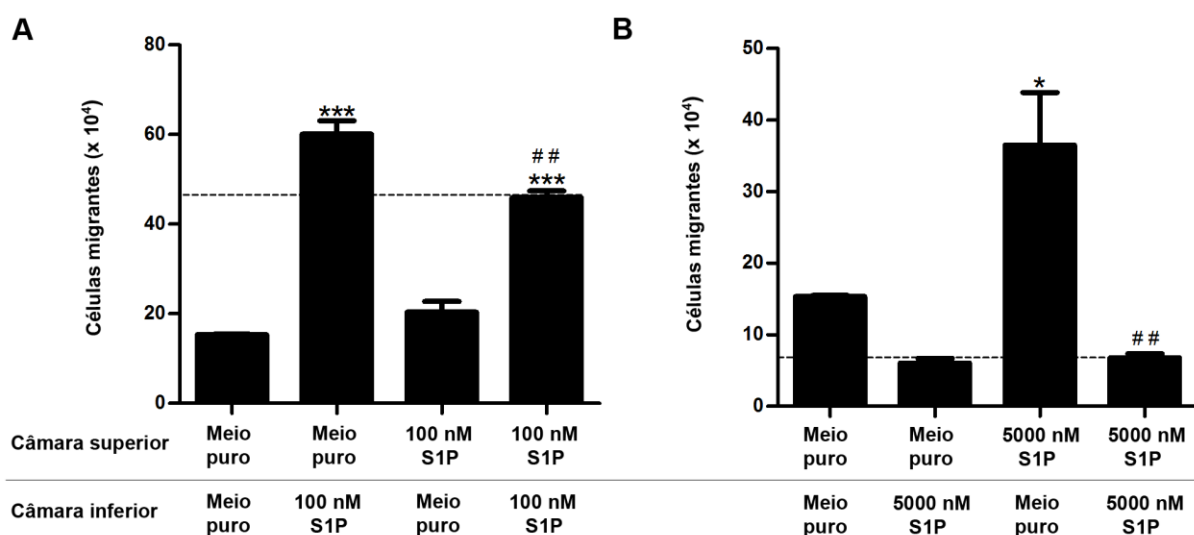


Figura 5.7: Resposta migratória induzida por S1P em ensaios do tipo *checkerboard*. Células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas, aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P, em um formato *checkerboard* e incubadas por 4 horas. (A) S1P 100 nM ou (B) S1P 5.000 nM foram adicionadas a câmara superior e/ou inferior, assim como RPMI-BSA 0,1%. Os resultados estão descritos sob a forma de média ± erro padrão e foram analisados pelo One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey. As diferenças entre poços com meio puro na câmara superior e inferior e poços com S1P na câmara superior e/ou inferior foram consideradas estatisticamente significantes quando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ou *** $p < 0.001$. As diferenças entre poços com S1P na câmara inferior (100 nM) ou superior (5.000 nM) e poços com S1P em ambas as câmaras foram consideradas estatisticamente significantes quando # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ou ### $p < 0,001$ ($n = 3$).

Como citado anteriormente, nossos dados prévios de quimiotaxia mostram que elevadas concentrações de S1P não induzem a migração dos blastos de LLA-T, entretanto, quando estes blastos são pré-tratados com W146, eles adquirem capacidade migratória (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 3). Nós postulamos, então, que outros receptores de S1P poderiam estar sendo ativados e induzindo a quimiotaxia destas células frente a elevadas concentrações de S1P, quando o receptor S1P1 está bloqueado. Além do S1P1, os blastos de LLA-T responsivos a S1P (MOLT-4, Jurkat e CEM) expressam também S1P3 (Fig. 5.1).

Este fato levanta a possibilidade de que S1P3, assim como S1P1, possa estar envolvido nas respostas migratórias destas células.

Para avaliar esta hipótese, nós realizamos ensaios de migração quimiotáticos com a célula CEM, devido a sua elevada expressão do S1P1. Nós observamos que o pré-tratamento destas células com BML-241 (inibidor específico do S1P3) não inibiu a migração celular frente a 10 e 100 nM de S1P (Fig. 5.8A). Neste caso inclusive o número de células migrantes foi bastante similar ao que observamos para células não tratadas. Quando as células foram pré-tratadas ao mesmo com W146 e BML-241 a migração celular foi inibida frente a 10 e 100 nM de S1P e induzida frente a elevadas concentrações de S1P (1.000 nM). Estes dados são similares aos observado quando as células foram tratadas apenas com W146 (Fig. 5.8A), indicando que S1P3 não estaria envolvido na quimiotaxia dos blastos de LLA-T quando S1P1 está inibido.

Como estratégia adicional, utilizamos a linhagem celular SU-DHL-1, estabelecida a partir linfoma anaplásico, que expressa S1P1 e S1P4, mas que não expressa S1P3 (Fig. 5.8B). Ao comparar a expressão dos receptores S1P1 e S1P3 nesta célula com a expressão dos mesmos na célula HPB-ALL verificamos que a SU-DHL-1 expressa níveis bastante elevados de S1P1 e níveis baixos de S1P3 (Fig. 5.8C). Como esperando, as células SU-DHL-1 foram capazes de migrar frente a 100 e 500 nM de S1P, mas não frente a concentrações mais elevadas de S1P (Fig. 5.8D). Além disso, quando as células SU-DHL-1 foram pré-tratadas com W146, a migração celular foi inibida frente a 10 e 100 nM de S1P e estimulada frente a 5.000 e 10.000 nM de S1P (Fig. 5.8E). Como SU-DHL-1 não expressa S1P3 e o seu padrão da resposta migratória é muito similar aos dos blastos de LLA-T, esses dados fortalecem a hipótese de que S1P3 não esteja envolvido na quimiotaxia dos blastos de LLA-T induzida por altas concentrações de S1P quando S1P1 está bloqueado.

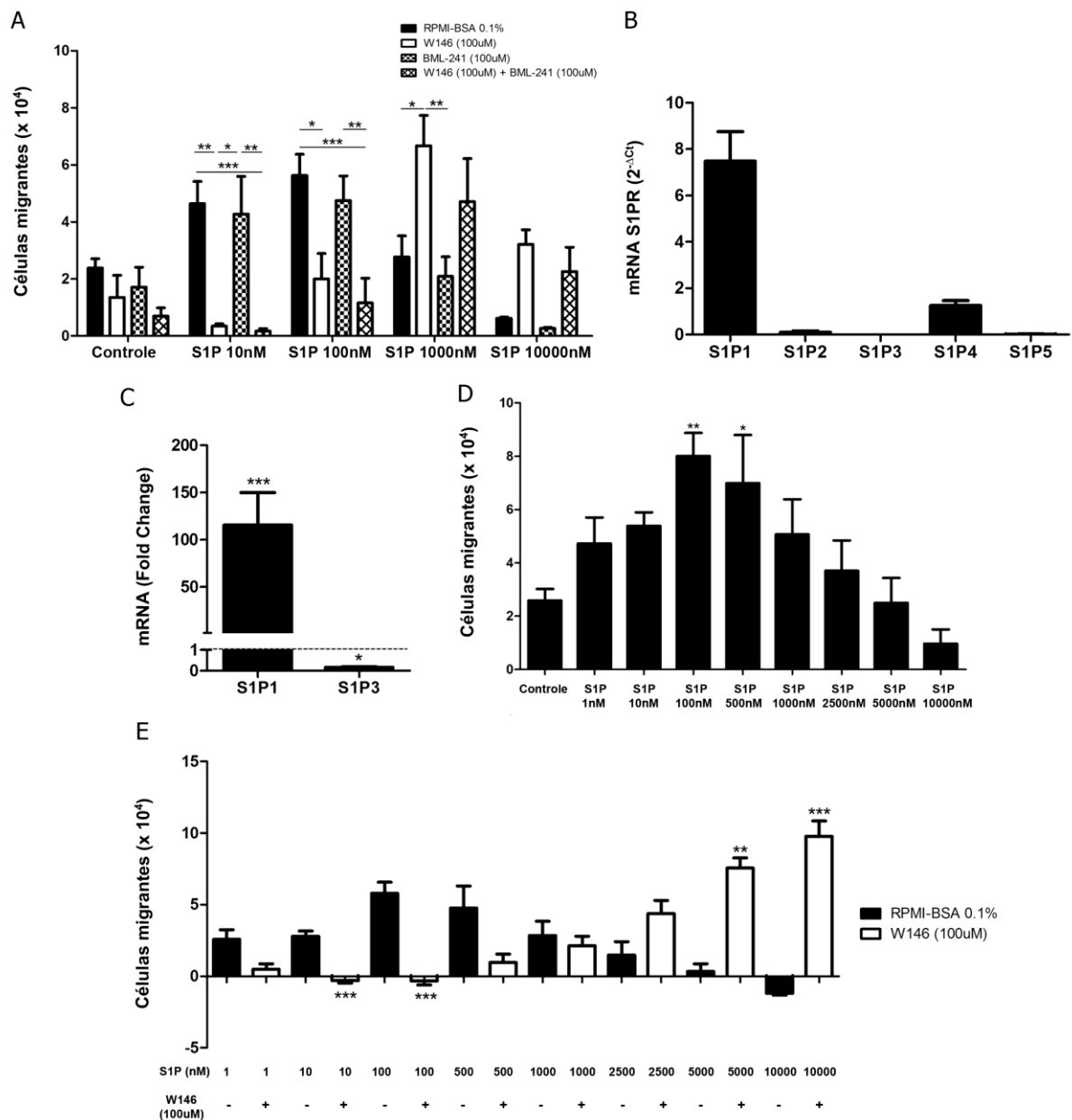


Figura 5.8: S1P3 não parece estar envolvido na migração quimiotática induzida por S1P nas células SU-DHL-1. (A) As células CEM foram mantidas sem SBF por 2 horas, e tratadas ou não com W146 (100 μM) e/ou BML-241 (100 μM). Para avaliação da quimiotaxia, as células foram adicionadas ao inserto Transwell™ contendo diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. S1P foi adicionada a câmara inferior do inserto Transwell™ e apenas RPMI-BSA 0,1% foi adicionado à câmara superior com a célula. As barras pretas correspondem ao pré-tratamento com RPMI-BSA 0,1%; as barras brancas correspondem ao pré-tratamento com W146; as barras quadriculadas correspondem ao pré-tratamento com BML-241; e as barras com losangos correspondem ao pré-tratamento com BML-241 e W146. Os resultados foram analisados pelo Two-way ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni (n = 3). (B) Expressão do mRNA dos receptores de S1P na célula SU-DHL-1 foi analisada por RT-PCR quantitativo e comparada com o gene controle Abelson (2^{-ΔCt}) (n = 4). (C) Análise de *Fold Change* na célula SU-DHL-1 foi realizada com a célula HPB-ALL como calibrador para normalizar a expressão dos genes S1P1 e S1P3. Análises estatísticas foram realizadas com os valores de ΔCt e as diferenças significativas apresentadas estão relacionadas às células HPB-ALL. Os

resultados foram analisados pelo teste t de *student* não pareado (n = 4). (D) As células SU-DHL-1 foram mantidas sem SBF por 2 horas e, em seguida, ensaios de quimiotaxia foram realizados como descrito em A. Os resultados foram analisados pelo One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey (n = 3). (E) As células SU-DHL-1 foram mantidas sem SBF por 2 horas, e tratadas ou não com W146 (100 μ M). Em seguida, ensaios de quimiotaxia foram realizados como descrito em A. Os valores correspondem à migração específica após subtração do número de células migrantes obtidos em poços com apenas meio de migração. As barras pretas correspondem aos blastos pré-tratados com RPMI-BSA 0,1% e as barras brancas correspondem aos blastos pré-tratados com W146 (100 μ M). Os resultados estão representados sob a forma de média \pm erro padrão e foram analisados pelo teste t de *student* não pareado (n = 3). As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando * p<0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001.

Um resumo dos nossos resultados sobre as respostas migratórias dos blastos de LLA-T estão resumidas na figura 5.9.

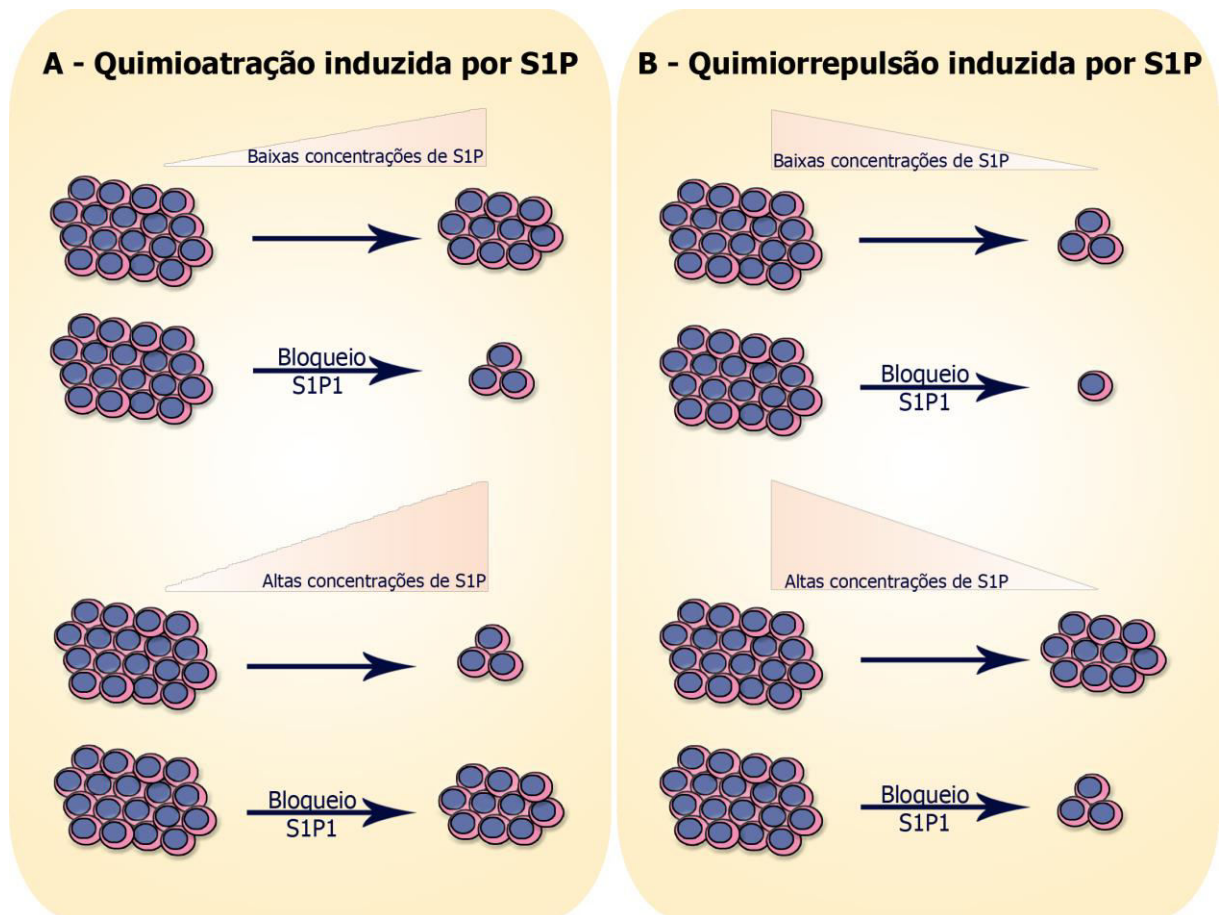


Figura 5.9: Hipótese das respostas migratórias dos progenitores T neoplásicos induzidas por S1P. (A) Quimiotaxia induzida por S1P: blastos de LLA-T que expressam S1P1 migram frente a baixas concentrações de S1P (10-100 nM), e esta migração é inibida pelo bloqueio do S1P1 com W146. Em contraste, os blastos de LLA-T não migram frente a altas concentrações de S1P, a menos que S1P1 esteja bloqueado. (B) Fugotaxia induzida por S1P: blastos de LLA-T que expressam S1P1 não se afastam de baixas concentrações de S1P e a migração não específica é ainda menor quando

S1P é bloqueado com W146. Entretanto, estas células se afastam de altas concentrações de S1P e esta migração é inibida pelo bloqueio do S1P1.

Observamos anteriormente que doses elevadas de S1P, entre 20 e 40 μM são capazes de induzir, *in vitro*, a morte de timócitos de camundongos (dados não publicados). Desta forma, ao final dos ensaios funcionais de migração celular, as células que não migraram quando estimuladas com diferentes concentrações de S1P foram recolhidas para análise da viabilidade celular, que foi realizada por citometria de fluxo após marcação com Anexina-V-FITC e PI. Nossos resultados mostram que a viabilidade das células CEM e SU-DHL-1 se manteve em todas as condições. Assim, nem as diferentes doses de S1P e nem mesmo o pré-tratamento com W146 e/ou BML-241 foram tóxicas para estas células (Fig. 5.10).

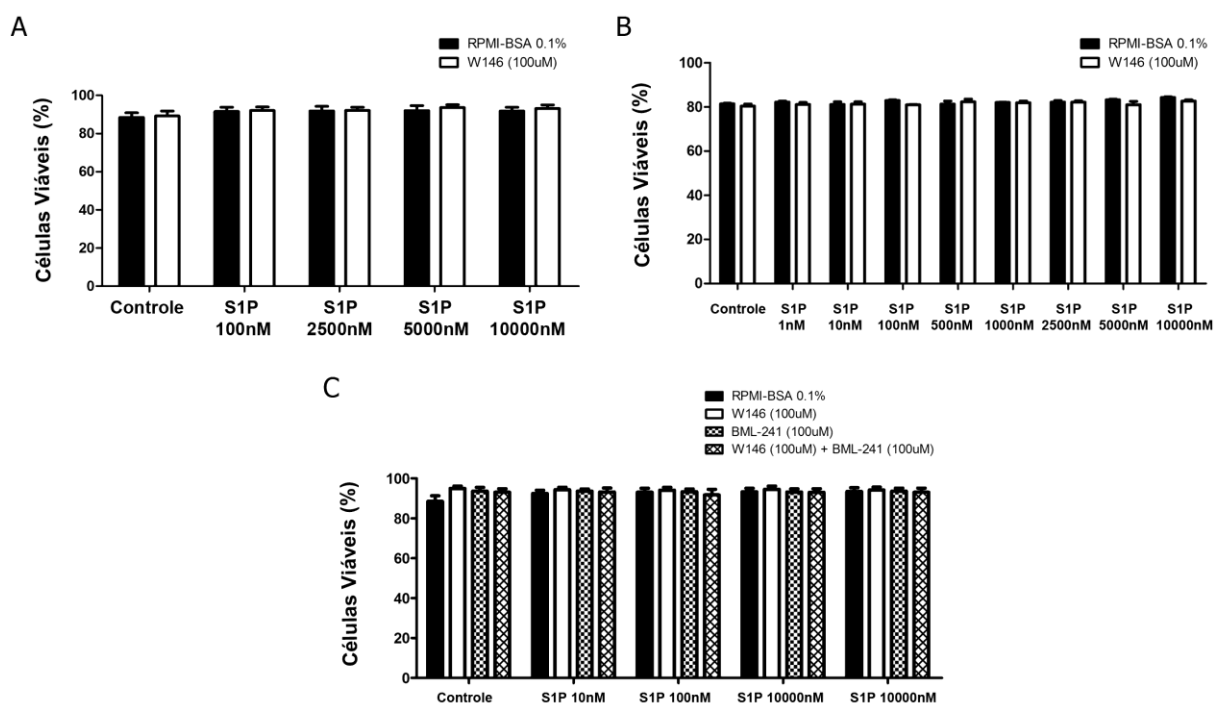


Figura 5.10: Viabilidade das linhagens CEM e SU-DHL-1, pré-tratadas ou não com W146 e/ou BML-241, que não migraram quando estimuladas com diferentes concentrações de S1P. Após ensaios de migração, (A) as células CEM e (B) SU-DHL-1 pré-tratadas ou não com W146 (100 μM), e (C) as células CEM pré-tratadas ou não com W146 (100 μM) e/ou BML-241 (100 μM), que não migraram quando estimulado com diferentes concentrações de S1P foram recolhidas da câmara superior do inserto Tranwell™ e submetidas a marcação com Anexina-V-APC e PI, sendo analisadas por citometria de fluxo. As barras pretas correspondem ao pré-tratamento com RPMI-BSA 0,1%; barras brancas correspondem ao pré-tratamento com W146; barras quadriculadas correspondem ao pré-tratamento com BML-241; e barras com losangos correspondem ao pré-tratamento com BML-241 e W146. Os resultados correspondem aos números relativos (%) de células viáveis (Anexina-V-APC⁻ PI⁻) e estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão e foram analisados pelo One-way ANOVA,

seguido do pós-teste Tukey ou pelo teste t de *student* não pareado (n = 3). As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando * p<0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001.

