

Lara Siborro Carço

**EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO LIGANDO RANK
NA LEUCEMIA DE CÉLULAS T**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2016

Lara Siborro Carço

**EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO LIGANDO RANK
NA LEUCEMIA DE CÉLULAS T**

Tese de Mestrado em Oncobiologia

Trabalho realizado sob a orientação do Dr. Nuno Rodrigues dos Santos



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2016

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Expressão e regulação do ligando RANK na leucemia de células T

Declaração de autoria: Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Os autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Candidata:

(Lara Carço)

Copyright © Lara Carço. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aqueles que possibilitaram a realização desta tese.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Dr. Nuno Rodrigues dos Santos, pelo conhecimento partilhado, paciência e compreensão ao longo deste período que foram essenciais na minha evolução académica. Também gostaria de agradecer a ajuda e paciência das minhas colegas de laboratório, Marinella Ghezzeo, Mónica Fernandes e Ivette Pacheco-Leyva.

Em seguida quero agradecer aos meus pais, pela educação, apoio, carinho e confiança em mim, sem os quais a minha graduação seria impossível.

E por último e, não menos importante, quero agradecer aos meus amigos, pela paciência e apoio que me deram durante este tempo, e um especial obrigado ao Pedro Sequeira pela paciência e apoio emocional, e André Mazayev pelo apoio informático.

ABSTRACT

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive malignancy that affects children, often between 2 and 5 years old, and adults. This disease invades various organs of the body, and can be fatal without early diagnosis and appropriate therapy.

It has been revealed that the RANKL protein is a stimulator of metastasis by increasing motility of cancer cells. Since this ligand is expressed on thymocytes and activated T cells, the objective of this work was to understand the involvement of the RANK/RANKL signaling pathway in T-ALL.

For this study we used leukemic TEL-JAK2 transgenic mice, which develop a rapid and aggressive leukemia. By performing quantitative RT-PCR we confirmed that RANKL is more expressed in leukemic cells of TEL-JAK2 transgenic mice than in normal thymocytes. We performed RANKL expression analysis by flow cytometry in TEL-JAK2 leukemic thymocytes and it was shown that its expression was highest inside cells than on their surface. In contrast, the EL4.2 thymic lymphoma cell line presented high RANKL surface expression.

The flow cytometric analysis of cell cultures treated with compounds inducing the T-cell receptor pathway, showed that phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Ionomycin together increased RANKL expression. This increase was verified at the surface of both TEL-JAK2 leukemic cells, and EL4.2 cells. The use of an IKK kinase inhibitor and the Actinomycin D DNA transcription inhibitor impaired the induction of RANKL caused by PMA and Ionomycin in TEL-JAK2 leukemic cells.

Using *Rank* conditional knockout mice we found that when the RANK receptor was absent in thymic epithelial cells, RANKL expression increased in thymocytes. However, when leukemic cells were injected into *Rank* gene knockout mice, no changes in RANKL expression occurred in those cells.

With these experiments we found that the RANK/RANKL signaling pathway may contribute to the development of T-ALL. However, it is necessary to understand how interfering with this receptor affects the development of T-ALL, before it can be used potentially as a novel therapeutic target.

KEY WORDS

T-cell acute lymphoblastic leukemia, microenvironment, NF- κ B pathway, RANK/RANKL signaling pathway, TEL-JAK2 mouse model

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) é uma doença maligna agressiva, afetando principalmente crianças de 2 até 5 anos de idade. Esta doença manifesta-se no sangue e na medula óssea, podendo afetar vários órgãos do corpo, sendo fatal, na falta de um diagnóstico precoce e terapia apropriada.

O RANKL é uma proteína membranar ou secretada que se demonstrou ter capacidade estimuladora de metástases, através do aumento da motilidade celular de alguns tipos de células cancerosas. Este ligando tem a capacidade de ativar o recetor RANK e é expresso principalmente em timócitos e células T ativadas. O objetivo deste estudo foi de compreender o envolvimento da via de sinalização RANK/RANKL, na LLA-T. A estirpe de murganhos transgênicos TEL-JAK2, que desenvolve espontaneamente leucemia semelhante à LLA-T, foi utilizada para este estudo.

Ao realizar RT-PCR quantitativo confirmámos que o gene que codifica a proteína RANKL é mais expresso em células leucémicas de murganhos transgênicos TEL-JAK2 que em timócitos normais. Para além disso, a análise da expressão do RANKL, por citometria de fluxo, em timócitos leucémicos TEL-JAK2, mostrou ser mais elevada no interior das células do que na sua superfície. Contrariamente, a linha celular de linfoma tímico EL4.2 apresentou expressão elevada de RANKL à superfície.

A análise por citometria de fluxo a células colocadas em cultura com compostos indutores da via de sinalização do recetor de células T (TCR), mostrou que o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e a Ionomicina em conjunto induzem um aumento da expressão do RANKL, tanto no interior como à superfície de células leucémicas TEL-JAK2, assim como à superfície de células EL4.2. A utilização de um inibidor da quinase IKK e o inibidor de transcrição, Actinomicina D, levaram à diminuição da indução do RANKL causada pelo tratamento com PMA e Ionomicina em células leucémicas TEL-JAK2.

Neste estudo foram usados murganhos *knockout* condicionais para o gene *Rank*. Descobrimos que quando o recetor RANK está ausente de células epiteliais do timo, a expressão do RANKL aumenta em timócitos normais. Contudo, quando células leucémicas foram injetadas nesta estirpe, não se verificaram alterações significativas na expressão do RANKL naquelas células.

Com estas experiências verificámos que a via de sinalização RANK/RANKL pode potencialmente contribuir para o desenvolvimento da LLA-T. No entanto, é necessário compreender como a possível interferência com o par recetor/ligando pode afetar o

desenvolvimento da LLA-T antes de considerar a utilização desta via como potencial alvo terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE:

Leucemia linfoblástica aguda de linfócitos T, microambiente, RANK/RANKL, via NF- κ B, murganhos TEL-JAK2.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

DECLARAÇÃO DE AUTORIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
ABSTRACT	iii
RESUMO	v
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS	xiii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 HEMATOPOIESE.....	2
I.2 DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS T NO TIMO	3
I.2.1 Quatro fases DN (<i>double negative</i> – duplo negativo).....	4
I.2.2 Seleção positiva e negativa	4
I.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS T (LLA-T)	7
I.3.1 Alterações genéticas.....	7
I.3.2 Vias de sinalização ativadas em LLA-T	8
I.3.2.1 NOTCH1	8
I.3.2.2 Via NF- κ B.....	8
I.3.2.3 Via NFAT	10
I.3.2.4 Via Jak/STAT	11
I.3.3 Fatores do microambiente.....	12
I.3.4 Terapias.....	12
I.3.5 Modelo de murganhos TEL-JAK2.....	13
I.4 RANK/RANKL	14
I.4.1 Funcionamento da via.....	14
I.4.2 OPG.....	16
I.4.3 Funções	17
I.4.3 RANK /RANKL no cancro.....	18
I.4.4 Deleção condicional do RANK em células epiteliais com expressão de queratina 5 positivas.....	19
I.5 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	19