Nossos resultados prévios mostram que o estímulo da célula CEM com concentrações envolvidas na indução de quimiotaxia induzem a polimerização de actina, evento este inibido após o pré-tratamento das células com W146. Em contrapartida, o estímulo destas células com concentrações envolvidas na indução da fugotaxia não induzem este processo (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 7A). Assim, depois de caracterizar a modulação das respostas migratórias dos blastos de LLA-T, nós examinamos a ativação das proteínas AKT, ERK e Rac1, que estão envolvidas na sinalização induzida pela interação S1P/S1P1 (Rosen e Goetzl, 2005; Cuvillier, 2012) e que poderiam estar induzindo a polimerização de actina mediante a ativação deste eixo. Através de análises por western -blot, verificamos que o estímulo das células CEM com 10 ou 100 nM de S1P, concentrações que induzem quimiotaxia, induz a fosforilação da proteína AKT nos tempos de 5 e 10 minutos. Já, as células estimuladas com 1.000 nM de S1P, concentração que induz fugotaxia, apresentaram uma fosforilação mais tardia nesta proteína (60 minutos). As células pré-tratadas com W146 e estimuladas com 100 e 1.000 nM de S1P não apresentaram fosforilação da proteína AKT (Fig. 5.11A). Uma forte ativação da proteína ERK1/2 foi detectada nas células estimuladas com 10 e 1.000 nM nos tempos de 10 e 60 minutos respectivamente, entretanto, apenas uma fraca ativação foi observada quando as células foram estimuladas com 100 nM de S1P. O pré-tratamento das células CEM com W146 também inibiu a fosforilação de ERK1/2 (Fig. 5.11B). Estes dados sugerem que estas vias podem estar sendo ativadas em eventos migratórios induzidos pelo eixo S1P/S1P1.

Para a análise da atividade da GTPase Rac1 realizamos ensaios de G-LISA e nossos dados mostram que, apesar de um discreto aumento, não houve ativação de Rac1 quando as células CEM foram estimuladas com 10 nM de S1P (Fig 5.11C – painel da esquerda). Curiosamente, uma diminuição da atividade de Rac1 foi observada quando as células foram estimuladas com concentrações elevadas de S1P. Em contraste, as células CEM pré-tratadas com W146 apresentaram um aumento na atividade de Rac1 após estímulo com 1.000 nM de S1P (Fig. 5.11C – painel da direita). Estes dados sugerem que a ativação ou inibição de Rac1 pode estar envolvida em respostas migratórias (quimiotaxia ou fugotaxia) após estímulo

com diferentes doses de S1P e que o receptor S1P1 parece estar envolvido neste processo.

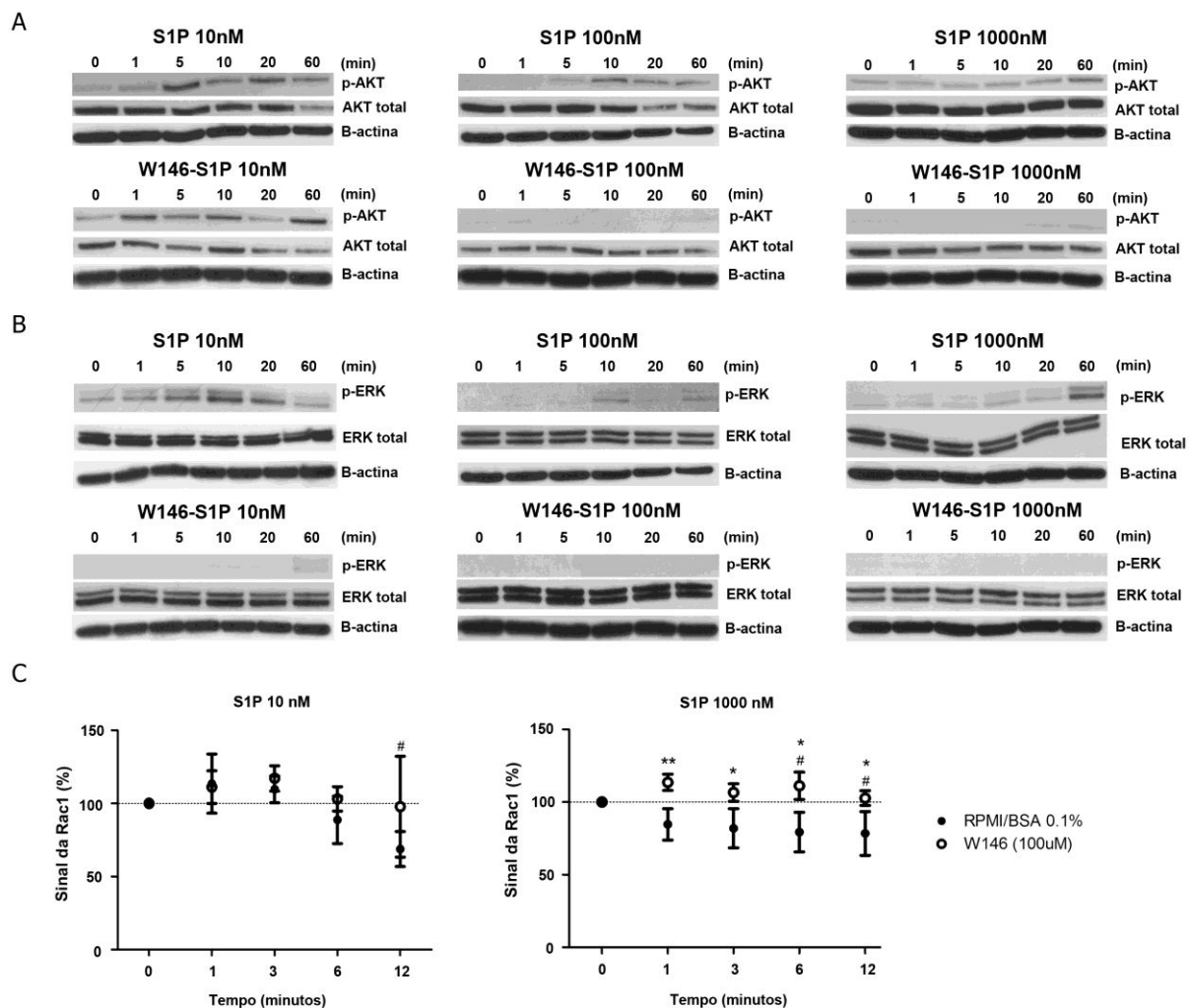


Figura 5.11: S1P modula a atividade de AKT, ERK e Rac1. (A) Imagens representativas da ativação da AKT e (B) ERK1/2 após estimulação das células CEM, pré-tratadas ou não com W146 (100 μ M) com diferentes concentrações de S1P. Extratos proteicos foram analisados por western -blot com anticorpos específicos para AKT, AKT fosforilada, ERK1/2 e ERK1/2 fosforilada (n = 3). (C) Atividade da GTPase Rac1 após estimulação das células CEM, pré-tratadas ou não com W146 (100 μ M), com diferentes concentrações de S1P foi verificada por G-LISA. A densidade óptica (OD) foi detectada a 490 nm. Os resultados estão representados como [(OD após adição do ligante/OD antes da adição do ligante)] X 100. Os valores de OD obtidos antes da adição do ligante foram arbitrariamente definidos como 100% e correspondem ao tempo zero. Os círculos pretos correspondem ao pré-tratamento com RPMI-BSA 0,1% e os círculos brancos correspondem ao pré-tratamento com W146 (100 μ M). Os resultados estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão. As diferenças entre os diferentes pontos da cinética e o controle (tempo zero) foram analisadas pelo One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Dunnett e foram consideradas estatisticamente significantes quando # p<0.05, ## p <0.01 ou ### p <0.001. As diferenças entre o pré-tratamento com RPMI-BSA 0,1% e o pré-tratamento com W146 foram analisados pelo teste t de *student* não pareado e foram consideradas estatisticamente significantes quando * p<0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 (n = 1, com 2 replicatas biológicas).

Com base nos resultados apresentados acima acreditamos que seria de extrema importância o desenvolvimento de um modelo *in vivo* de LLL-T em que pudéssemos analisar as funções dos receptores de S1P, visando futuras estratégias terapêuticas. Nesse sentido, em paralelo a este estudo, iniciamos a padronização de um modelo murino de LLL-T, o qual será realizado em camundongos C57BL/6 através da injeção intravenosa ou intratímica da linhagem celular EL-4 (Licença CEUA IOC – L-046/2015).

Inicialmente, analisamos o fenótipo da célula EL-4, uma vez que julgamos indispensável conhecer as características fenotípicas da linhagem celular que será utilizada no desenvolvimento do modelo *in vivo* de LLL-T. Para isto realizamos, por citometria de fluxo, a marcação das moléculas de superfície celular CD3, CD4, CD8, TCR β . Nossos dados mostram que a linhagem EL-4 não expressa os correceptores CD4 e CD8 e que uma pequena porcentagem expressa CD3 e TCR β (Fig. 5.12).

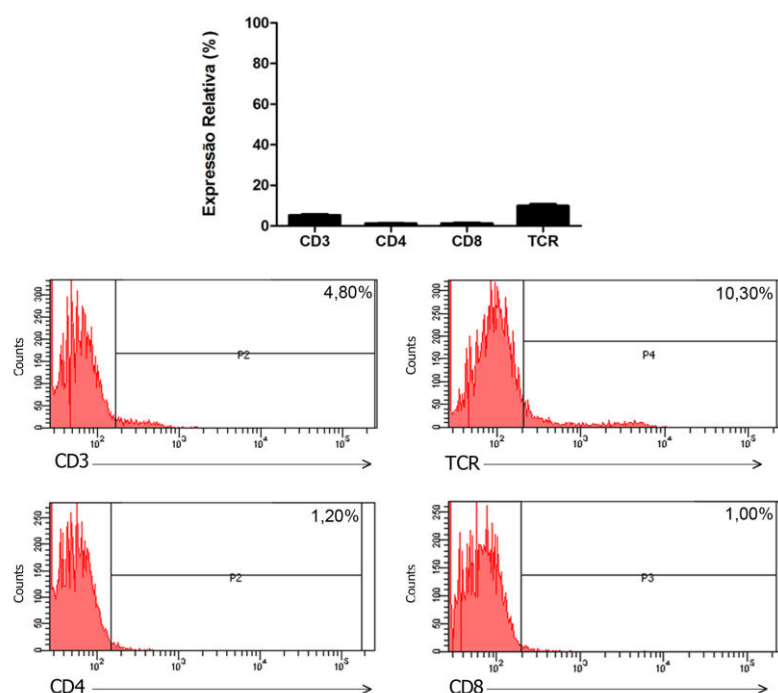


Figura 5.12 – Fenótipo da linhagem celular EL-4. A análise da expressão das moléculas CD3, CD4, CD8 e TCR β foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados correspondem aos números relativos (%) de células positivas para expressão destas moléculas e estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão. Os histogramas são representativos de três experimentos diferentes ($n = 3$).

Anteriormente, verificamos que a linhagem celular EL-4 expressa o S1P1 (dado não publicado). Para confirmar este dado, realizamos, por citometria de fluxo, a marcação do S1P1. Como esperado, verificamos que a célula EL-4 expressa S1P1 e que esta expressão aumenta quando a célula é mantida em cultura na

ausência de SBF por 2 horas. No entanto, observamos uma queda na expressão deste receptor quando as células se encontram em alta confluência (Fig. 5.13A). Além disso, nossos dados indicam que quando a célula EL-4 permanece em cultura por longos períodos de tempo ela perde a expressão do S1P1 (Fig. 5.13B), e esta expressão não é recuperada por ciclos de congelamento e descongelamento (Fig. 5.13C). A análise da expressão gênica do S1P1 e dos demais receptores de S1P nesta célula estão em andamento.

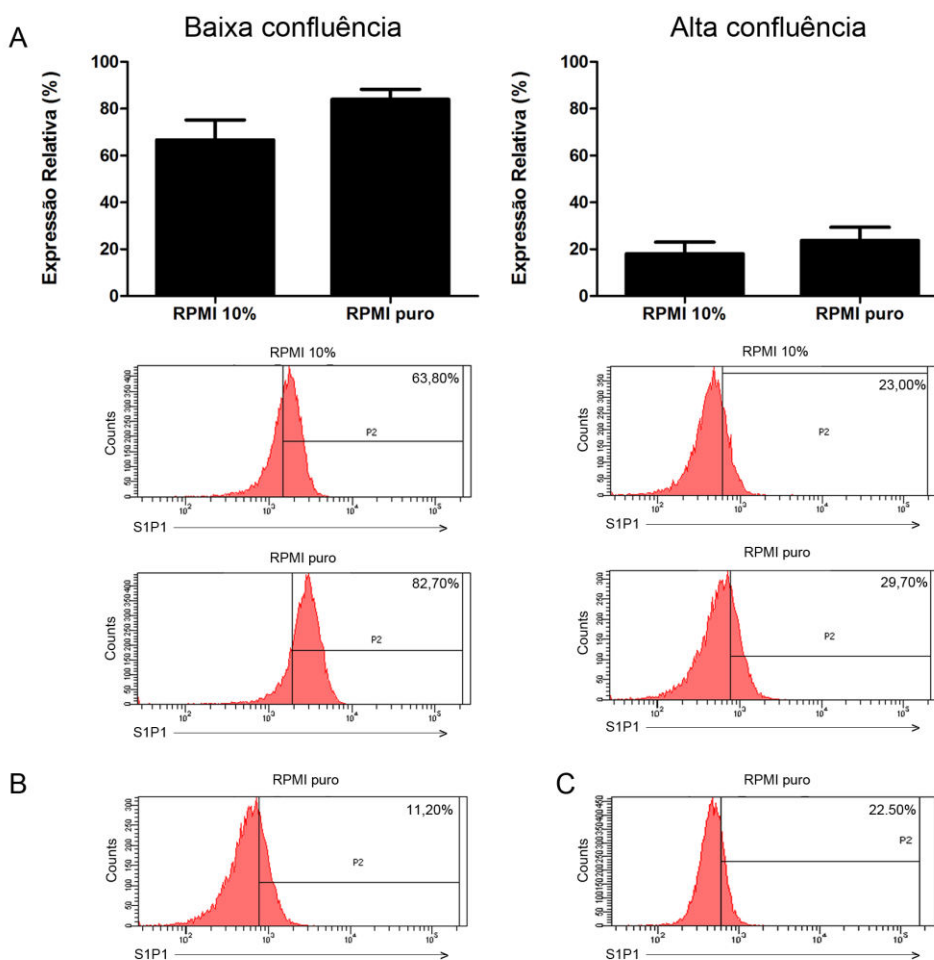


Figura 5.13 – Expressão do S1P1 na linhagem celular EL-4. A análise da expressão do S1P1 na célula EL-4 foi realizada por citometria de fluxo. (A) Expressão do S1P1 em células EL-4 mantidas em baixa ou alta confluência após terem sido privadas ou não de SBF. Os resultados estão expressos sob a forma de média \pm erro padrão e os histogramas são representativos três experimentos diferentes ($n = 3$). (B) Expressão do receptor S1P1 em células EL-4 que permaneceram 3 meses em cultura. As células foram mantidas em baixa confluência e antes da marcação foram privadas de SBF ($n = 1$). (C) Expressão do S1P1 em células EL-4 que permaneceram três meses em cultura e que passaram por posterior ciclo de congelamento e descongelamento. As células foram mantidas em baixa confluência e antes da marcação foram privadas de SBF. Os histogramas são representativos de dois experimentos diferentes ($n = 2$).

Após confirmar a expressão do receptor S1P1 em uma subpopulação da linhagem EL-4, realizamos um ensaio funcional de migração celular quimiotático em câmaras Transwell™. Nossos dados mostram que a linhagem celular EL-4 é capaz de migrar frente à concentração de 10 nM de S1P, enquanto concentrações mais elevadas de S1P falharam em induzir a migração destas células. O pré-tratamento das células com W146 inibe a resposta migratória induzida por 10 nM de S1P, mas estimula a migração frente a 500 e 1.000 nM de S1P (Fig. 5.14). Estes dados estão de acordo com o padrão de resposta migratória induzida por S1P em linhagens celulares humanas de LLA-T (Fig. 5.14) (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 2A).

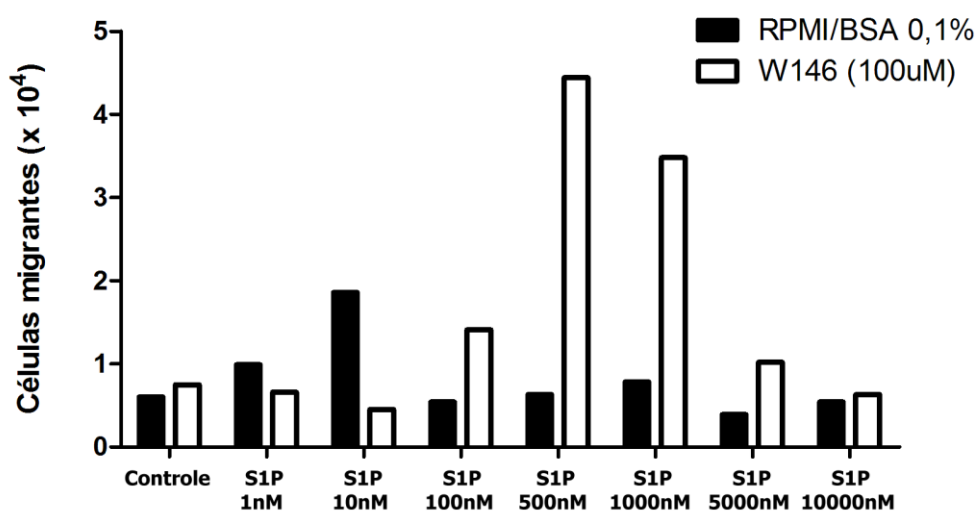


Figura 5.14: S1P induz a migração celular da linhagem celular EL-4. As células EL-4 foram mantidas sem SBF por 2 horas e em seguida foram pré-tratadas ou não com W146 (100 µM). As células foram então aplicadas em câmaras Transwell™ com diferentes concentrações de S1P e incubadas por 4 horas. Para avaliação da quimiotaxia, S1P foi adicionada a câmara inferior do inserto Transwell™ e apenas RPMI-BSA 0,1% com células foi adicionado à câmara superior. As barras pretas correspondem as células pré-tratadas com RPMI-BSA 0,1% e as barras brancas correspondem as células pré-tratadas com W146 (100 µM) (n = 1).

Como a linhagem EL-4 é uma célula murina e será injetada em camundongos C57BL/6, realizamos a eletroporação destas células com plasmídeo contendo transposon pT2-GFP e com plasmídeo contendo a transposase SB100X, para que a mesma possa ser localizada nos órgãos dos animais após a injeção intravenosa ou intratímica. Nossos dados mostram que após a eletroporação ocorre uma intensa morte celular, como esperado, entretanto, 66% das células viáveis expressam GFP

(Fig. 5.15). Este ensaio será repetido para a realização do *sorting* das células EL-4-GFP positivas e posterior expansão celular.