II.1 Manutenção e cruzamento de murganhos geneticamente modificados.....	22
CAPITULO II - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
II.2 GENOTIPAGEM DE MURGANHOS	24
II.3 RECOLHA DE AMOSTRAS DE CÉLULAS DO TIMO E LISE CELULAR.....	27
II.4 EXTRAÇÃO DE RNA.....	27
II.5 ELIMINAÇÃO DE DNA CONTAMINANTE NAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL.....	28
II.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	28
II.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVO (RT-qPCR) ...	29
II.8 LINHAS CELULARES	30
II.9 CÉLULAS PRIMÁRIAS	30
II.10 CULTURAS CELULARES	30
II.11 CITOMETRIA DE FLUXO	31
II.11.1 Detecção de proteínas à superfície celular	31
II.11.2 Detecção de proteínas intracelulares	32
II.12. INJEÇÃO INTRA VENOSA DE CÉLULAS LEUCÉMICAS	33
CAPITULO III – RESULTADOS	34
III.1 CARACTERIZAÇÃO DA LEUCEMIA EM CÉLULAS TEL-JAK2 A NIVEL DE EXPRESSÃO CD3, CD4 E CD8.....	35
III.2 DETERMINAÇÃO DO NIVEL DE EXPRESSÃO DE RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2	36
III.2.1 O RANKL é significativamente mais expresso em células leucémicas TEL-JAK2 do que em timócitos de estirpe selvagem.....	36
III.2.2 A proteína RANKL é mais expressa no interior das células leucémicas TEL-JAK2	37
III.2.3 Linfócitos T leucémicos TEL-JAK2 apresentam níveis superficiais de proteína RANKL muito baixos.	39
III.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS PELA ESTIMULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO TCR.....	40
III.3.1 Expressão de RANKL à superfície das células leucémicas TEL-JAK2 é induzida através da mimetização da ativação da sinalização por TCR.....	40
III.3.2 Aumento da expressão de RANKL em timócitos leucémicos TEL-JAK2 depende da ativação das vias de sinalização NF-κB e da transcrição do gene <i>RankL</i>	42

III.3.3 A mimetização da sinalização por TCR também induz a expressão de RANKL na linha celular linfoblástica EL4.	43
III.4 AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DA EXPRESSÃO DE RANKL À SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2 DEPENDER DA EXPRESSÃO DO RECETOR RANK EM CÉLULAS DO MICROAMBIENTE.....	45
III.4.1. Aumento da expressão do RANKL em timócitos maduros de estirpe selvagem mutados para o gene <i>Rank</i>	45
III.4.2. A ausência do gene <i>Rank</i> em células do microambiente tímico não influencia a expressão de RANKL em células leucémicas.....	46
CAPITULO IV – DISCUSSÃO.....	49
IV.1 FATORES MICROAMBIENTAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA LLA- T	50
IV.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2	51
IV.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RANKL PELA ESTIMULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO TCR	52
IV.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPRESSÃO DO RECETOR RANK EM CÉLULAS DO MICROAMBIENTE NA EXPRESSÃO DE RANKL À SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2	55
IV.5 CONCLUSÕES GERAIS	56
CAPITULO V – BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 Modelo clássico da diferenciação da linhagem linfóide e mieloide.	3
Figura 1. 2: Desenvolvimento de células T em murganhos.	6
Figura 1.3: As duas vias de ativação do NF- κ B induzido pela sinalização do RANK, CD40 e LT β	9
Figura 1. 4 Via de sinalização do TCR.	11
Figura 1. 5: Esquema representativo do transgene HA-TEL-JAK2.	14
Figura 1. 6 Sistema do RANK/RANKL no osso e outros tecidos.....	15
Figura 1. 7 Via de sinalização para a osteoclastogénese normal.....	16
Figura 2.1 Diagrama esquemático de como gerar um murganho <i>knockout</i> condicional. 24	
Figura 3. 1: Caracterização das células leucémicas em murganhos leucémicos TEL-JAK2 CD3, CD4 e CD8 através de citometria de fluxo.	36
Figura 3. 2: Níveis relativos de expressão de mRNA de <i>Rankl</i> em timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos de estirpe selvagem (ES).....	37
Figura 3. 3: Análise da expressão da proteína RANKL no interior de células leucémicas e células de estirpe selvagem (ES) recolhidas do timo e de gânglios linfáticos de murganhos TEL-JAK2 e murganhos de estirpe selvagem por citometria de fluxo.	38
Figura 3. 4: Detecção da expressão de RANKL à superfície de timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos da estirpe selvagem por citometria de fluxo.	39
Figura 3. 5: Detecção da expressão de RANKL à superfície de timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos de estirpe selvagem (ES) tratados com PMA e Ionomicina ou PHA... 41	
Figura 3. 6: Determinação da expressão de RANKL em timócitos leucémicos TEL-JAK2 fixadas e permeabilizadas por citometria de fluxo após tratamento com: BMS- 344501 (IKKi) em combinação com PMA+Ionomicina, Actinomicina D em combinação com PMA+Ionomicina e PMA+Ionomicina.....	42
Figura 3. 7: Detecção da expressão de RANKL à superfície de células EL4.2 tratadas com PMA+Ionomicina, PMA, Ionomicina e PHA por citometria de fluxo.	44
Figura 3. 8: Expressão de RANKL na presença ou ausência do seu recetor à superfície de células do microambiente.	46
Figura 3. 9: Detecção da proteína RANKL na superfície de células leucémicas na ausência do seu recetor em células do microambiente.	48