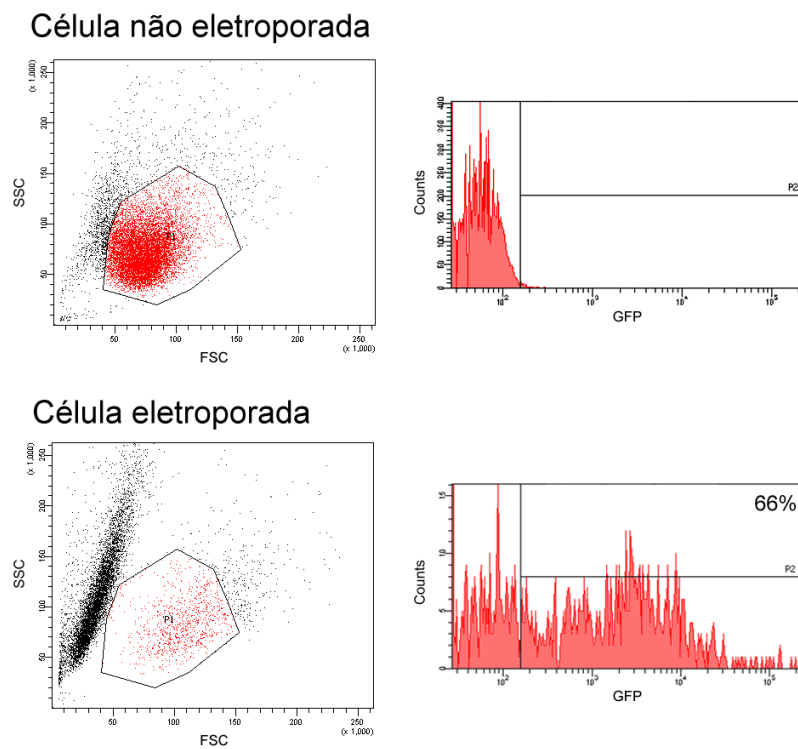


Figura 5.15: Eletroporação da linhagem celular EL-4 com vetor codificando GFP. As células EL-4 foram eletroporadas e, em seguida, mantidas em cultura por 24 horas para análise por citometria de fluxo da expressão do GFP. Os histogramas são representativos de um único experimento (n = 1).

6. DISCUSSÃO

A migração dos progenitores de células T normais e neoplásicos é guiada por diversas moléculas e por seus respectivos receptores, fato este exemplificado pelo modelo de migração multivetorial intratímica proposto por nosso laboratório. Neste modelo, o vetor resultante de migração seria a combinação de diversos vetores independentes que representariam moléculas de ECM e moléculas solúveis como quimiocinas e S1P (Mendes-da-Cruz et al., 2008). Em condições patológicas, a alteração de qualquer um dos vetores independentes pode alterar o vetor resultante e, conseqüentemente, pode modificar a migração e a saída de timócitos do timo.

Nós observamos anteriormente que pacientes com LLA-T e LL-T expressam S1P1 (Mendes-da-Cruz et al., 2014), assim como diferentes linhagens celulares de LLA-T. Estas linhagens são ainda capazes de migrar frente a S1P, e esta migração está diretamente relacionada à expressão do S1P1. Desta forma, quanto maior a expressão do receptor, maior a resposta migratória das células (Messias, 2012). Além disso, os dados aqui apresentados, juntamente com nossos dados prévios acima descritos, sugerem ainda que quanto maior a expressão do S1P1, maior a concentração de S1P necessária para induzir respostas migratórias. Por exemplo: MOLT-4 e Jurkat, que expressam baixos níveis de S1P1, migram frente a 10 nM de S1P; enquanto CEM, que expressa níveis intermediários, migra frente a 100 nM de S1P; ao passo que SU-DHL-1, que é a linhagem utilizada que mais expressa este receptor, migra frente a 100 e 500 nM de S1P. Estes dados sugerem que a migração induzida por S1P é regulada não apenas pelos níveis de expressão do S1P1 mas também pela concentração do seu ligante no microambiente.

Nossos dados prévios mostram que baixas concentrações de S1P são capazes de induzir a quimiotaxia dos blastos de LLA-T, enquanto altas concentrações deste lipídio falham na indução deste processo. Deste modo, a curva dose-resposta induzida por S1P em ensaios de migração celular induzidas por quimiotaxia apresenta uma distribuição em forma de sino (Messias, 2012; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. 2). Este dado nos levou a investigar se altas concentrações de S1P estariam inibindo a migração celular (quimiotaxia) ou se estariam na verdade induzindo a repulsão celular (fugotaxia). De fato, observamos que altas concentrações de S1P são repulsivas para a linhagem celular CEM, e que este processo é dependente do receptor S1P1. A existência de respostas

migratórias quimiorrepulsivas mediadas por elevadas concentrações de S1P foi uma surpresa, já que recentemente verificamos que estas doses não são capazes de induzir a polimerização de actina, um evento crítico do processo de migração celular. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de altas concentrações de S1P induzirem a polimerização de actina mais tardiamente (Messias, 2012; Messias et al., 2016). Curiosamente, não observamos quimiocinese mediada por altas concentrações de S1P, ao passo que baixas concentrações de S1P induziram não apenas quimiotaxia, mas também possivelmente quimiocinese.

Estes dados nos ajudam ainda a entender nossos resultados de fugotaxia em câmaras de migração horizontal e câmaras Transwell™. Apesar de não significativos, o ensaio de fugotaxia em câmaras de migração horizontal indica que altas concentrações de S1P induzem quimiorrepulsão, corroborando os dados dos ensaios de fugotaxia em câmaras Transwell™. Entretanto, observamos um grande desvio no ensaio de fugotaxia em câmaras de migração horizontal quando as células foram estimuladas com baixas concentrações de S1P.

Eventos de quimiotaxia e fugotaxia mediados por diferentes concentrações de uma mesma molécula já foram descritos na literatura, como, por exemplo, para CXCL12 e IL-8 (Poznansky et al., 2002; Vianello et al., 2005; Tharp et al., 2006). Do mesmo modo, a própria S1P foi implicada em eventos de fugotaxia. Altas concentrações de S1P (10^{-6} M) são repulsivas para precursores de osteoclastos, através da ativação do receptor S1P2 (Ishii et al., 2010). Entretanto, efeitos de quimiorrepulsão mediados por S1P nunca foram relacionados ao S1P1. O papel do S1P2 nas respostas migratórias mediadas por S1P não foi analisado neste estudo, pois os blastos de LLA-T utilizados expressam níveis muito reduzidos deste receptor.

A capacidade de altas concentrações de S1P induzirem a fugotaxia da célula CEM através da ativação do S1P1 nos levou a rever alguns dados que observamos anteriormente. O pré-tratamento de blastos de LLA-T com W146 impede a quimiotaxia induzida por S1P em baixas concentrações. Em contrapartida, células pré-tratadas com W146 e estimuladas com elevadas concentrações adquirem a capacidade de migrar em ensaios quimiotáticos (Messias, 2012). Já foi relatado que o pré-tratamento com W146 de células CCL39 (fibroblasto de hamster) que expressam S1P1 resulta no aumento da expressão membranar do S1P1 por inibição da internalização do receptor (Tarrasón et al., 2011). Nesse sentido, em um estudo recente, realizado em linhagens de linfoma de células B, a inibição da endocitose do

receptor CCR7 reverteu para atração a repulsão mediada por elevadas concentrações de CCL19 (Malet-Engra et al., 2015). Assim, a quimioatração observada frente a altas concentrações de S1P após o tratamento dos blastos de LLA-T com W146 pode corresponder a uma modificação da orientação migratória destas células.

Estas repostas migratórias distintas frente a baixas e altas concentrações de S1P ajudam ainda a elucidar dados prévios da literatura. Através de um modelo experimental de LLL-T em *zebrafish*, Feng e colaboradores (2010) verificaram que o tratamento com W146 inibe a geração de aglomerados de células tumorais e induz a disseminação dos blastos (Feng et al., 2010). Além dos fatos discutidos acima, isto pode estar ocorrendo devido a uma quebra no gradiente de S1P, ocasionada por um aumento das concentrações de S1P na corrente sanguínea ou no microambiente. Estudos mostrando alterações nos níveis fisiológicos de S1P já foram descritos na literatura (Sattler et al., 2010; Nunes et al., 2012). No entanto, não podemos descartar a hipótese de estar ocorrendo quimiocinese. Ao mesmo tempo, um aumento nos níveis de S1P no microambiente tumoral poderia também induzir a disseminação dos blastos de LLL-T, uma vez que observamos que altas concentrações de S1P induzem fugotaxia. Assim, seria interessante dosar os níveis de S1P na corrente sanguínea e no microambiente tumoral *in vivo*.

O aumento na expressão de SPHK1 foi descrito para leucemias e linfomas, sugerindo que estes blastos poderiam aumentar a produção de S1P. Tecidos de pacientes com linfoma do tipo não Hodgkin's apresentam um aumento na expressão gênica e proteica de SPHK1 quando comparado a tecidos de pacientes com hiperplasia linfóide reacional (Bayerl et al., 2008). Já pró-eritroblastos neoplásicos apresentam um aumento na expressão gênica da SPHK1 quando comparados a pró-eritroblastos normais em um modelo murino transgênico de eritroleucemia (Le Scolan et al., 2005).

Ainda relacionado a uma possível alteração no gradiente de S1P, seria interessante analisar, no microambiente tumoral, a expressão das enzimas responsáveis pela degradação e pela manutenção dos baixos níveis deste lipídio nos órgãos linfóides. Como todas as células são capazes de produzir S1P através do metabolismo dos esfingolipídios, a S1P metabólica deve ser degradada antes que se acumule no espaço intersticial. Além disso, a S1P proveniente do plasma, que constantemente banha o tecido, também deve ser destruída. Nesse sentido, seis enzimas são capazes de degradar a S1P *in vitro*. Três das seis enzimas fazem

parte do metabolismo dos esfingolipídios e são a esfingosina liase e as esfingosina fosfatases 1 e 2. Estas enzimas são altamente específicas para a degradação de S1P (Bréart et al., 2011), sendo a esfingosina liase necessária para a manutenção das baixas concentrações de S1P nos órgãos linfoides (Schwab et al., 2005). As outras enzimas consistem de três fosfatases, as lipídio-fosfato fosfatases 1, 2 e 3 (LPP1-3), as quais são capazes de desfosforilar diversos substratos, incluindo o ácido lisofosfatídico, o ácido fosfatídico, a ceramida-1-fosfato e a S1P. Estas fosfatases estão localizadas na membrana plasmática com seu sítio ativo voltado para a região extracelular, bem posicionadas para degradar lipídios extracelulares derivados de células residentes do tecido ou que entram no tecido através da corrente sanguínea (Pyne et al., 2004; Bréart et al., 2011). Evidências indicam que a lipídio-fosfato fosfatase 3 é essencial para a manutenção dos baixos níveis de S1P no timo. A perda da expressão desta enzima em células epiteliais ou endoteliais é suficiente para impedir a saída de células T maduras do timo (Bréart et al., 2011).

Atualmente, diversos estudos envolvendo células neoplásicas buscam entender as vias de sinalização envolvidas nos processos de migração celular, visto que a motilidade celular está diretamente relacionada com a capacidade invasiva e metastática das células (Di et al., 2015; He et al., 2015; Lee et al., 2015). Ao mesmo tempo, inibidores de vias de sinalização específicas vêm sendo amplamente testados para o tratamento de diversas neoplasias. Neste contexto, analisamos possíveis vias de sinalização ativadas pela interação S1P/S1P1 nos blastos de LLA-T como AKT, ERK e RAC1 (Rosen e Goetzl, 2005; Cuvillier, 2012).

A ativação de AKT e ERK foi implicada na sobrevivência e proliferação celular, respectivamente. AKT aumenta a sobrevivência de linfócitos e de outras células do sistema imune ao inibir o processo de apoptose, enquanto ERK modula a proliferação destas células (Rosen e Goetzl, 2005). Em contrapartida, foi demonstrado o envolvimento de ERK1/2 na migração das células DU145, uma linhagem celular de câncer de próstata (Sekine et al., 2011). Entretanto, Li e colaboradores (2009) verificaram que a ativação de ERK não está envolvida na migração das células WiT49 (linhagem celular de tumor de Wilm's) estimulada por S1P (Li et al., 2009). Nossos dados mostram que baixas e altas concentrações de S1P induzem a fosforilação de AKT e ERK1/2, e que o receptor S1P1 está envolvido na ativação de ambas as vias de sinalização. Células CEM pré-tratadas com W146 não apresentam fosforilação da proteína ERK1/2 quando estimuladas com S1P ao passo que a inibição da fosforilação da AKT é observada somente quando as

células são estimuladas com 100 e 1.000 nM de S1P. Além disso, quando as células CEM foram estimuladas com altas concentrações de S1P, a fosforilação de AKT e ERK1/2 ocorreu mais tardiamente (60 minutos) do que em células estimuladas com baixas concentrações de S1P (5-10 minutos). Estes dados corroboram a nossa hipótese de que a polimerização de actina induzida por altas doses de S1P possa estar ocorrendo mais tardiamente. É importante destacar que as concentrações de S1P utilizadas neste estudo não alteraram a sobrevivência (em até 48 horas) e a proliferação (em até 72 horas) celulares (dados não publicados; Messias et al., 2016 - Anexo 2 - Fig. S2).

A ativação da GTPase Rac é importante para a interação célula-célula e para a migração linfocitária (McVerry e Garcia, 2005; Rosen e Goetzl, 2005; Matsuyuki et al., 2006). Entretanto, para a nossa surpresa, quando a célula CEM foi estimulada com 10 nM de S1P, observamos um discreto, mas não significativo, aumento na atividade desta GTPase. Verificamos que baixas doses de S1P são capazes de estimular a quimiotaxia destas células, porém a sua concentração ótima de migração é 100 nM de S1P. Desta forma, seria interessante e necessário analisarmos a atividade de Rac1 após estímulo com a concentração de 100 nM de S1P antes de descartamos o envolvimento desta proteína em eventos de quimiotaxia.

Já a modulação da atividade de Rac1 mediada por altas doses de S1P pode estar relacionada às respostas migratórias observadas nestas mesmas condições. Células CEM não migram frente a altas concentrações de S1P, quando observamos uma diminuição na atividade de Rac1. Já as células CEM pré-tratadas com W146 migram expressivamente frente a altas concentrações de S1P, quando a atividade de Rac1 aumenta. Dados da literatura mostram que a ativação das pequenas GTPases Rac e Rho é dependente da concentração de S1P. Em células endoteliais de artéria pulmonar, 500 nM de S1P induz a ativação de Rac1, enquanto 5 μ M leva a ativação de Rho e a uma diminuição da atividade de Rac (Shikata et al., 2003). A indução de diferentes vias de sinalização foi também descrita para as interações mediadas por CXCL12/CXCR4. O tratamento de células T com anti-CXCR4, toxina pertussis e *Wortmannin* (inibidor da PI3K) previnem a quimiotaxia e a fugotaxia induzida por CXCL12. Em contraste, o tratamento destas células com inibidores das tirosina quinases (genisteína e herbimicina) previnem apenas a migração quimiotática (Poznansky et al., 2000). Além disso, diferentes níveis de AMP cíclico e de cálcio podem determinar a atração ou a repulsão de axônios (Forbes et al.,

2012). Juntos, estes resultados indicam que eventos de quimiotaxia e fugotaxia podem ativar diferentes vias de sinalização. Entretanto, para se confirmar o envolvimento das vias de sinalização analisadas nos processos de quimiotaxia e fugotaxia se faz necessário a realização de ensaios de migração celular com o uso de inibidores específicos.

Além disso, como a polimerização de actina e a ativação de Rac não foram observadas quando as células CEM foram estimuladas com concentrações de S1P implicadas no processo de fugotaxia, outros mecanismos de migração celular independentes da modulação do citoesqueleto de actina podem estar ocorrendo, como “blebs” de membrana. “Blebs” são protruções celulares envolvidas na migração celular durante o desenvolvimento e em casos patológicos. As protruções do tipo “blebs” são coordenadas pela pressão hidrostática gerada no citoplasma que aparece como uma expansão esférica na membrana celular (Paluch e Raz, 2013). No entanto, para verificar esta hipótese outras vias de sinalização envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina devem ser investigadas, incluindo as vias das GTPases Cdc42 e Rho (Rottner e Stradal, 2011; Hanna e El-Sibai, 2013). Do mesmo modo, a análise das modificações morfológicas observadas durante a migração celular induzida por concentrações de S1P relacionadas à quimiotaxia e à quimiorrepulsão se faz necessária.

Como citado anteriormente, as vias de sinalização envolvidas na migração celular induzida por S1P estão não só envolvidas em eventos de migração celular como também em outros processos essenciais para o desenvolvimento de células T normais e neoplásicas, como proliferação e sobrevivência celular (Pyne et al., 2015). Isto reforça o fato de que as interações mediadas por S1P podem ser potenciais alvos terapêuticos nos casos de LLL-T. Deste modo, as enzimas envolvidas na síntese e degradação deste lipídio vem sendo amplamente estudadas, assim como os receptores de S1P. Por exemplo, SKI, um inibidor das SPHK1/SPHK2, reduz os níveis de AKT e ERK fosforiladas e induz a morte por apoptose de linhagens celulares e de células primárias de pacientes com LLA-T, embora algumas subpopulações sejam resistentes à morte. Outro inibidor seletivo da SPHK2 (ROME) não altera estas vias de sinalização, mas induz autofagia destas mesmas células (Evangelisti et al., 2014). Dados recentes mostram ainda que SKI II, um inibidor específico da SPHK1, inibe a proliferação de células HepG2, uma linhagem celular de hepatoma (Liu et al., 2016). Neste contexto, podemos imaginar que a produção de S1P mediada pelas SPHK1 e 2 promove não apenas a sobrevivência e

proliferação celular, através de diferentes vias de sinalização celular, mas também a quimiotaxia ou fugotaxia dos blastos de LLA-T, dependendo da sua concentração no microambiente. Vale ressaltar que a adição de S1P na cultura da célula CEM, mesmo em concentrações micromolares, não alterou as taxas de sobrevivência e proliferação celular (dados não publicados), porém induziu uma migração celular direcionada que é dependente da concentração.

O uso de inibidores dos receptores de S1P vem sendo estudado *in vivo* e um deles, o FTY720, já se encontra disponível na clínica. FTY720 ou fingolimode é um composto sintético modificado a partir de um imunossupressor natural extraído de fungos ascomicetos (Chiba, 2005). FTY720 é fosforilado *in vivo* pela SPHK-2, gerando o metabólito ativo FTY720-P, o qual é um potente agonista dos receptores S1P1, S1P3, S1P4 e S1P5. A ação imunomoduladora deste composto resulta na inibição da saída de células T dos órgãos linfoides secundários. A interação S1P/S1P1 induz a internalização do receptor e o seu retorno para a membrana plasmática, enquanto a interação FTY720/S1P1 induz a internalização do receptor e a degradação do mesmo (Oo et al., 2007). Desta forma, o uso do FTY720 a curto prazo induz um efeito agonista, enquanto a longo prazo induz um efeito antagonista. Atualmente, o FTY720 (comercializado com o nome fantasia Gilenya®) vem sendo utilizado na clínica para o tratamento oral da esclerose múltipla desde sua liberação pela FDA (*Food and Drug Administration*) em setembro de 2010. Seu mecanismo de ação consiste de efeitos no sistema imunológico e sistema nervoso central. No sistema imunológico, o FTY720 impede a saída de células T *naive* e de memória central dos órgãos linfoides secundários, impedindo o acúmulo de células Th17 no sistema nervoso central. Ao mesmo tempo, FTY720 permite a manutenção da vigilância imunológica, pois não afeta a saída de células de memória efetora dos órgãos linfoides secundários (Chun e Brinkmann, 2011). Já o uso do W146 *in vivo* foi testado em camundongos, entretanto a sua injeção intraperitoneal causou uma linfopenia de curta duração que foi revertida dentro 4 horas (Tarrasón et al., 2011).

Além disso, Liu e colaboradores (2008) verificaram ainda que doses elevadas de FTY720 (μM) se mostram tóxicas para linhagens de leucemia/linfoma de Burkitt e leucemia linfoblástica aguda B, e para células de pacientes com leucemia linfocítica crônica B, ao diminuir o número de células viáveis das mesmas em cultura (Liu et al., 2008). Nós observamos anteriormente que concentrações elevadas de FTY720 (20 e $40\mu\text{M}$) induzem a morte da linhagem EL-4 (linfoma de células T de

camundongo). Além disso, doses elevadas de FTY720 (2,5, 5, 10, 20 e 40 μ M) e S1P (20 e 40 μ M) são também capazes de induzir, *in vitro*, a morte de timócitos de camundongo (dados não publicados). Vale destacar que, neste estudo, não verificamos nenhuma alteração na viabilidade das linhagens celulares utilizadas após a migração, nas células previamente tratadas ou não com W146 e/ou BML-241.

É interessante ressaltar ainda que os diferentes processos de migração celular induzidos por S1P podem ser regulados não apenas por moléculas envolvidas no seu metabolismo, por seus receptores e por seus respectivos inibidores, mas também por outras moléculas presentes no microambiente. Por exemplo, como citamos na introdução, nós observamos que células de pacientes de LLA-T expressam menos neuropilina-2 e semaforina-3F do que células de pacientes com LL-T. Células de pacientes com LLA-T são capazes de migrar frente a S1P e esta migração é inibida por semaforina-3F, assim como a migração induzida por CXCL12 (Mendes-da-Cruz et al., 2014 - Anexo 1). Células de pacientes de LLA-T foram também capazes de migrar frente a FTY20, e a semaforina-3F foi também capaz de inibir esta migração. O mesmo foi observado para semaforina-3A e seu receptor, a neuropilina-1. Recentemente, realizamos ensaios de migração celular induzidos pro quimiotaxia com os diferentes blastos de LLA-T usados neste estudo (MOLT-4, Jurkat e CEM), entretanto a semaforina-3F não foi capaz de inibir a migração induzida por S1P. Posteriormente, verificamos que estas células não apresentam mRNA para neuropilina-2, receptor da semaforina-3F, elucidando assim o fato de esta molécula não ter sido capaz de inibir a migração induzida por S1P. O mesmo foi observado para as células SU-DHL-1 (dados não publicados).

Com base nos dados acima descritos, acreditamos que seja essencial o desenvolvimento de um modelo *in vivo* de LLL-T, no qual possamos avaliar as funções dos receptores de S1P, visando futuras estratégias terapêuticas. Estas estratégias envolvem o tratamento de animais com inibidores dos receptores de S1P e das vias de sinalização envolvidas no processo de migração celular induzido por S1P. Nesse sentido, pretendemos gerar um modelo de LLL-T em camundongos C57BL/6 através da injeção intravenosa ou intratímica de células de linfoma murino EL-4. Modelos animais de LLL-T induzidos em camundongos C57BL/6 através da injeção da linhagem celular EL-4 já foram descritos na literatura (Vallera et al., 1993; Ehrke et al., 1998).

Dados da literatura mostram que a linhagem EL-4 original expressa CD3, mas não expressa os correceptores CD4 e CD8. Além de expressar a molécula CD3, subclones da célula EL-4 original modulam a expressão de CD8 de acordo com a confluência da cultura e 60-70% das células EL-4 mantidas *in vivo* expressam o correceptor CD4. Estes dados sugerem que a célula EL-4 seria uma célula T madura que perdeu a expressão dos correceptores CD4 e CD8 (Melchers et al., 1989). Entretanto, Logan e colaboradores mostraram que uma pequena população da célula EL-4 (8%) expressa a molécula CD4 *in vitro* (Logan et al., 2004)(Logan et al., 2004). Nossos dados mostram que a célula EL-4 que possuímos em nosso laboratório não expressa CD4 e CD8 e apenas uma pequena subpopulação expressa CD3 e TCR β . Assim, acreditamos que esta linhagem possa ter perdido ou module a expressão da molécula CD3.

Observamos ainda que uma subpopulação linhagem celular EL-4 expressa o S1P1 e dados preliminares indicam que esta célula expressa o S1P1 e migra frente a S1P. Desta forma, acreditamos que a célula EL-4 possa ser utilizada no desenvolvimento do modelo *in vivo* de LLL-T. Entretanto, como o nível de expressão do S1P1 varia bastante nesta célula, resolvemos realizar a manipulação genética da mesma com intuito de estabilizar a expressão deste receptor. Assim, além de gerar células EL-4-GFP, geraremos células EL-4-GFP que superexpresssem o receptor S1P1 para o desenvolvimento do modelo. Além disso, a análise da expressão gênica dos demais receptores de S1P nesta célula já esta em andamento. É interessante ressaltar que o desenvolvimento do modelo murino de LLL-T será grande importância não apenas para o desenvolvimento deste projeto, mas para o laboratório como um todo, uma vez que o papel de outras moléculas que podem estar regulando o padrão migratório dos blastos de LLL-T poderá também ser estudado *in vivo*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, nossos resultados ajudam a elucidar a dinâmica de migração dos blastos de LLL-T que, aparentemente, ocorre por quimiotaxia e fugotaxia. Ao que tudo indica, esses mecanismos são dependentes da expressão do S1P e dos níveis de S1P, além de, possivelmente, ativarem diferentes vias de sinalização (Fig. 7.1). Desta forma, os dados aqui apresentados podem beneficiar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas usando inibidores de S1P e S1P1. Considerando a grande gama de processos celulares mediados pela interação S1P/S1P1, as estratégias incluem indução de morte celular, diminuição da proliferação e prevenção da disseminação dos blastos de LLL-T que pode ser resultante da quimiotaxia ou da fugotaxia.

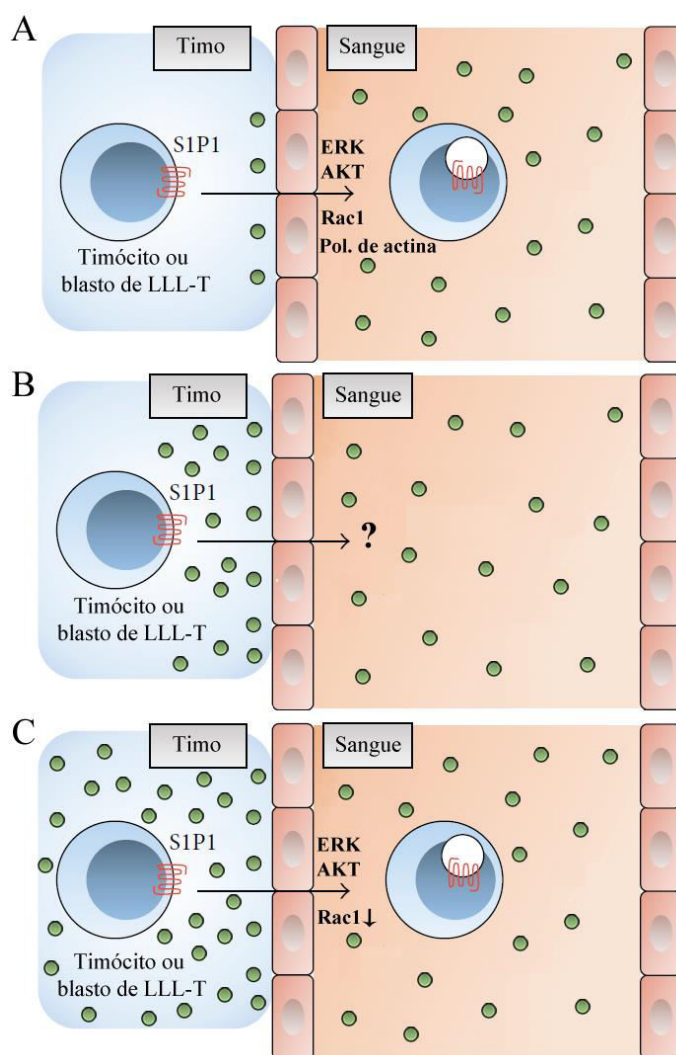


Figura 7.1: Hipótese de estudo. (A) Em condições em que o gradiente de S1P é mantido, como o observado em condições fisiológicas, blastos de LLL-T, que expressam S1P1, seriam capazes de

deixar a massa mediastinal, através de um processo de quimiotaxia, aparentemente, dependente da ativação de ERK, AKT, Rac1 e da modulação do citoesqueleto de actina. (B) Em condições em que o gradiente de S1P é quebrado, os blastos de LLL-T ficariam retidos na massa mediastinal ou, ainda, uma parte desses blastos migraria por quimiocinese. (C) Em condições em que os níveis de S1P são mais elevados na massa mediastinal do que no sangue, os blastos de LLL-T, que expressam S1P1, seriam capazes de deixar a massa mediastinal, através de um processo de quimiorrepulsão, aparentemente, dependente da ativação de ERK e AKT e da diminuição da atividade de Rac1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(5): 380–90.

Aiuti a., Tavian M, Cipponi a., Ficara F, Zappone E, Hoxie J, et al. Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors. *Eur J Immunol*. 1999; 29(6): 1823–31.

Alfonso C, McHeyzer-Williams MG, Rosen H. CD69 down-modulation and inhibition of thymic egress by short- and long-term selective chemical agonism of sphingosine 1-phosphate receptors. *Eur J Immunol*. 2006; 36(1): 149–59.

Allende ML, Bektas M, Lee BG, Bonifacino E, Kang J, Tuymetova G, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J Biol Chem*. 2011; 286(9): 7348–58.

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.

Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Romagnani S. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol*. 2001; 22(5): 277–81.

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 Int*. 2012; 32(2): 331–8.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010; 339(1): 269–80.

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.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, 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.

Bergelin N, Löf C, Balthasar S, Kalhori V, Törnquist K. S1P1 and VEGFR-2 form a signaling complex with extracellularly regulated kinase 1/2 and protein kinase C- α regulating ML-1 thyroid carcinoma cell migration. *Endocrinology*. 2010; 151(7): 2994–3005.

Berrih S, Savino W, Cohen S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1985; 33(7): 655–64.

Betito S, Cuvillier O. Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340(4): 1273–7.

Bréart B, Ramos-Perez WD, Mendoza A, Salous AK, Gobert M, Huang Y, et al. Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *J Exp Med*. 2011; 208(6): 1267–78.

Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2007; 115(1): 84–105.

Brocklyn JR Van. Regulation of cancer cell migration and invasion by sphingosine-1-phosphate. *World J Biol Chem*. 2010; 1(10): 307–12.

Burkhardt B. Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases? *Br J Haematol*. 2010; 149(5): 653–68.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996; 272(5258): 60–6.

Calise S, Blescia S, Cencetti F, Bernacchioni C, Donati C, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of satellite cells: role of S1P receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(2): 439–50.

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.

Cayuela JM, Madani a, Sanhes L, Stern MH, Sigaux F. Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996; 87(6): 2180–6.

Chae SS, Proia RL, Hla T. Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2004; 73(1-2): 141–50.

Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther*. 2005; 108(3): 308–19.

Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH. An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. *PLoS One*. 2013; 8(3): e60298.

Chun J, Brinkmann V. A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya). *Discov Med*. 2011; 12(64): 213–28.

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

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

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 463–93.

Clappier E, Cuccuini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela JM, Dik W a., et al. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in

human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood*. 2007; 110(4): 1251–61.

Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, Fink FM, et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001; 115(3): 545–53.

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*. 1996; 184(1): 215–28.

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

Cuvillier O, Levade T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*. 2001; 98(9): 2828–36.

Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30(1): 69–94.

Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood*. 1999; 93(3): 974–90.

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.

Dik W a, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EFE, Baert MRM, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*. 2005; 201(11): 1715–23.

Dobrovinskaya O, Delgado-Enciso I, Quintero-Castro LJ, Best-Aguilera C, Rojas-Sotelo RM, Pottosin I. Placing ion channels into a signaling network of T cells: from maturing thymocytes to healthy T lymphocytes or leukemic T lymphoblasts. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 750203.

van Doorn R, Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Lakeman K, van het Hof B, van der Pol SMA, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 133.

Drexler H, MacLeod R. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of anaplastic large-cell lymphoma. *Leukemia*. 2004; 18(10): 1569–71.

Ehrke MJ, Verstovsek S, Pocchiari SK, Krawczyk CM, Ujhaży P, Zaleskis G, et al. Thymic anti-tumor effectors in mice cured of lymphoma by cyclophosphamide plus TNF- α therapy: Phenotypic and functional characterization up to 20 months after initial tumor inoculation. *Int J Cancer*. 1998; 76(4): 579–86.

Epstein AL, Kaplan HS, K&PLAN H s. Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas. *Cancer*. 1974; 34(6): 1851–72.

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.

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.

Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002; 1(1): 75–87.

Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone B a., Mccarthy RE. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*. 1965; 18: 522–9.

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.

Franz-Bacon K, Dairaghi DJ, Boehme SA, Sullivan SK, Schall TJ, Conlon PJ, et al. Human thymocytes express CCR-3 and are activated by eotaxin. *Blood*. 1999;

93(10): 3233–40.

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): 1416–26.

Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(7): 489–97.

Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Laviña B, Siemsen BL, Muhl L, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell*. 2012; 23(3): 587–99.

Galy A, Verma S, Bárcena A, Spits H. Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med*. 1993; 178(2): 391–401.

Gao P, Smith CD. Ablation of sphingosine kinase-2 inhibits tumor cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res*. 2011; 9(11): 1509–19.

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*. 2001; 108(5): 689–701.

Gardie B, Cayuela JM, Martini S, Sigaux F. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 91(3): 1016–20.

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.

Golfier S, Kondo S, Schulze T, Takeuchi T, Vassileva G, Achtman AH, et al. Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J*. 2010; 24(12): 4701–10.

Gorer PA. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br J Cancer*. 1950; 4(4): 372–9.

Graeler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of

sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J.* 2002; 16(14): 1874–8.

Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfus Apher Sci.* 2011; 44(2): 183–9.

Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia.* 2006; 20(9): 1496–510.

Green JA, Suzuki K, Cho B, Willison LD, Palmer D, Allen CDC, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P₂ maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat Immunol.* 2011; 12(7): 672–80.

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.

Guyden JC, Pezzano M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. *Int Rev Cytol.* 2003; 223: 1–37.

Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, Robey EA, Halkias J, Melichar HJ, et al. Tracking migration during human T cell development. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71: 3101–17.

Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal.* 2013; 25(10): 1955–61.

Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2): 139–50.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999; 17(12): 3835–49.

Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, et al. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2000; 95(1): 30–8.

He S-Q, Gao M, Fu Y-F, Zhang Y-N. Glycyrrhizic acid inhibits leukemia cell growth

and migration via blocking AKT/mTOR/STAT3 signaling. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(5): 5175–81.

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): e38941.

Hisano Y, Nishi T, Kawahara A. The functional roles of S1P in immunity. *J Biochem.* 2012b; 152(4): 305–11.

Ho JWY, Man K, Sun CK, Lee TK, Poon RTP, Fan ST. Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(9): 1430–8.

Hoelzer D, Gökbüget N. T-cell lymphoblastic lymphoma and T-cell acute lymphoblastic leukemia: a separate entity? *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009; 9 Suppl 3(September): S214–21.

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 Health Dis.* 2014; 13: 150.

INCA. Estimativa 2016: incidência do câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA; 2015.

INCA. Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. INCA. Rio de Janeiro; 2008.

Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* Elsevier B.V.; 2013; 1831(1): 223–7.

Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med.* 2010; 207(13): 2793–8.

Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJA, Kingsbury MA, et al. Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol*

Chem. 2002; 277(28): 25152–9.

Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med*. 2001; 194(7): 991–1002.

Jenne CN, Enders A, Rivera R, Watson SR, Bankovich AJ, Pereira JP, et al. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med*. 2009; 206(11): 2469–81.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10^o ed. Rio de Janeiro; 2004.

Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science*. 2009; 323(5913): 524–7.

Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Bode C, Gräler M, Heusch G, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res*. 2011; 108(3): 314–23.

Kihara Y, Mizuno H, Chun J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res*. 2015; 333(2): 171–7.

Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(15): 3575–94.

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.

Kim MG, Lee G, Lee SK, Lolkema M, Yim J, Hong SH, et al. Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. *J Immunol*. 2000; 165(1): 192–201.

Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2009; 1791(7): 692–6.

Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist K a. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(6): 377–91.

Kluk MJ, Ryan KP, Wang B, Zhang G, Rodig SJ, Sanchez T. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 in classical Hodgkin lymphoma: assessment of expression and role in cell migration. *Lab Invest.* 2013; 93(4): 462–71.

Kohno M, Momoi M, Oo ML, Paik J-H, Lee Y-M, Venkataraman K, et al. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(19): 7211–23.

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 Cells.* 2003; 8(8): 685–97.

Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, et al. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J Biol Chem.* 2007; 282(14): 10690–6.

Kraft DL, Weissman IL, Waller EK. Differentiation of CD3-4-8- human fetal thymocytes in vivo: characterization of a CD3-4+8- intermediate. *J Exp Med.* 1993; 178(1): 265–77.

Kutlesa 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.

Lahortiga I, De Keersmaecker K, Van Vlierberghe P, Graux C, Cauwelier B, Lambert F, et al. Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2007; 39(5): 593–5.

Lee C-J, Lee M-H, Yoo S-M, Choi K-I, Song J-H, Jang J-H, et al. Magnolin inhibits cell migration and invasion by targeting the ERKs/RSK2 signaling pathway. *BMC Cancer.* 2015; 15: 576.

Legrand N, Dontje W, van Lent AU, Spits H, Blom B. Human thymus regeneration and T cell reconstitution. *Semin Immunol.* 2007; 19(5): 280–8.

Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DMS, Nogueira AC, Dardenne M, et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(13): 5545–50.

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.

Liu G, Yang K, Burns S, Shrestha S, Chi H. The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. *Nat Immunol.* 2010; 11(11): 1047–56.

Liu H, Zhang C-X, Ma Y, He H-W, Wang J-P, Shao R-G. SphK1 inhibitor SKI II inhibits the proliferation of human hepatoma HepG2 cells via the Wnt5A/ β -catenin signaling pathway. *Life Sci.* 2016; 151: 23–9.

Liu Q, Zhao X, Frissora F, Ma Y, Santhanam R, Jarjoura D, et al. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood.* 2008; 111(1): 275–84.

Liu X, Xiong SL, Yi G-H. ABCA1, ABCG1, and SR-BI: Transit of HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Clin Chim Acta.* 2012; 413(3-4): 384–90.

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.

Logan GJ, Spinoulas A, Alexander SI, Smythe J a., Alexander IE. CD4 expression on EL4 cells as an epiphenomenon of retroviral transduction and selection. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82(2): 132–5.

Loh KC, Leong W-I, Carlson ME, Oskouian B, Kumar A, Fyrst H, et al. Sphingosine-1-phosphate enhances satellite cell activation in dystrophic muscles through a S1PR2/STAT3 signaling pathway. *PLoS One.* 2012; 7(5): e37218.

Magner WJ, Chang AC, Owens J, Hong MJ, Brooks A, Coligan JE. Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Dev Immunol.* 2000; 7(2-4): 179–93.

Malet-Engra G, Yu W, Oldani A, Gov N, Dupre L, Scita G. Collective Cell Motility Promotes Chemotactic Prowess and Resistance to Chemorepulsion. *Curr Biol.* 2015; 25: 242–50.