Figura 4. 1 Sinalização do TCR. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Anomalias genéticas na LLA-T	7
Tabela 2. 1: <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados na genotipagem.....	26
Tabela 2. 2: Sequências de <i>primers</i> utilizados em RT-qPCR	30
Tabela 2. 3: Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo	32

LISTA DE SIGLAS

- BSA** – (*bovine serum albumin*) albumina de soro bovino
- Ca²⁺** - Cálcio
- cDNA** - (*Complementary deoxyribonucleic acid*) ácido desoxirribonucleico
- CLP** - (*Commun Lymphoid Progenitors*) progenitores comuns linfoides
- CMP** - (*Commun Myeloid Progenitors*) progenitores comuns mieloides
- CO₂** - Dióxido de carbono
- CsA** - Ciclosporina A
- DMSO** - Dimetilsulfoxido
- DN** - (*Double Negative*) duplo negativo
- DNA** - (*Deoxyribonucleic acid*) ácido desoxirribonucleico
- DNase** – desoxirribonuclease
- DP** – (double positive) Duplo Positivo
- FBS** - (fetal bovine sérum) Soro fetal bovino
- HSC** - (*Hematopoietic stem cells*) células estaminais hematopoiéticas
- IKK** - (*IκB kinase*) quinase IκB
- IL** – Interleucina
- IP** - Iodeto de propídio
- K14** - (*keratin 14*) queratina 14
- K5** - (*keratin 5*) queratina 5
- LLA** - Leucemia Linfoblástica Aguda
- LLA-T** - Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
- LT-HSC** - “long-term” HSC
- LTα/β** – Linfotoxina α /β
- LtβR** - recetor linfotoxina-β
- MHC** - (*Major histocompatibility complex*) complexo principal de histocompatibilidade
- MPP** - (*multipotent progenitor*) Progenitor multipotente
- mRNA** - (*messenger ribonucleic acid*) Ácido Ribonucleico mensageiro
- mTEC** - (*medullary thymic epithelial cells*) células epiteliais timicas medulares
- NF-κB** - (*Nuclear factor κB*) fator nuclear κB

NIK - (*Ubiquitination of NF- κ B inducing kinase*) Ubiquitinação do NF- κ B induzindo a cinase

NK - *Natural killer*

OPG – Osteoprotegerina

PBS – (*Phosphate buffered saline*) Tampão salino de fosfato

PCR - (*Polymerase Chain Reaction*) Reação em cadeia da polimerase

PHA - Phytohaemagglutinin

PKC - (*Protein kinase C*) proteína quinase C

PMA - *Phorbol Myristil Acetate*

qPCR - (*quantitative polymerase chain reaction*) Reação em cadeia da polimerase quantitativo

RANK - (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*) Recetor ativador do NF- κ B

RANKL - (*RANK-Ligand*) ligando do RANK

RANKL-PE - proteína RANKL conjugado com ficoeritrina

RNA - (*ribonucleic acid*) Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

RT-PCR - (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) A transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

SP - (*Single Positive*) Unicamente positivo

STAT - (*Signal transducer and activator of transcription*) transdução de sinal e ativador da transcrição

ST-HSC - “short-term” HSC

TCR - (*T cell receptor*) recetor das células T

TNF - (*Tumour Necrose Factor*) fator de necrose tumoral

TNFR - (*Tumour Necrose Factor Receptor*) fator de necrose tumoral

TNFRF - (*Receptor family of TNF*) recetor ativador da família TNF

TRAF - (*TNFR-associated fator*) fator de associação ao TNFR

TRAF6 - (*TNFR-associated fator 6*) TNFR associado ao fator 6

TRAIL - (*TNF-ratio of ligand inducer apoptosis*) proporção de ligando indutor de apoptose – TNF

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

I.1 HEMATOPOIESE

As células do sangue derivam da medula óssea, local onde residem também as células estaminais hematopoiéticas (*hematopoietic stem cells* - HSC), que lhes dão origem. Estas, têm a capacidade de se diferenciar em todas as linhagens celulares do sangue, através da geração de progenitores intermediários que, seguindo uma certa direção, perdem progressivamente o potencial de diferenciação para outras linhagens de células (Lai e Kondo, 2008).