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.

Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, Liu X, Mets E, Taghon T, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat Genet*. 2011; 43(7): 673–8.

Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, Walzer T, Dc W, et al. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. 2011; 118(18): 4863–71.

McVerry BJ, Garcia JGN. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: Mechanistic insights. *Cell Signal*. 2005; 17(2): 131–9.

Melchers I, Rodewald HR, Rzepka R. Plasticity of T-cell function. II. Transient induction of CD8 (Ly-2) expression in cloned EL-4 lymphoma cells depending on cell density. *Scand J Immunol*. 1989; 30(1): 99–109.

Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. 2013; 141(1): 5–9.

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.

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.

Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Cotta-de-Almeida V, Savino W. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol*. 2006; 36(6): 1486–93.

Mendoza A, Bréart B, Ramos-Perez WD, Pitt L a., 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.

Messias C V. Migração celular na leucemia/linfoma linfoblástico T: papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Mets E, Van der Meulen J, Van Peer G, Boice M, Mestdagh P, Van de Walle I, et al. MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2015; 29(4): 798–806.

Mets E, Van Peer G, Van der Meulen J, Boice M, Taghon T, Goossens S, et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014; 99(8): 1326–33.

Minowada J, Ohnuma T, Moore G. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl cancer Inst.* 1972; 49(3): 981–895.

Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, et al. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med.* 2004; 200(4): 481–91.

Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. 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.

Morikawa S, Tatsumi E, Baba M, Harada T, Yasuhira K. Two E-rosette-forming lymphoid cell lines. *Int jounal cancer.* 1978; 21(2): 166–70.

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; 352 Pt 3: 809–15.

Murphy K. *Imunobiologia de Janeway.* 8^o ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

Nagel S, Venturini L, Przybylski GK, Grabarczyk P, Schmidt CA, Meyer C, et al. Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50(1): 101–8.

Nishi T, Kobayashi N, Hisano Y, Kawahara A, Yamaguchi A. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841(5): 759–65.

Nofer J-R, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004; 113(4): 569–81.

Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, Gudz TI. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. *FASEB J.* 2007; 21(7): 1503–14.

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. *Br J Cancer.* 2012; 106(5): 909–15.

Nussbaum C, Bannenberg S, Keul P, Gräler MH, Gonçalves-de-Albuquerque CF, Korhonen H, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes leukocyte rolling by mobilizing endothelial P-selectin. *Nat Commun.* 2015; 6: 6416.

O'Neil J, Tchinda J, Gutierrez A, Moreau L, Maser RS, Wong K-K, et al. Alu elements mediate MYB gene tandem duplication in human T-ALL. *J Exp Med.* 2007; 204(13): 3059–66.

Ocampo JSP, de Brito JM, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol.* 2008; 254(1): 1–9.

Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(4): 655–74.

Oo ML, Thangada S, Wu M-T, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem.* 2007; 282(12): 9082–9.

Ota H, Beutz MA, Ito M, Abe K, Oka M, McMurtry IF. S1P(4) receptor mediates S1P-induced vasoconstriction in normotensive and hypertensive rat lungs. *Pulm Circ.* 2011; 1(3): 399–404.

Pals ST, de Gorter DJJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood.* 2007; 110(9): 3102–11.

Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2013; 25(5): 582–90.

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.

Park KS, Kim M-K, 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.

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(July): 1–7.

Patrick K, Vora A. Update on biology and treatment of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Curr Opin Pediatr.* 2015; 27(1): 44–9.

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.

Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM, et al. Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic

sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med.* 2012; 4(8): 761–75.

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.

Poznansky MC, Olszak IT, Foxall R, Evans RH, Luster a D, Scadden DT. Active movement of T cells away from a chemokine. *Nat Med.* 2000; 6(5): 543–8.

Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008; 371(9617): 1030–43.

Pyne NJ, McNaughton M, Boomkamp S, MacRitchie N, Evangelesti C, Martelli AM, et al. Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation. *Adv Biol Regul.* 2015; 60: 151–9.

Pyne S, Kong K-C, Darroch PI. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15(5): 491–501.

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.

Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ +CD8⁺ single-positive T cells, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells, and nat. *Blood.* 2001; 97(3): 601–7.

Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(7): 560–70.

Rottner K, Stradal TEB. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(5): 569–78.

Salomon BDR, Crisa L, Mojciak CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of $\alpha 4\beta 1$ (VLA4) integrin in T-cell

development. *Blood*. 1997; 89(7): 2461–71.

Salomon DR, Mojcik 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*. 1994; 179(5): 1573–84.

Salomone S, Potts EM, Tyndall S, Ip PC, Chun J, Brinkmann V, et al. Analysis of sphingosine 1-phosphate receptors involved in constriction of isolated cerebral arteries with receptor null mice and pharmacological tools. *Br J Pharmacol*. 2008; 153(1): 140–7.

Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapioazova 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*. 2010; 43(4): 394–402.

Sanghvi VR, Mavrikis KJ, Van der Meulen J, Boice M, Wolfe AL, Carty M, et al. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal*. 2014; 7(352): ra111.

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.

Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, 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.

Sattler KJE, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Gräler 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.

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(2): 77–89.

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Golbert DCF, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. *Front Immunol*. 2015; 6: 579.

Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(6): 951–61.

Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz D a., et al. Thymocyte migration: An affair of multiple cellular interactions? *Brazilian J Med Biol Res.* 2003; 36(8): 1015–25.

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, 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, Dalmau SR, Dealmeida VC. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol.* 2000; 7(2-4): 279–91.

Schneider U, Schwenk H-U, 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. *Cancer.* 1977; 19: 621–6.

Schulze T, Golfier S, Tabeling C, Räbel K, Gräler MH, Witzenrath 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.* 2011; 25(11): 4024–36.

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.* 2005; 309(5741): 1735–9.

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.

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.

Shannon LA, McBurney TM, Wells MA, Roth ME, Calloway PA, Bill CA, et al. CCR7/CCL19 controls expression of EDG-1 in T cells. *J Biol Chem*. 2012; 287(15): 11656–64.

Shikata Y, Birukov KG, Garcia JGN. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol*. 2003; 94(3): 1193–203.

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*. 2006; 440(7083): 540–4.

Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Carvalho-Pinto CE, Araujo LM, Dardenne M, Savino W. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(3): 451–61.

Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Pléau J-M, Postel-Vinay M-C, Dardenne M, et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology*. 2005; 146(7): 3005–17.

Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(6): 403–15.

Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10): 760–72.

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.

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.

Taghon T, Waegemans E, Van de Walle I. Notch signaling during human T cell development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012; 360: 75–97.

Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. “ Inside-Out ” Signaling of Sphingosine-

1-Phosphate : 2008; 60(2): 181–95.

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.* 2011; 11(11): 1773–9.

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. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(3): 539–54.

Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schäfers M, Herrgott I, et al. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation.* 2006; 114(13): 1403–9.

Thuy A V., Reimann C-M, Hemdan NY a., Gräler MH. Sphingosine 1-Phosphate in Blood: Function, Metabolism, and Fate. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34(1): 158–71.

Vallera D a., Taylor P a., Aukerman SL, Blazar BR. Antitumor protection from the murine T-Cell leukemia/lymphoma EL4 by the continuous subcutaneous coadministration of recombinant macrophage-colony stimulating factor and interleukin-2. *Cancer Res.* 1993; 53(18): 4273–80.

Vianello F, Kraft P, Mok YT, Hart WK, White N, Poznansky MC. A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus. *J Immunol.* 2005; 175(8): 5115–25.

Vivinus-Nebot M, Rousselle P, Breittmayer J-P, Cenciarini C, Berrih-Aknin S, Spong S, et al. Mature human thymocytes migrate on laminin-5 with activation of metalloproteinase-14 and cleavage of CD44. *J Immunol.* 2004; 172(3): 1397–406.

Vivinus-Nebot M, Tichioni 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.* 1999; 144(3): 563–74.

Vlierberghe P Van, Ferrando A. The molecular es basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012; 122(10): 3398–406.

Van de Walle I, Waegemans E, De Medts J, De Smet G, De Smedt M, Snauwaert S, et al. Specific Notch receptor-ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta/\gamma\delta$ development by inducing differential Notch signal strength. *J Exp Med*. 2013; 210(4): 683–97.

Van de Walle I, De Smet G, Gärtner M, De Smedt M, Waegemans E, Vandekerckhove B, et al. Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions. *Blood*. 2011; 117(17): 4449–59.

Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol*. 2007; 8(12): 1337–44.

Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Prog Lipid Res*. 2003; 42(4): 344–57.

Weng AP, Ferrando A a, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004; 306(5694): 269–71.

Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology*. 2001; 104(1): 43–9.

You MJ, Medeiros LJ, Hsi ED. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2015; 144(3): 411–22.

Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood*. 1999; 94(7): 2533–6.

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

Zerbini MCN, Soares FA, Morais JC, Vassallo J, Velloso EDRP, Chauffaille M de LLF, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4^a edição. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011; 47(6): 643–8.

Zhang G, Yang L, Kim GS, Ryan K, Lu S, O'Donnell RK, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*. 2013a; 122(3): 443–55.

Zhang W, An J, Jawadi H, Siow DL, Lee J-F, Zhao J, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NFκB activation contributes to tumor necrosis factor-α induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013b; 106: 62–71.

9. ANEXOS:

9.1 – Anexo 1:

Artigo “*Semaphorin 3F and neuropilin-2 control the migration of human T-cell precursors*” PLOS ONE (doi: 10.1371/journal.pone.0103405), 2014. Neste documento, descrevemos a expressão do S1P1 em timócitos humanos e em blastos de LLA-T e LL-T. Demonstramos que a migração de precursores de células T pode ser modulada por S1P, tanto em situações fisiológicas quanto em patológicas. Esta migração pode ainda ser controlada por interações mediadas por neuropilina-2 e semaforina-3F.



Semaphorin 3F and Neuropilin-2 Control the Migration of Human T-Cell Precursors

Daniella Arêas Mendes-da-Cruz^{1,2,*}, Anne Colette Brignier^{1,3,9}, Vahid Asnafi⁴, Frederic Baleyrier⁴, Carolina Valença Messias², Yves Lepelletier^{1,5}, Nawel Bedjaoui⁴, Amedée Renand¹, Salette Smaniotto⁶, Danielle Canioni^{4,6}, Pierre Milpied¹, Karl Balabanian⁸, Philippe Bouso⁹, Stéphane Leprêtre¹⁰, Yves Bertrand¹¹, Hervé Dombret¹², Norbert Ifrah¹³, Mireille Dardenne¹, Elizabeth Macintyre⁴, Wilson Savino², Olivier Hermine^{1,4,5*}

1 CNRS UMR8147, Paris Descartes University, Paris, France, **2** Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Department of Clinical Hematology, Necker Children's Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, **4** Laboratory of Oncohematology, AP-HP, Necker Children's Hospital, INSERM U1151, Paris, France, **5** INSERM U1163, CNRS ERL 8254, Laboratory of cellular and molecular basis of hematological disorders and their therapeutic implications, Imagine Institute, Paris, France, **6** Department of Morphology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil, **7** Department of Pathology, Necker Hospital, Paris, France, **8** INSERM U819 – Pasteur Institute, Paris, France, **9** INSERM U668 – Pasteur Institute, Paris, France, **10** Department of Hematology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France, **11** Service of Pediatric Hematology, Hôpital Debrousse, Lyon, France, **12** University Paris 7, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, and Institut Universitaire d'Hématologie EA3518, Paris, France, **13** Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur l'Université Nantes Angers Le Mans, Centre Hospitalier Universitaire Angers, Service des Maladies du Sang and INSERM U892, Angers, France

Abstract

Neuropilins and semaphorins are known as modulators of axon guidance, angiogenesis, and organogenesis in the developing nervous system, but have been recently evidenced as also playing a role in the immune system. Here we describe the expression and role of semaphorin 3F (SEMA3F) and its receptor neuropilin-2 (NRP2) in human T cell precursors. NRP2 and SEMA3F are expressed in the human thymus, in both lymphoid and non-lymphoid compartments. SEMA3F have a repulsive effect on thymocyte migration and inhibited CXCL12- and sphingosine-1-phosphate (S1P)-induced thymocyte migration by inhibiting cytoskeleton reorganization prior to stimuli. Moreover, NRP2 and SEMA3F are expressed in human T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma primary cells. In these tumor cells, SEMA3F also blocks their migration induced by CXCL12 and S1P. Our data show that SEMA3F and NRP2 are further regulators of human thymocyte migration in physiological and pathological conditions.

Citation: Mendes-da-Cruz DA, Brignier AC, Asnafi V, Baleyrier F, Messias CV, et al. (2014) Semaphorin 3F and Neuropilin-2 Control the Migration of Human T-Cell Precursors. PLoS ONE 9(7): e103405. doi:10.1371/journal.pone.0103405

Editor: Niels Olsen Saraiva Câmara, Universidade de Sao Paulo, Brazil

Received: February 8, 2014; **Accepted:** July 1, 2014; **Published:** July 28, 2014

Copyright: © 2014 Mendes-da-Cruz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was developed in the context of the CNRS-Fiocruz Associated Laboratory of Immunology and Immunopathology. It was partially funded with grants by CNRS/Fiocruz French/Brazilian conjoint program, CNRS, The Foundation for Medical Research (FRM - France), The National League against the Cancer (France), The National Cancer Institute (France); Fiocruz, CNPq, Faperj and CAPES (Brazil); Fund for Structural Convergence of Mercosur (FOCEM/Mercosur). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* Email: daniella@ioc.fiocruz.br (DAMC); ohermine@gmail.com (OH)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Thymocyte migration is critical for normal T cell development and maturation. From the entrance of precursors into the thymus, to the migration within the organ and finally mature thymocyte egress, several molecules and receptors are implicated, including extracellular matrix (ECM) molecules, chemokines, sphingosine-1-phosphate (S1P) and their respective receptors. ECM proteins such as fibronectin and laminin are present in the thymus in different concentrations depending on the region. They are recognized by integrins constitutively expressed on thymocytes and microenvironmental cells. The ECM-integrin interactions induce cell adhesion and migration, and also mediate cell-cell interactions [1]. Chemokines are well described in the thymus, playing a role in all migratory steps described above. One classical chemokine described as being chemoattractant or chemorepellent for thymocytes, depending on the dose applied, is CXCL12, which

binds its cognate receptor CXCR4 [2]. Despite normal thymus development and thymocyte differentiation in CXCR4^{-/-} mice, the emigration of mature CD4 thymocytes is severely impaired, and these cells are retained in the thymus [3]. In the human thymus, CXCR4 is also preferentially expressed in immature thymocytes and promote attraction of these cells [4,5]. In addition, besides thymocyte attraction, CXCR4 seems to play a role in the retention of immature CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) cells in the cortex [6]. In a second vein, some studies also demonstrate the essential role of sphingosine-1 phosphate type 1 receptor (S1P₁) and its ligands in thymocyte egress. S1P₁-deficient precursors can differentiate normally within the thymus but are unable to exit the organ [7]. Mouse thymocytes upregulate S1P₁ expression during differentiation, and therefore mature single-positive (SP) cells expressing higher levels of the receptor are able to respond to S1P gradients [8]. *In vivo*, small concentrations of the natural S1P₁

ligand, (S1P) promote lymphocyte migration, whereas therapeutic concentrations of FTY720 (a synthetic S1P agonist) inhibit lymphocyte egress from the thymus and peripheral lymphoid organs, inducing a cell sequestration in those organs and a profound lymphopenia [9,10,11].

To add to the complexity of this regulatory network, some molecules initially described in the nervous system are also present in the thymus playing a role in T cell development and function. Neuropilins (NRPs) and semaphorins (SEMA3s), initially known as modulators of axon guidance, angiogenesis, and organogenesis [12,13] are also expressed in the immune system, and we have previously demonstrated that NRPs and SEMAs also play a role in thymocyte migration. Thymocytes and thymic epithelial cells express NRP1 and its ligand SEMA3A, which induces a reduction of thymocyte adhesion to thymic epithelial cells (TEC) and induced thymocyte chemorepulsion [14,15]. During development, NRP2 is also expressed by cells from both central and peripheral immune system in mice including thymocytes and the thymic microenvironmental cells, as well as peripheral lymphocytes and macrophages [16,17]. Although the expression of NRP2 and its ligand SEMA3F in the mouse thymus have been studied during development, their expression and functional role in the human thymus remained unknown. Herein, we show that NRP2 is strongly expressed in human thymocytes, which led us to study the functional role of this receptor and the SEMA3F ligand in thymocyte migration.

Materials and Methods

Human thymuses

Human thymuses were obtained as a by-product of cardiac surgery performed on children aged from one week to 11 years of age at Necker Hospital. Participants and next of kin, caretakers, or guardians on the behalf of the minors/children participants provided their written informed consent to participate in this study, which was approved by the Necker Hospital Ethical Committees for human research and were performed according to the European Union guidelines and the declaration of Helsinki.

Antibodies and chemicals

The following antibodies were used in appropriate dilutions. APC/anti-CD4 and PerCP/anti-CD8 were purchased from Becton-Dickinson (South San Francisco, USA). Purified anti-neuropilin-2 and FITC/donkey anti-goat were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), whereas purified anti-S1P₁ and corresponding neutralizing peptide were from ABR Affinity BioReagents (Golden, USA). Rabbit anti-cytokeratin immunoserum was a Dako product (Carpinteria, USA) and rhodamine/goat anti-rabbit Ig was from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Purified anti-SEMA3F was a Chemicon International product (Temecula, USA). Secondary PE/donkey anti-goat and FITC/donkey anti-rabbit antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, USA).

Recombinant human CXCL12 and mouse SEMA3F were from R&D Systems, whereas S1P was a Sigma-Aldrich product.

Cytofluorometry

Cells were washed and maintained in PBS for cell counting and subsequent staining. For intracellular staining, a PBS/BSA/saponin solution was used to dilute both primary and secondary antibodies. Cells were then evaluated by flow cytometry in a FACSCalibur or a FACSCanto II device (Becton Dickinson, San Jose, USA); analyses were done using a CellQuest or FACSDiva software (Becton-Dickinson).

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

Following mRNA isolation and cDNA synthesis, RQ-PCR was done with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a 7900HT Fast Real Time PCR System and analyzed in SDS 2.3 software (Applied Biosystems). Primers and probes were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). NRP2 sense: TGCCCA-GCTACGACATGGA; NRP2 anti-sense: CAATCTCTCCG-GAAGCTCCTT; NRP2 probe CCAGATTGTGTTGAGG-GAGTGATAGGG; SEMA3F sense: TCGCCCAAGC-CACTGT; SEMA3F anti-sense: AGCGGTCTCTGCAC-GAAT; SEMA3F probe: CAGCGAGATCCTGGTGACCGGC; S1P₁ sense: GGCTCTCCGAACGCAACTT; S1P₁ anti-sense: CAGGCTTTTTGTGTAGCTTTTCC; S1P₁ probe: TTTCC-GAGGCCCTCTCCAGCCA; ABL sense: TGGAGATAA-CACTCTAAGCATAACTAAAGGT; ABL anti-sense: GATG-TAGTTGCTTGGGACCCA; ABL probe: CCATTTTTGGTT-TGGGCTTCACACCATT. mRNA quality was assessed and normalized by quantification of Abelson (ABL) gene, using guidelines from the Europe Against Cancer program. Samples with an ABL cycle threshold (Ct) higher than 29 were excluded from analysis. Each experiment included two non-template controls for contamination and each sample was performed in duplicate.

Immunofluorescence

Human thymuses were frozen and sectioned (4 μm), and slides were incubated with BSA 1% blocking solution. Samples were subjected to primary antibodies overnight at 4°C or 1 h at room temperature followed by corresponding secondary antibodies for 30 min at room temperature. Stained samples were analyzed by confocal microscopy using a LSM 5 Pascal device (Germany). Negative controls, in which primary antibodies were replaced by unrelated immunoglobulins, or in which the secondary antibody was used alone, did not generate any significant fluorescent signal.

Transmigration assays

Cell migratory activity was assessed in a transwell system. Inserts bearing 5 μm pore size in transwell plates (Corning Costar, Cambridge, USA) were treated with PBS/BSA 1%. Cells (2.0 or 2.5 × 10⁶) in 100 μl of migration medium alone (RPMI/BSA 1%) or medium containing SEMA3F (R&D Systems - Minneapolis, MN, USA) as a chemorepulsive stimulus at 100 ng/ml were added in the upper chambers. After 4 h of incubation at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere, migration was defined by counting the cells that migrated to the lower chambers containing migration medium alone or the medium containing the chemoattractant molecules CXCL12 (200 ng/ml) or S1P (10 nM). Cells were then labeled with appropriate antibodies and analyzed by flow cytometry. In some experiments, cells were first incubated with anti-NRP2 blocking mAb (R&D Systems) before migration.

Actin polymerization Assay

Cells were incubated in RPMI 1640 medium/20 mM HEPES. CXCL12 or SEMA3F were then added to the cell suspension. 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 (Sigma-Aldrich), 0.125 mg/ml L-alpha-phosphatidylcholine palmitoyl (Sigma-Aldrich), and 4.5% PFA in PBS. Staining was analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) values obtained before addition of ligand were arbitrarily set at 100%.

Patients and samples

Diagnosis was made on peripheral blood or bone marrow T-cell acute lymphocyte leukemia (T-ALL) samples ($n = 136$), as previously described (Asnafi et al. 2004). Tumor diagnostic samples from 52 patients with T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) were available for molecular analysis. All patients provided informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was in accordance with local and multicenter research ethical committee approval.

Statistical analyses

Results were analyzed by the parametric Student's *t* test, one-way ANOVA or the nonparametric Wilcoxon Mann-Whitney test. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***)

Results

NRP2 and SEMA3F are expressed in the human thymus

We first observed that NRP2 and SEMA3F were constitutively expressed in developing human T cells in the thymus. The expression of both NRP2 and SEMA3F was widely observed in the epithelial cells (defined by cytokeratin staining) as well as in non-epithelial components in thymic sections (Fig. 1a), as well as in primary TEC cultures and a TEC cell line (data not shown). mRNA expression of corresponding transcripts was also quantified on thymocytes and in a TEC line (Fig. 1b).

The expression of NRP2 on thymocytes varied according to the CD4/CD8-defined subpopulation. A very low percentage of CD4⁺CD8⁻ double-negative (DN) thymocytes expressed NRP2, whereas almost all DP cells expressed this receptor (Fig. 1c). NRP2 expression was lower in single positive (SP) CD4⁻CD8⁺ and CD4⁺CD8⁻ cells as they become CD4^{high}CD8⁻ or CD4⁻CD8^{high} (Fig. 1c). SEMA3F was also expressed by all thymocyte subpopulations, but reduced percentages were observed in the CD4^{high}CD8⁻ and CD4⁻CD8^{high} cells. Interestingly, the same tendency was observed in cells stained for both NRP2 and SEMA3F molecules (Fig. 1c). It is important to note that the expression of both molecules was not related to the children's sex or age (data not shown).

SEMA3F and NRP2 play a role on thymocyte migration

SEMA3F was first described as being chemorepulsive in the nervous system [18], and we observed a similar function in normal human thymocytes (Fig. 2a–c). When SEMA3F was added to the upper chambers of the transwell plates together with thymocytes, cells migrated to the lower chambers, in the opposite direction of the SEMA3F gradients (Fig. 2a). No migration was observed when this molecule was added to the lower chambers as a chemoattractant stimulus (data not shown).

In contrast, CXCL12, acting through its receptor, CXCR4, is known to reduce axonal responsiveness to several known repulsive molecules, including SEMA3A [19]. Since CXCL12 is an important thymocyte chemoattractant and thymocyte migration can be under control of a variety of simultaneous molecular interactions [20], we tested the effect of SEMA3F together with CXCL12. In this case, the presence of SEMA3F inhibited CXCL12-induced migration (Fig. 2a). Interestingly, this inhibition was observed not only in immature DP but also in the mature CD4 and CD8 SP thymocyte subpopulations (Fig. 2b).

Pre-treatment of thymocytes with the blocking anti-NRP2 mAb reverted the inhibition of CXCL12 chemoattraction caused by SEMA3F, showing that the response was specifically mediated by NRP2/SEMA3F interactions (Fig. 2c).

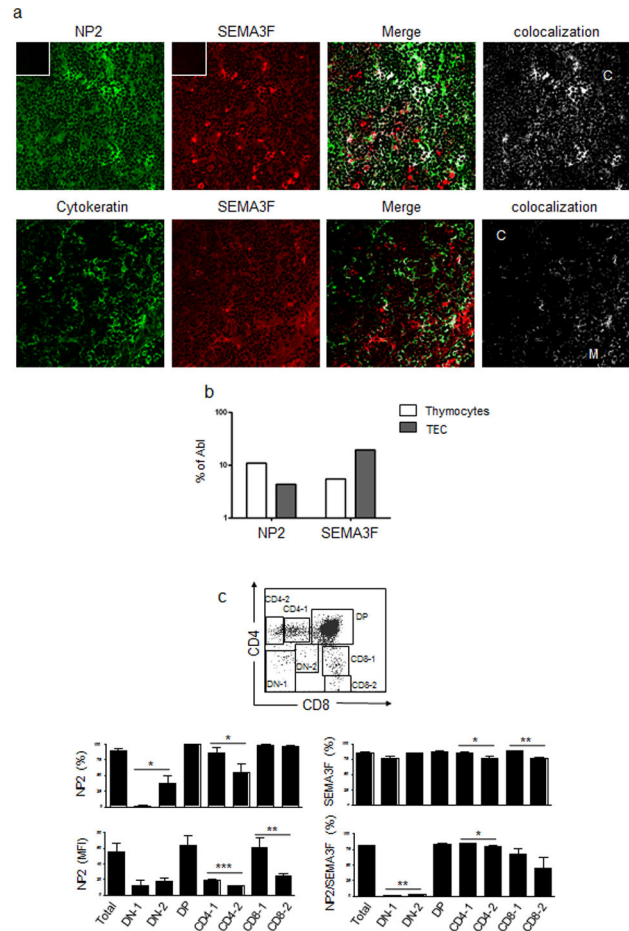


Figure 1. Expression of NRP2 and SEMA3F in the human thymus and thymocytes. **a)** Upper panels show the expression of NRP2 and SEMA3F in the human thymus *in situ*, ascertained by immunofluorescence and confocal microscopy analysis. Lower panels show the expression of SEMA3F and cytokeratin, revealing that SEMA3F is expressed in the epithelial as well as in the non-epithelial compartments of the thymus. Colocalization analysis was performed with ImageJ software. Inserts show negative controls for each secondary antibody. C: cortex; M: medulla. Magnification: 400 \times . **b)** NRP2 and SEMA3F mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelsson (Abi) gene in fresh thymocytes and the THPN thymic epithelial cell line. **c)** Cytofluorometric dot plot depicts the regions used to separate the CD4/CD8-defined thymocyte subpopulations. Graphs represent the expression of NRP2 and SEMA3F in total thymocytes and each subpopulation. $n = 3-6$. In the case of NRP2, mean fluorescence intensity (MFI) analyses are shown to illustrate differences in the expression among the thymocyte subpopulations. Data are represented as means \pm SEM. Selected thymocyte subsets were analyzed by the unpaired Student's *t* test and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***). DN-1: CD4⁻CD8⁻ cells; DN-2: CD4^{low}CD8^{low}; DP: CD4⁺CD8⁺; CD4-1: CD4^{low}CD8⁻; CD4-2: CD4^{high}CD8⁻; CD8-1: CD4⁻CD8^{low}; CD8-2: CD4⁻CD8^{high}. doi:10.1371/journal.pone.0103405.g001

Because SEMA3F modulated thymocyte migration, we analyzed the regulation of the cytoskeleton following CXCL12 and SEMA3F stimulus. As shown in Figure 2d, CXCL12 promoted a peak of actin polymerization after 15 s of stimulus, while SEMA3F induced a slight modification. However, when cells exposed to CXCL12 were pre-treated with SEMA3F, the CXCL12-induced actin polymerization was prevented, showing that SEMA3F is able

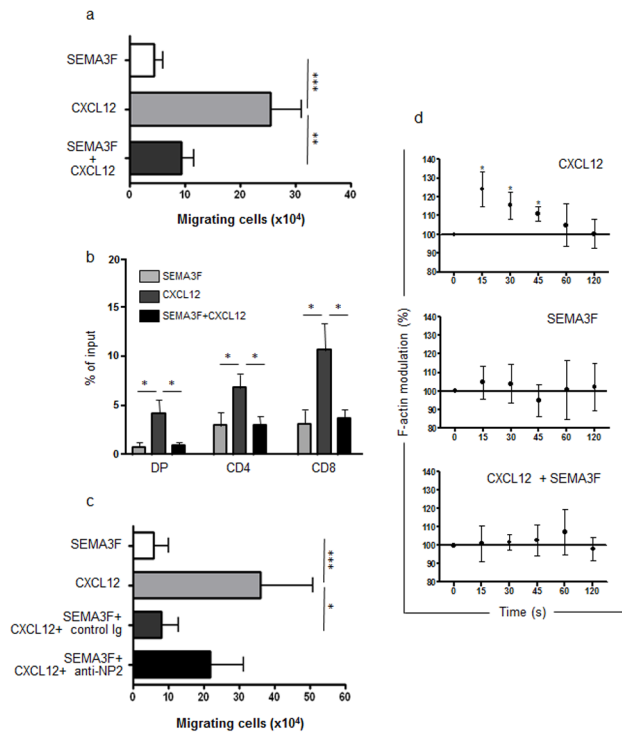


Figure 2. SEMA3F is repulsive and impairs the migratory response of human thymocytes towards CXCL12. **a)** Bars represent the numbers of migrating thymocytes in a transwell system. SEMA3F was added in the upper chambers to evaluate the repulsive response or blocking stimulus of thymocytes. CXCL12 was added in the bottom chambers and induced thymocyte migration. When both stimuli were combined, SEMA3F inhibited CXCL12-induced thymocyte migration ($n = 10$). **b)** Migration response of thymocyte subsets (defined by CD4/CD8 expression), showing that SEMA3F has effect in all thymocyte subpopulations. DP = double-positive, CD4 = CD4 single positive, CD8 = CD8 single-positive. **c)** Bars show the numbers of migrating thymocytes. Black bar represent thymocyte migration of cells pre-treated with anti-NRP2 blocking antibody which abrogated SEMA3F action, since the difference observed between CXCL12 and CXCL12+SEMA3F+anti-NRP2 is no longer significant ($n = 3$). Results were analyzed by the One-way ANOVA analysis of variance and Tukey's multiple comparison post-test. **d)** F-actin modulation of human thymocytes ($n = 4-5$) was analyzed by flow cytometry and shown herein as [(MFI after addition of ligand)/(MFI before addition of ligand)] $\times 100$. MFI values obtained before addition of ligand were arbitrarily set at 100% that corresponds to time zero. Data are represented as means \pm SEM. Results were analyzed by the unpaired Student's t test, comparing each time point compared with time zero. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***). doi:10.1371/journal.pone.0103405.g002

to inhibit the early steps of CXCL12 stimulus that leads to thymocyte migration.

SEMA3F inhibits S1P-induced thymocyte migration

The role of S1P₁ on thymocyte migration and egress has been well described in mice. Mouse thymocytes upregulate S1P₁ expression as they mature from DP to SP cells, making them more responsive to S1P, which is present at higher levels in blood allowing their egress from the thymus [7,8,10]. Since S1P₁ is a G protein-coupled receptor (thus resembling to CXCR4) we hypothesized that SEMA3F could also block S1P₁-induced migration of human thymocytes. We first analyzed S1P₁ expression in human thymocytes and we observed higher levels

of S1P₁ expression on mature SP CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ compared with immature DP CD4⁺CD8⁺ thymocytes (Fig. 3a). Flow cytometry results correlated with real-time quantitative PCR of sorted subpopulations (data not shown). In a functional context, we observed that human thymocytes migrate towards S1P at 10 nM (Fig. 3b-c). In agreement with our hypothesis, SEMA3F also blocked S1P-induced migration (Fig. 3b-c). In this case, SEMA3F and S1P cell counts were below controls without stimuli in all experiments.

Pre-treatment of thymocytes with the blocking anti-NRP2 mAb partially reverted the inhibition of S1P chemoattraction caused by SEMA3F (Fig. 3d). In this case, cells migrate as controls (normalized to 1). This can be explained by the effect of SEMA3F on S1P-induced chemoattraction, which was strongest than the inhibition observed for CXCL12.

Furthermore, we analyzed the F-actin modulation of cytoskeleton on thymocytes following S1P stimulus. We observed a peak of actin polymerization after 15 s of stimulus (Fig. 3e), showing the ability of S1P₁ to induce early steps in thymocyte migration as seen with CXCL12. When cells were pre-treated with SEMA3F, the S1P-induced actin polymerization was prevented and we even observed a tendency of actin depolymerization, in agreement with migration experiments.

SEMA3F and NRP2 expression and function in T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma

Based on our results regarding normal T cell precursors, we hypothesized that NRP2 and SEMA3F could also be expressed by malignant T cell precursors and have a role on lymphoblast migration which may explain various clinical patterns of disease presentation e.g. leukemic vs. lymphoma. We therefore analyzed mRNA expression of corresponding transcripts in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) samples. T-ALL and LBL are malignant proliferations of T cell precursors whose differentiation is arrested and are thought to originate in the thymus [21,22]. We found that both T cell neoplasias expressed the transcripts, but NRP2 and SEMA3F were more highly expressed in T-LBL when compared with T-ALL samples ($p < 0.001$) (Fig. 4a). In addition, the protein level in T-LBL biopsies, SEMA3F expression was stronger in intrathymic malignant cells when compared with the normal thymus or with T-LBL cells localized in blood and peripheral lymphoid organs such as lymph nodes as well as in non-lymphoid organs (data not shown).

It has been previously demonstrated that CXCR4 is expressed by malignant B and T-ALL, and the expression levels correlate with transmigration towards CXCL12 [23]. Therefore, we analyzed the effect of SEMA3F on spontaneous or CXCL12 induced migration. The corresponding migratory response of T-ALL cells was not substantial comparing with the one observed with normal thymocytes. Conversely, we observed a significant migration of malignant cells towards CXCL12. Importantly, the addition of SEMA3F partially prevented CXCL12-driven migration. We observed a 33% to 53% reduction of migration in the 4 samples analyzed (Fig. 4b).

We further asked whether T-ALL/LBL malignant cells also express S1P₁. We observed that both neoplasias expressed S1P₁ mRNA with no difference between T-ALL and T-LBL samples (Fig. S1a). Cell migration towards S1P was evaluated in only one case, in which we observed that cells did migrate towards S1P₁ (1.8 ratio S1P₁/control media) and that such migratory response was inhibited 78% when SEMA3F was added (Fig. S1b).

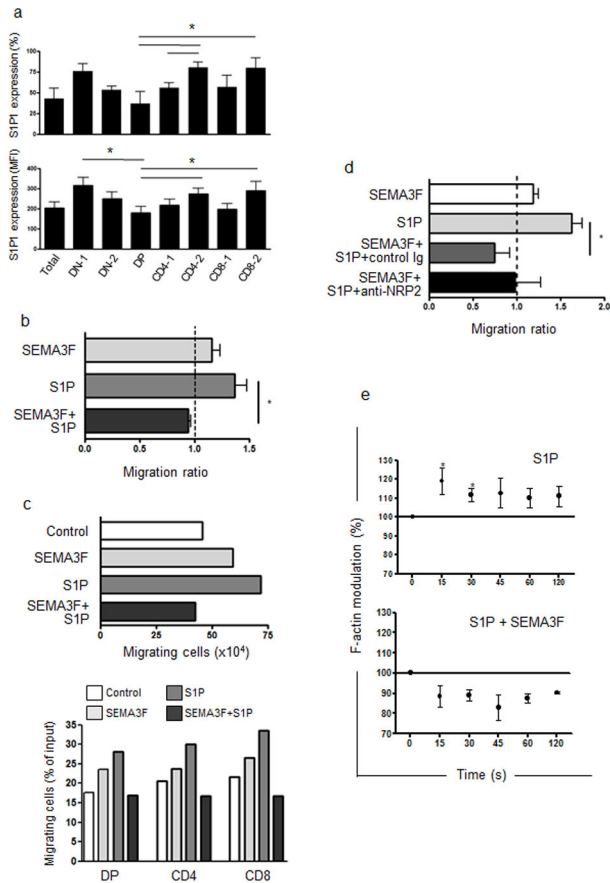


Figure 3. SEMA3F impairs the migratory response of human thymocytes towards S1P. **a)** S1P₁ expression ascertained by flow cytometry in total human thymocytes and CD4/CD8-defined subsets as shown in Figure 1c. DN-1: CD4⁻CD8⁻ cells; DN-2: CD4^{low}CD8^{low}; DP: CD4⁺CD8⁺; CD4-1: CD4^{low}CD8⁻; CD4-2: CD4^{high}CD8⁻; CD8-1: CD4⁻CD8^{low}; CD8-2: CD4⁻CD8^{high}. n = 4. **b)** Bars represent migration of thymocytes in a transwell system. Results are represented by migration ratio, and controls without stimuli were normalized to 1.0. n = 4. Cells migrate towards S1P and when SEMA3F was combined with S1P, it inhibited S1P-induced thymocyte migration. **c)** Migration response of thymocytes from a representative experiment. Bottom panel show the migration of thymocyte subpopulations based on CD4/CD8 expression, showing that SEMA3F had effect and impaired S1P-induced migration in all thymocyte subpopulations. DP = double-positive, CD4 = CD4 single positive, CD8 = CD8 single-positive. **d)** Bars show the numbers of migrating thymocytes. The black bar represent thymocyte migration of cells pre-treated with anti-NRP2 blocking antibody which partially abrogated SEMA3F action, as the difference observed between S1P and S1P+SEMA3F+anti-NRP2 is no longer significant (n = 3). **e)** F-actin modulation of human thymocytes (n = 4) was analyzed by flow cytometry and represented as [(MFI after addition of ligand)/(MFI before addition of ligand)] × 100. MFI values obtained before addition of ligand were arbitrarily set at 100% that corresponded to time zero. Data are represented as means ± SEM. Results were analyzed by the unpaired Student's *t* test, comparing each time point with time zero. Differences were considered statistically significant when *p* < 0.05 (*). doi:10.1371/journal.pone.0103405.g003

Discussion

Herein, we show for the first time that NRP2 and SEMA3F are expressed in the human thymus and play a role in thymocyte migration. NRP2 expression varied depending on the maturation stage of the T cell precursors being downregulated in the more

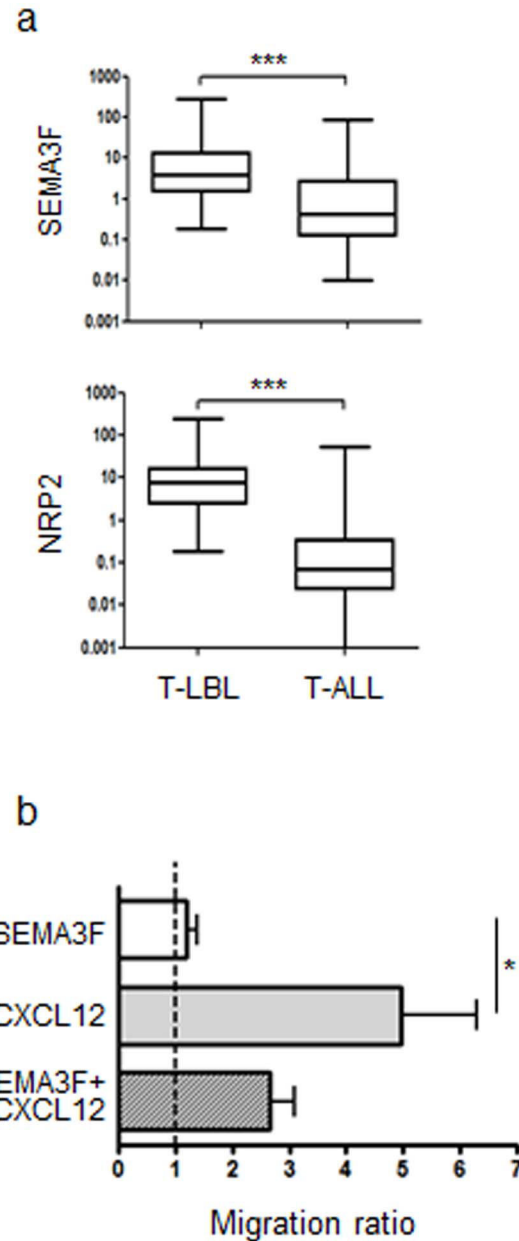


Figure 4. NRP2 and SEMA3F are expressed in T-ALL and T-LBL samples and modulate the migration of malignant cells. **a)** Box plots show the NRP2 and SEMA3F mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl) gene in T-ALL (n = 136) and T-LBL (n = 37) samples. Results were analyzed by the non-parametric Wilcoxon Mann-Whitney test (***p* < 0.001). **b)** Bars represent migration of T-ALL cells in a transwell system. Results are represented by migration ratio, and controls without stimuli were normalized do 1.0. n = 4. Data are represented as means ± SEM. Results were analyzed by the unpaired Student's *t* test **p* < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0103405.g004

mature stages. Individually, SEMA3F had a repulsive effect on thymocytes, similar to data described for neurons [24,25]. When added conjointly with the chemokine CXCL12 or the sphingolipid S1P, SEMA3F significantly prevented thymocyte migration induced by these molecules, and at one mechanism involved is the blockage in early steps of cytoskeleton reorganization, as ascertained by the effect upon actin polymerization.