A primeira mudança biológica que acontece nas HSC, após divisões celulares assimétricas, é a perda gradual da capacidade de autorrenovação, caracterizada por uma sequência de 3 populações: “*long-term*” HSC (LT-HSC) da medula óssea (que podem renovar-se praticamente para toda a vida), “*short-term*” HSC (ST-HSC) (com capacidade de autorrenovação limitada, contribuindo para a diferenciação multilinhagem), e progenitores multipotentes (*multipotent progenitor* - MPP) (que não se autorrenovam) (Lai e Kondo, 2008; Kondo et al., 1997; Adolfsson et al., 2005). Estas populações, desenvolvem-se em sequência, LT-HSC→ST-HSC→MPP, (ver figura 1.1). Uma vez que os MPPs não se autorrenovam, estes irão constituir o primeiro passo de restrição da linhagem que ocorre durante a hematopoiese (Lai e Kondo, 2008).

As células hematopoiéticas separam-se em duas grandes linhagens: a linhagem linfóide, que inclui as células T, B e *natural killer* (NK) e a linhagem mielóide, composta por eritrócitos, megacariócitos, granulócitos, e monócitos/macrófagos. As células dendríticas também são de origem hematopoiética e podem originar-se a partir de progenitores tanto linfóides como mielóides (ver figura 1.1) (Lai e Kondo, 2008).

A identificação de progenitores comuns linfóides (*common lymphoid progenitors* - CLP) e, progenitores comuns mielóides (*common myeloid progenitors* - CMP) levou à formação do modelo clássico da hematopoiese e desenvolvimento da linhagem de células do sangue. (Adolfsson et al., 2005). As linhagens linfóide e mielóide derivam de um único MPP, de modo simétrico, o que representa o primeiro passo de comprometimento irreversível da linhagem de HSCs, durante a ontogenia hematopoiética (Lai e Kondo, 2008).

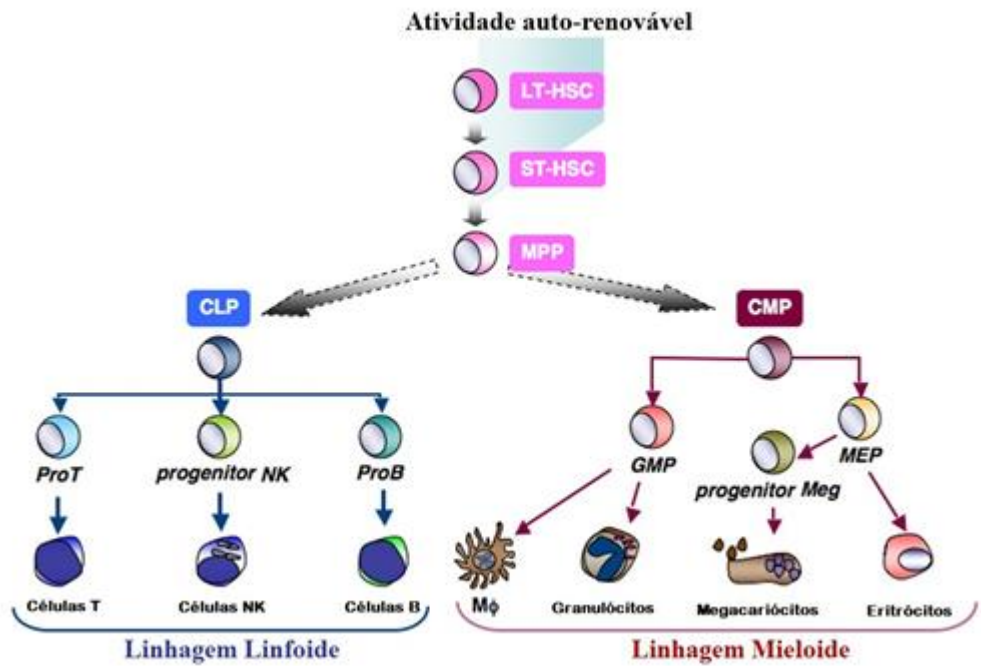


Figura 1. 1 Modelo clássico da diferenciação da linhagem linfóide e mieloide.

Neste modelo as linhas celulares seguem uma sequência, LT-HSC→ST-HSC→ PMP, em que as mesmas células MPP vão originar simetricamente as células CMP e CLP. (Adaptado de Lai e Kondo, 2008).

I.2 DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS T NO TIMO

O timo é um órgão que dispõe de um microambiente que suporta a diferenciação, maturação e seleção dos linfócitos ou células T, (Takahama, 2006; Lai e Kondo, 2008; Hikosaka et al., 2008) e é composto por dois lobos externamente envolvidos por uma cápsula de colagénio. Cada lobo é dividido em lóbulos por septos incompletos, que contêm uma área cortical periférica escura em microscopia de luz branca e densamente povoada por células linfóides, e uma área medular luminosa menos abundante em células linfóides (Milićević et al., 2008; Rezzani et al., 2008).

O desenvolvimento das células T ocorre no timo, para onde os precursores linfóides migram a partir da medula óssea pela corrente sanguínea através da expressão e estimulação de recetores de quimiocinas específicas. No timo, estes precursores linfóides perdem o potencial de originar outras células que não as células T. Estas irão então proliferar, diferenciar, e passar por processos de seleção que resultam no desenvolvimento de células T maduras (Owen et al., 2009). Durante todo o tempo de desenvolvimento das células no timo (entre 1 a 3 semanas), os timócitos passam por uma série de fases, caracterizadas por mudanças no fenótipo molecular da superfície da célula, como descrito seguidamente (Owen et al., 2009).

I.2.1 Quatro fases DN (*double negative* – duplo negativo)

Os precursores de células T penetram no timo pela região cortico-medular e deslocam-se para o córtex externo onde aí proliferam (Gameiro et al., 2010). As primeiras células T, não apresentam CD4 nem CD8 à sua superfície, por isso são definidas como células duplamente negativas (DN). Estas células T-DN podem ser subdivididas em quatro subtipos (DN1-4), baseados na presença ou ausência de outras moléculas na sua superfície: como o c-kit (CD117), recetor do fator de crescimento de células estaminais; CD44, uma molécula de adesão; e CD25, cadeia alfa do recetor da interleucina-2 (IL-2). (Owen et al., 2009)

Os timócitos DN1 são os primeiros a entrar no timo, sendo capazes de dar origem a vários tipos de células. Estas células, expressam unicamente c-kit e CD44 (c-kit⁺⁺CD44⁺CD25⁻) e ao serem acolhidas no ambiente tímico, tornam-se residentes no córtex, onde vão proliferar e expressar CD25, passando a designar-se timócitos DN2 (c-kit⁺⁺CD44⁺CD25⁺). Nesta fase crítica do desenvolvimento, os genes para as cadeias do recetor de células T (TCR) γ , δ , e β começam a reorganizar-se (Owen et al., 2009).

As células T DN3 (c-kit⁻CD44⁻CD25⁺) que reorganizam com sucesso e expressam uma cadeia β funcional comprometem-se à linhagem de células T TCR $\alpha\beta$. Seguidamente perdem a expressão de CD25, interrompem a proliferação e entram para a fase final do desenvolvimento DN, DN4 (c-kit^{baixo/-}CD44⁻CD25⁻), amadurecendo diretamente para timócitos CD4⁺CD8⁺, duplos positivos (*double positive* - DP) (ver figura 1.2) (Owen et al., 2009).