Interestingly, the expression of NRP2 contrasted with the expression of S1P₁ in human thymocytes. NRP2 is downregulated in SP cells whereas S1P₁ is upregulated. Since S1P₁ is essential for thymocyte egress [7] and SEMA3F can block S1P₁-induced migration, one can argue that NRP2 downregulation could also be involved in thymocyte egress.

We have recently shown that other class 3 SEMA, the SEMA3A, also inhibited thymocyte migration towards CXCL12 and downregulated membrane expression of CXCR4 [26]. The inhibitory effect of SEMA3A was not observed towards the CCL21 chemokine, suggesting that the inhibition of thymocyte migration was specific for CXCL12. Herein, we observed that SEMA3F was able to inhibit thymocyte migration induced by the stimulus of other G-protein coupled receptor such as S1P₁, which is essential for thymocyte egress [7]. It is important to note that the SEMA3A receptor NRP1 is expressed in $5.11 \pm 1.17\%$ of thymocytes [14], whereas $89.84 \pm 3.57\%$ of human thymocytes express NRP2. Strongest effects of SEMA3F could be in part explained by the differential expression patterns of NRPs.

We have proposed that thymocyte migration is a result of the action of several stimuli. Accordingly, each thymocyte responds migrating to a given direction, with a given velocity, which can change depending on the concentration and combination of each stimulus in each thymic region, as well as their capacity to respond via the corresponding specific receptors, in a process that we called multivectorial thymocyte migration [20]. In this context, SEMAs and NRPs can be placed as individual interactions (or vectors), and any alteration in their expression could alter thymocyte migration.

NRPs and SEMAs have been involved in different pathologies, mainly neurodevelopmental disorders and cancer. The expression levels of NRPs and SEMAs are altered in tumors of many types being related to tumor progression [27,28,29]. Interestingly, we also observed the expression of NRP2 and SEMA3F in neoplastic human T cell precursors, in the case of T-ALL and T-LBL. SEMA3F blocked the migration of T-ALL fresh samples towards CXCL12 and S1P, suggesting that malignant T cell precursors respond to SEMA3F similarly to normal thymocytes. Although this issue needs further analysis, our results on normal thymocytes strongly support this hypothesis.

T-ALL and T-LBL are considered as different forms of a single disease [30]. However, although frequently accompanied by a mediastinal mass and bulky adenopathy, T-ALL is characterized

by greater than 25% bone marrow involvement. In contrast, T-LBL is most typically characterized by a large anterior mediastinal mass, with discrete bone marrow involvement (<25%). Since T-LBL expressed higher levels of both molecules when compared with T-ALL samples, it is conceivable to hypothesize that the SEMA3F/NRP2 axis could play a role in malignant T cell precursors homing.

In conclusion, in this paper we have shown that the SEMA3F/NRP2 axis is involved in thymocytes migration and as such should play a critical role in central immune regulation and in the physiopathology of neoplastic disorders of thymocytes. It is tempting to speculate that our findings may provide rationale to investigate the role of drugs that could interact with this pathway for example in the treatment of some immune as well as neoplastic disorders involving normal and malignant thymocytes.

Supporting Information

Figure S1 SEMA3F modulates S1P-induced migration of T-ALL and T-LBL malignant cells. **a)** Box plot shows S1P1 mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl) gene in T-ALL (n = 136) and T-LBL (n = 37) samples. Results were analyzed by the non-parametric Wilcoxon Mann-Whitney test. **b)** Bars represent migration of a T-ALL sample in a transwell system. Results are represented by migration ratio, and control without stimuli was normalized do 1.0. (TIF)

Acknowledgments

We thank all participants in the LL03, GRAALL2003 and GRAALL2005 trials for collecting and providing data and samples; the Necker Children's Hospital for providing the thymus samples; Corinne Garcia-Cordier and Meriem Garfa (René Descartes University Medical School, Paris, France) for assistance with flow cytometry and confocal analysis respectively.

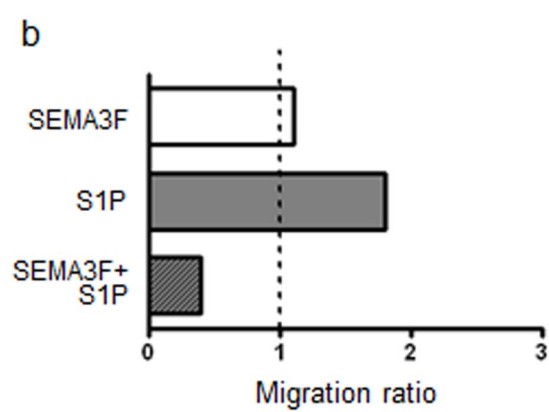
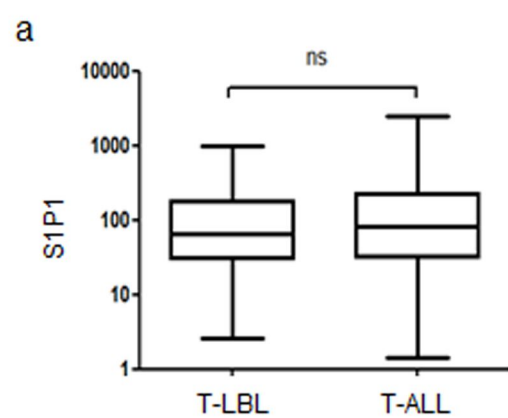
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DAMC ACB VA SS FB PB OH WS. Performed the experiments: DAMC ACB CVM YL NB SS AR PM. Analyzed the data: DAMC ACB FB VA CVM YL NB SS AR PM DC. Contributed reagents/materials/analysis tools: KB PB DC SL YB HD NI VA EM MD WS OH. Wrote the paper: DAMC ACB WS MD OH.

References

- Savino W, Dalmau SR, Dealmeida VC (2000) Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol* 7: 279–291.
- Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, et al. (2002) Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* 109: 1101–1110.
- Vianello F, Krafi P, Mok YT, Hart WK, White N, et al. (2005) A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus. *J Immunol* 175: 5115–5125.
- Annuziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Romagnani S (2001) Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol* 22: 277–281.
- Dzhagalov I, Phee H (2012) How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell Mol Life Sci* 69: 663–682.
- Halkias J, Melichar HJ, Taylor KT, Ross JO, Yen B, et al. (2013) Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J Clin Invest* 123: 2131–2142.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, et al. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427: 355–360.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL (2004) Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279: 15396–15401.
- Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, et al. (2005) Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309: 1735–1739.
- Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K (2006) Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol* 3: 11–19.
- Yopp AC, Ledgerwood LG, Ochando JC, Bromberg JS (2006) Sphingosine 1-phosphate receptor modulators: a new class of immunosuppressants. *Clin Transplant* 20: 788–795.
- de Wit J, Verhaagen J (2003) Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol* 71: 249–267.
- Kruger RP, Abrandt J, Guan KL (2005) Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 789–800.
- Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DM, Nogueira AC, et al. (2007) Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5545–5550.
- Mendes-da-Cruz DA, Lepelletier Y, Brignier AC, Smaniotto S, Renand A, et al. (2009) Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. *Ann N Y Acad Sci* 1153: 20–28.
- Stepanova OI, Krylov AV, Liudyno VI, Kisseleva EP (2007) Gene expression for VEGF-A, VEGF-C, and their receptors in murine lymphocytes and macrophages. *Biochemistry (Mosc)* 72: 1194–1198.
- Takahashi K, Ishida M, Hirokawa K, Takahashi H (2008) Expression of the semaphorins Sema 3D and Sema 3F in the developing parathyroid and thymus. *Dev Dyn* 237: 1699–1708.
- Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SK, Levengood DV, Ginty DD, et al. (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21: 1079–1092.

19. Chalasani SH, Sabelko KA, Sunshine MJ, Littman DR, Raper JA (2003) A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J Neurosci* 23: 1360–1371.
20. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M, Savino W (2008) Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. *J Immunol* 180: 4639–4647.
21. Crist WM, Shuster JJ, Falletta J, Pullen DJ, Berard CW, et al. (1988) Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 72: 1891–1897.
22. Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, et al. (1998) Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91: 735–746.
23. Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, et al. (2001) High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 115: 545–553.
24. Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Miller FD, Kaplan DR (2003) Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J Neurosci* 23: 7602–7609.
25. Pascual M, Pozas E, Soriano E (2005) Role of class 3 semaphorins in the development and maturation of the septohippocampal pathway. *Hippocampus* 15: 184–202.
26. Garcia F, Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Dardenne M, et al. (2011) Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12. *J Leukoc Biol*.
27. Ellis LM (2006) The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 5: 1099–1107.
28. Neufeld G, Kessler O (2008) The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8: 632–645.
29. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, et al. (2009) Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 15: 6763–6770.
30. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, et al. (1999) The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10: 1419–1432.



9.2 – Anexo 2:

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, publicamos a maioria dos resultados obtidos durante a tese aqui apresentada. Nele, 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 disso, descrevemos as vias de sinalização ativadas pós-estímulo em diferentes concentrações e sugerimos 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: CAGGTTGCCCAGAAACAGGTA; S1P3 forward: AGCGGC ACTTGACAATGATCA; S1P3 reverse: ACATCCCGATCAGGAGGAAGA; S1P4 forward: CCCTCTACTCCAAGCGCTACA; S1P4 reverse: CCATAGAGGCCCATGATGGT; S1P5 forward: TGAAGGAGTAGTTCCCGAAGG; S1P5 reverse: AAGCTTCTATGGCTCCCACCTC; 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](#)].

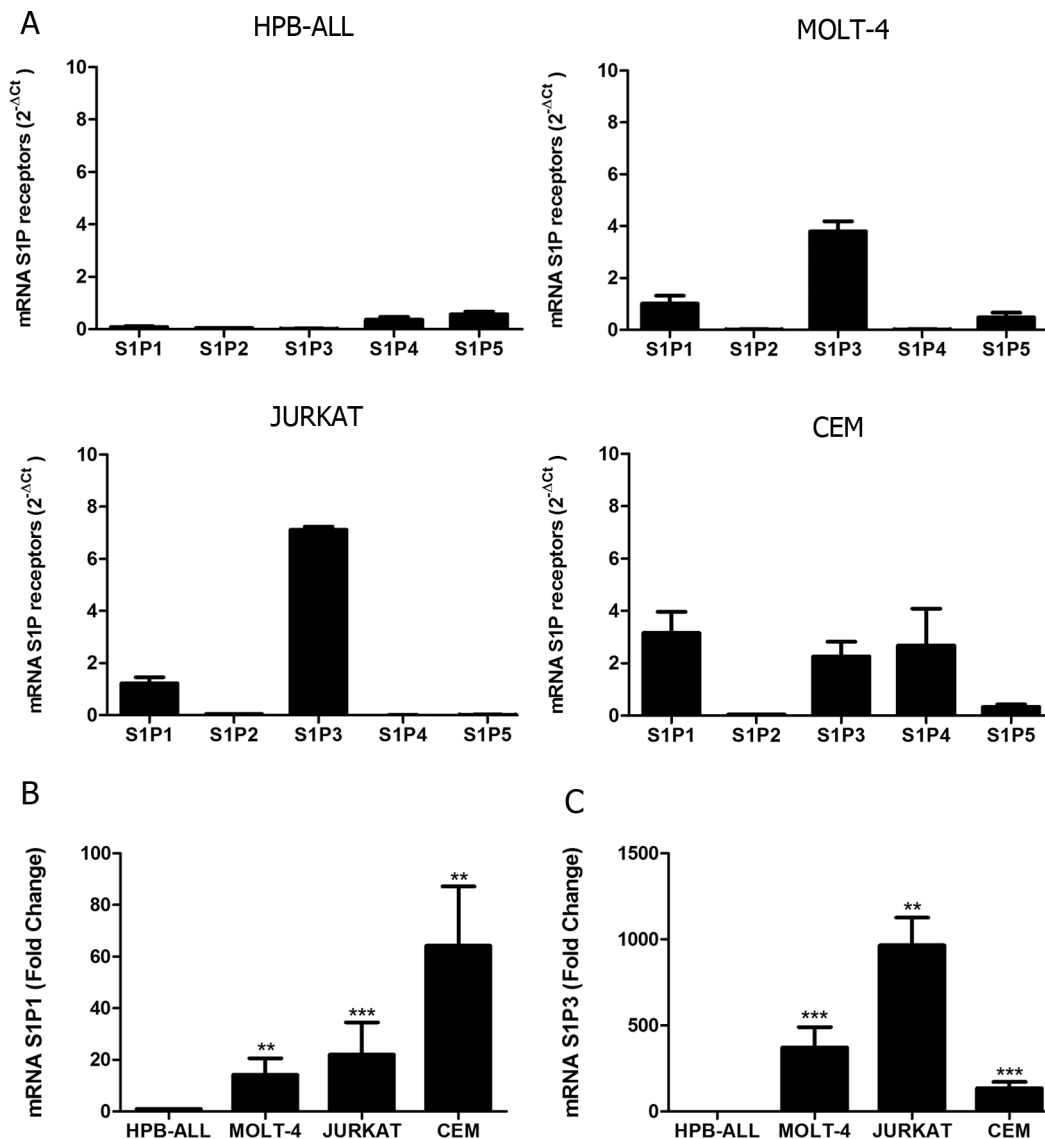


Fig 1. S1P receptors mRNA expression in human T-ALL blasts. (A) Bars show S1P receptors mRNA expression analyzed by real time quantitative PCR, compared with the control Abelson (Abl) gene ($2^{-\Delta Ct}$) in T-ALL ($n = 1-2$, with 3-6 biological replicates). (B) Bars shows S1P1 or (C) S1P3 mRNA expression 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

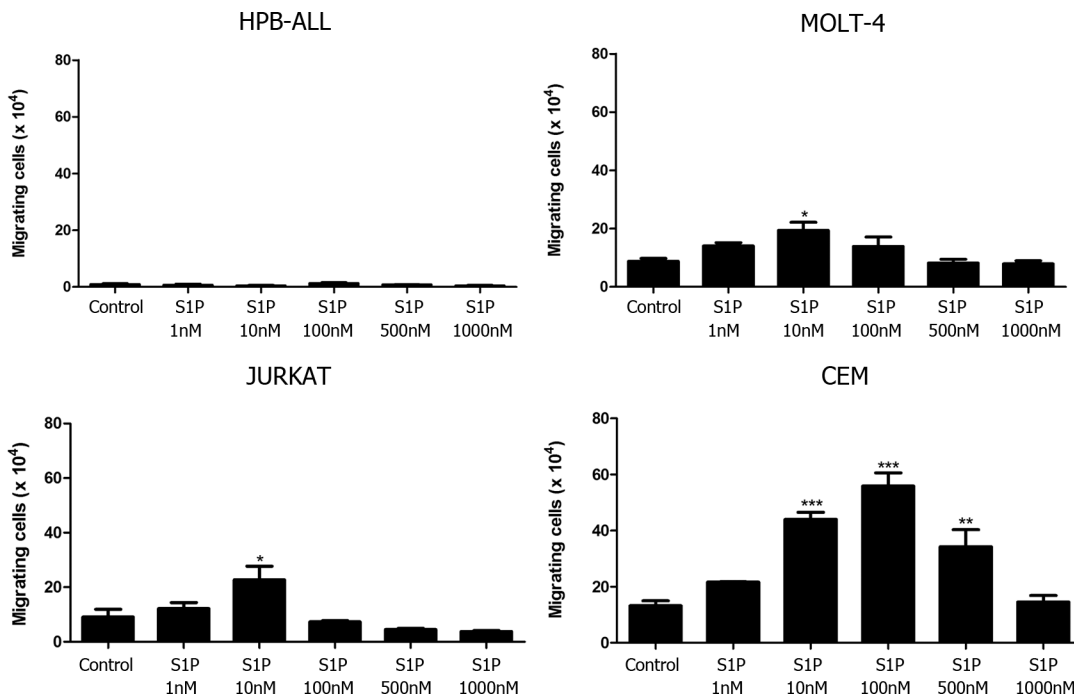


Fig 2. Different S1P concentrations induce chemotactic responses of T-ALL blasts. T-ALL blasts were serum-starved for 2 h and inserted into Transwell™ chambers with different S1P concentrations for 4 hours. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by One-way ANOVA, followed by Tukey post-test. 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

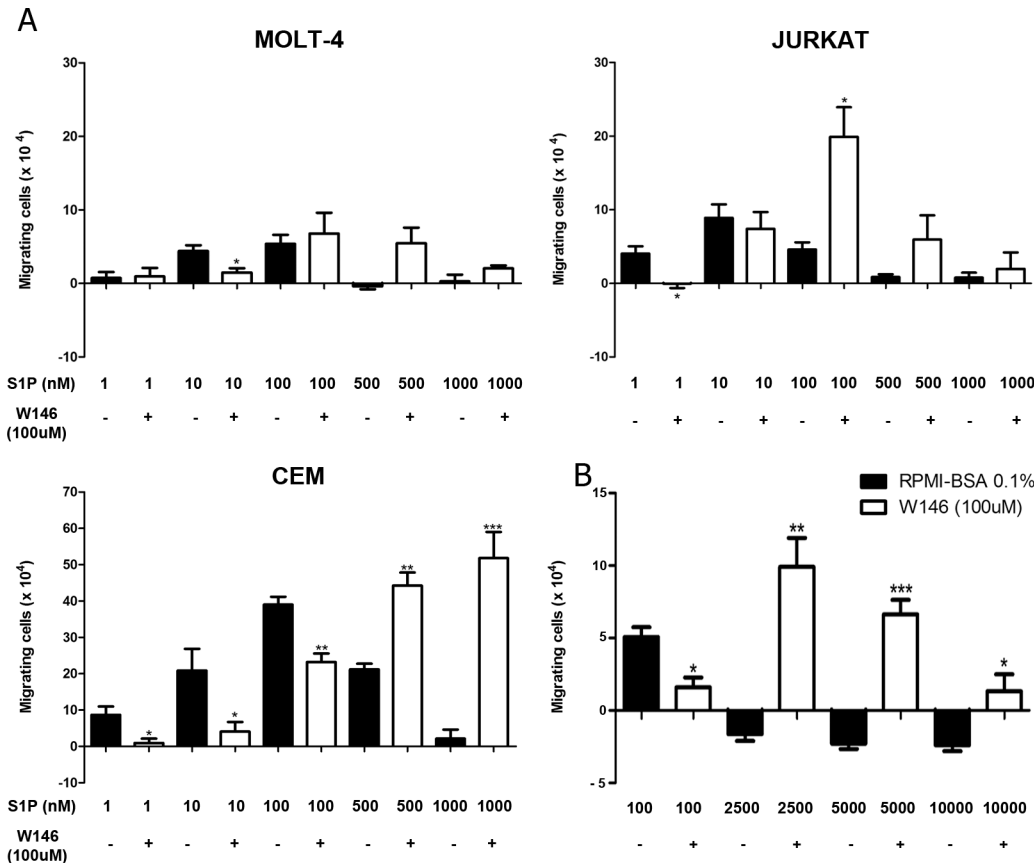


Fig 3. S1P1 is involved in S1P-driven chemotactic responses of T-ALL blasts. T-ALL blasts were serum-starved for 2 h and pre-treated or not with W146 (100 μM). (A) Cells were applied to Transwell™ chambers with S1P 1, 10, 100, 500 or 1000 nM and incubated for 4 hours (n = 3). (B) Migratory response of 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 ± 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.

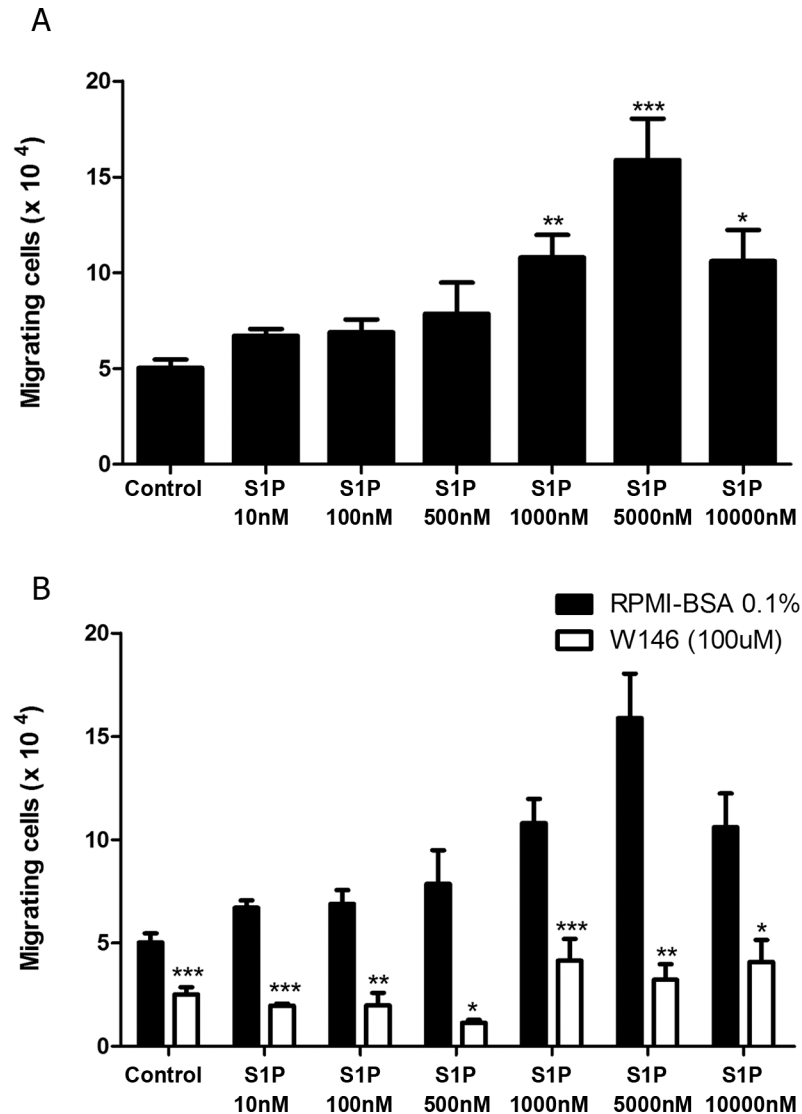


Fig 4. High S1P concentrations induce S1P1-dependent fugetaxis of CEM cells. (A) CEM cells were serum-starved for 2 h, applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. S1P was added to the upper chamber to evaluate fugetaxis; only RPMI-BSA 0.1% was added 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).

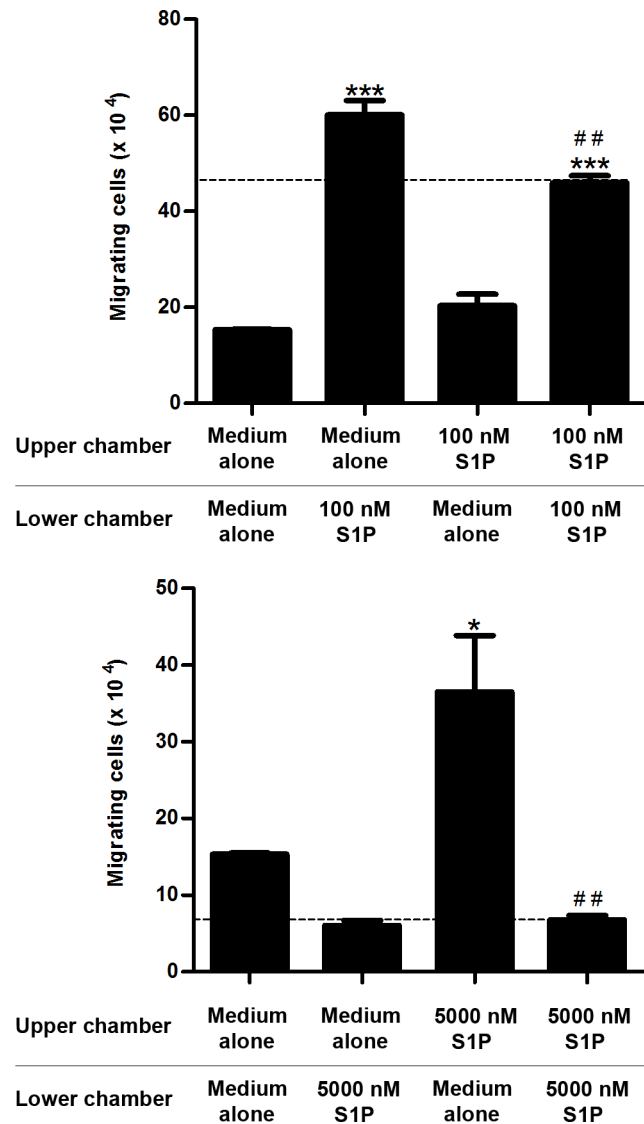


Fig 5. S1P-induced migratory responses in checkerboard assays. CEM cells were serum-starved for 2 h, applied to Transwell™ chambers containing different S1P concentrations in a checkerboard format and incubated for 4 hours. (A) S1P 100 nM or (B) S1P 5000 nM were added to upper and/or lower chamber as 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

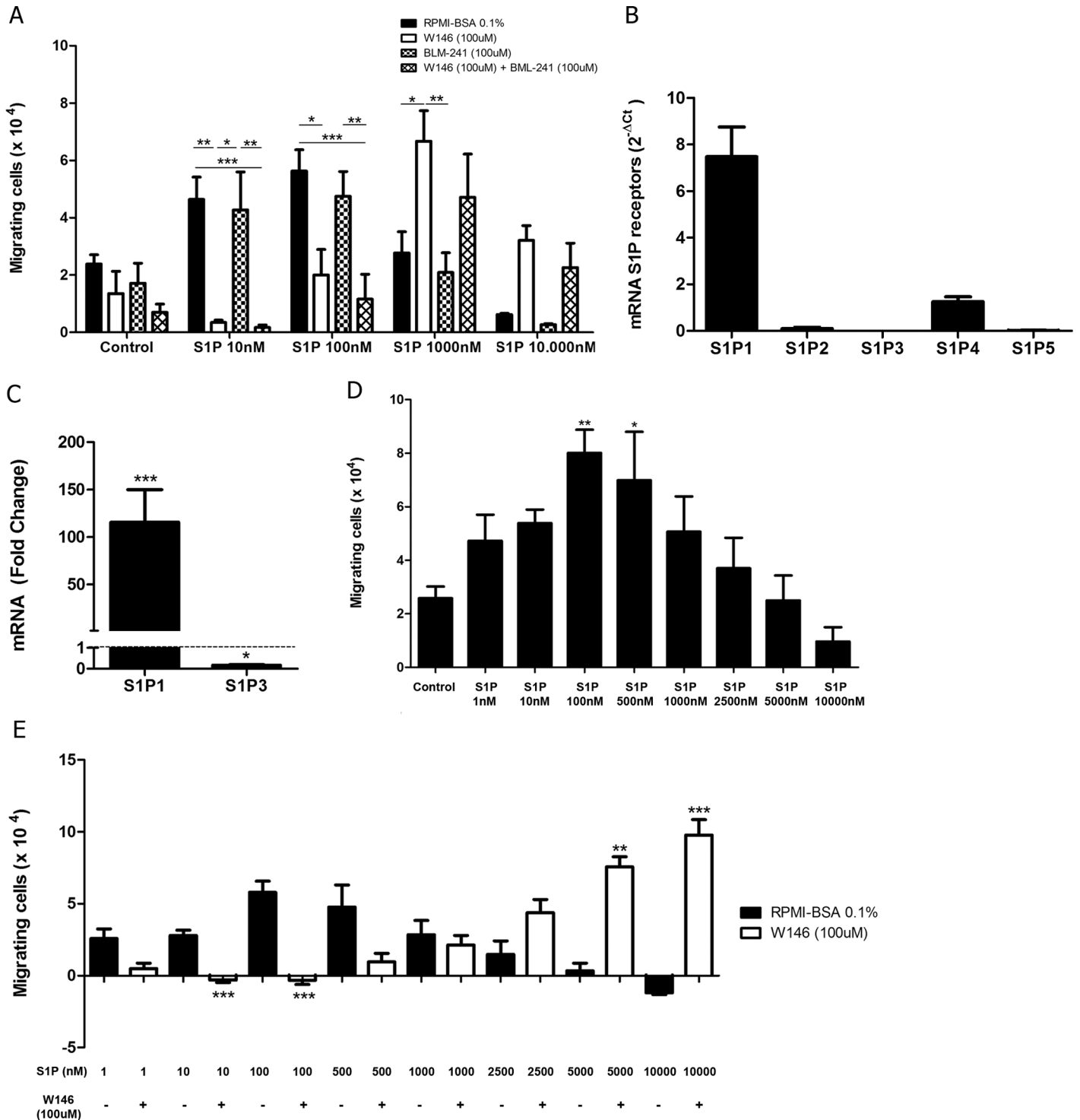


Fig 6. S1P3 is not involved in S1P-driven chemotactic responses of CEM cells. (A) CEM cells were serum-starved for 2 h and pre-treated or not with W146 (100 μM) and/or BM-241 (100 μM). Cells were applied in Transwell™ chambers containing different S1P concentrations and incubated for 4 hours. Black bars 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 μ M). 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

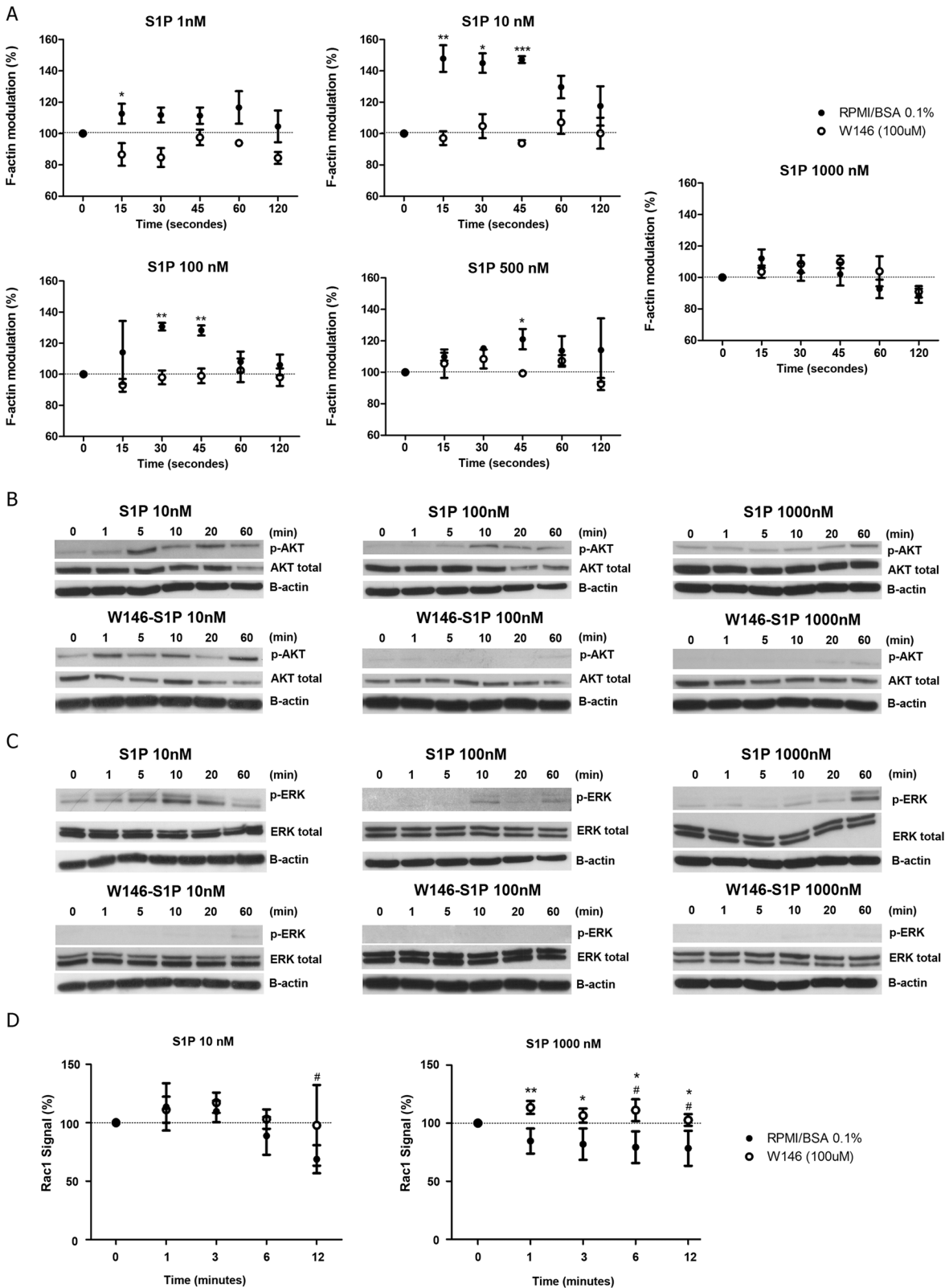


Fig 7. S1P modulates F-actin polymerization, AKT, ERK and Rac1 activity. (A) Modulation of the actin cytoskeleton after stimulation by different S1P concentrations in CEM cells pre-treated or not with W146 (100 μ M). Results are represented as [(MFI after addition of the ligand) / (MFI before addition of the ligand)] \times 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

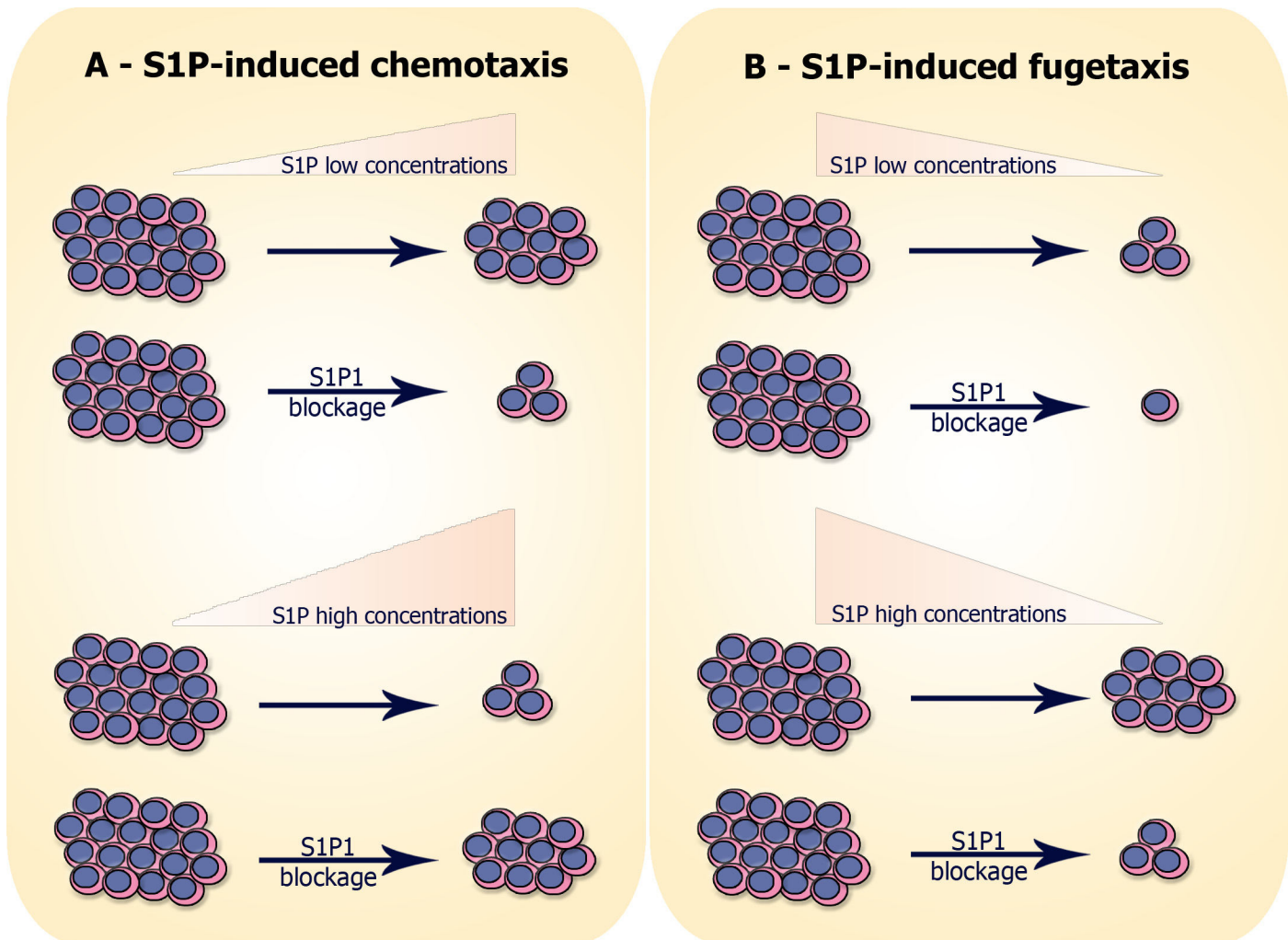


Fig 8. Hypothesis of S1P-induced migration of neoplastic T-cell progenitors: (A) S1P-induced chemotaxis: cells expressing S1P1 migrate toward low S1P concentrations (10–100 nM) and migration is inhibited when S1P1 is blocked with W146. In contrast, cells do not migrate toward high S1P concentrations (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 PRTIS 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: [65/24/11667](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2702) [pii] 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.