I.2.2 Seleção positiva e negativa

No timo, os timócitos entram em contacto com células epiteliais tímicas que expressam altos níveis de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade - Major histocompatibility complex) de classe I e II na sua superfície. Estas moléculas MHC apresentam auto-péptidos (*self antigens*) que derivam de proteínas intracelulares ou extracelulares e que são degradadas no percurso normal do metabolismo celular (Owen et al., 2009). Os timócitos DP submetem-se a uma seleção positiva e negativa, dependendo dos sinais que os seus TCRs recentemente gerados recebem quando encontram combinações MHC/ péptido-próprio (Owen et al., 2009).

Estes timócitos DP têm um contacto próximo com células estromais tímicas e, “procuram” na sua superfície os MHC/péptidos-próprios. Por sua vez, cada tipo de células

estromais (células epiteliais, macrófagos e células dendríticas) tem a capacidade de expressar altos níveis de proteínas MHC de classe I e II (Owen et al., 2009).

Se os timócitos $CD4^+CD8^+$ reconhecerem o complexo MHC/péptido nas células epiteliais corticais através do seu recém-adquirido TCR, então vão passar pela seleção positiva, um processo que induz a sobrevivência e diferenciação dos timócitos DP. Contudo, a maioria dos novos timócitos gerados não têm sucesso no reconhecimento e ligação a MHC/péptido. Estas células “falham” no teste da seleção positiva e morrem por apoptose com 3-4 dias. As interações TCR/MHC/péptido-próprio que iniciam a seleção positiva têm uma intensidade mais baixa em relação às interações que iniciam os sinais da seleção negativa. Um grande número de moléculas de sinalização é necessário para a seleção positiva e a ativação destas requer uma alta afinidade de interações entre o TCR e o MHC/péptido (Owen et al., 2009).

Ao continuar a sua maturação, os timócitos selecionados positivamente migram para a medula tímica. Essa migração vai depender da expressão do recetor CCR7 das quimiocinas CCL19 e CCL21 (Owen et al., 2009; Gameiro et al., 2010). Já na medula, estes timócitos são sujeitos a seleção negativa mediada por antigénios próprios, que incluem proteínas específicas de tecidos, ligados a MHC (Owen et al., 2009).

Os timócitos autoreativos $CD4^+CD8^+$ com recetores de alta afinidade para combinações MHC/péptido-próprio são extremamente perigosos para o organismo se não forem eliminados pela seleção negativa no timo. Certos erros no processo da seleção negativa são responsáveis por uma série de doenças auto-imunes (por exemplo, diabetes tipo I). Sendo definida como um processo que elimina clones autoreativos, onde a alta afinidade às interações TCR induzem diretamente sinais apoptóticos, a seleção negativa é responsável pela tolerância central (Owen et al., 2009). As células dendríticas do timo e macrófagos encontrados em várias áreas do timo têm as características apropriadas para mediar a seleção negativa. Tanto o córtex como a medula tímica têm o potencial de induzir a seleção negativa (Owen et al., 2009).

Seguidamente, os timócitos DP ($CD4^+CD8^+$) terão de “decidir” se vão seguir a linhagem de células T citotóxicas $CD8^+$ ou a linhagem de células T auxiliares $CD4^+$ (ver Figura 1.2). O comprometimento da linhagem requer uma mudança na organização genómica e expressão de genes resultando no silenciamento de um dos genes codificando os co-recetores CD4 ou CD8, assim como a expressão de genes associados com funções específicas em cada linhagem (Owen et al., 2009).

As células T maduras expressam CD4 ou CD8 (unicamente positivas, *single positive* – SP) e saindo do timo são células prontas para desencadear uma resposta imunitária contra eventuais invasores (Owen et al., 2009).

Ensaio efetuados demonstraram que o RANKL expresso por timócitos selecionados positivamente (especialmente os linfócitos CD4 SP) desempenham um papel importante no aumento do número de células epiteliais tímicas medulares (mTEC) e na formação da medula tímica que contem mTEC expressando o fator de transcrição Aire. Por sua vez, Aire e CCL21 são moléculas vitais para a execução da função da medula tímica para a indução da tolerância central (Hikosaka et al., 2008).

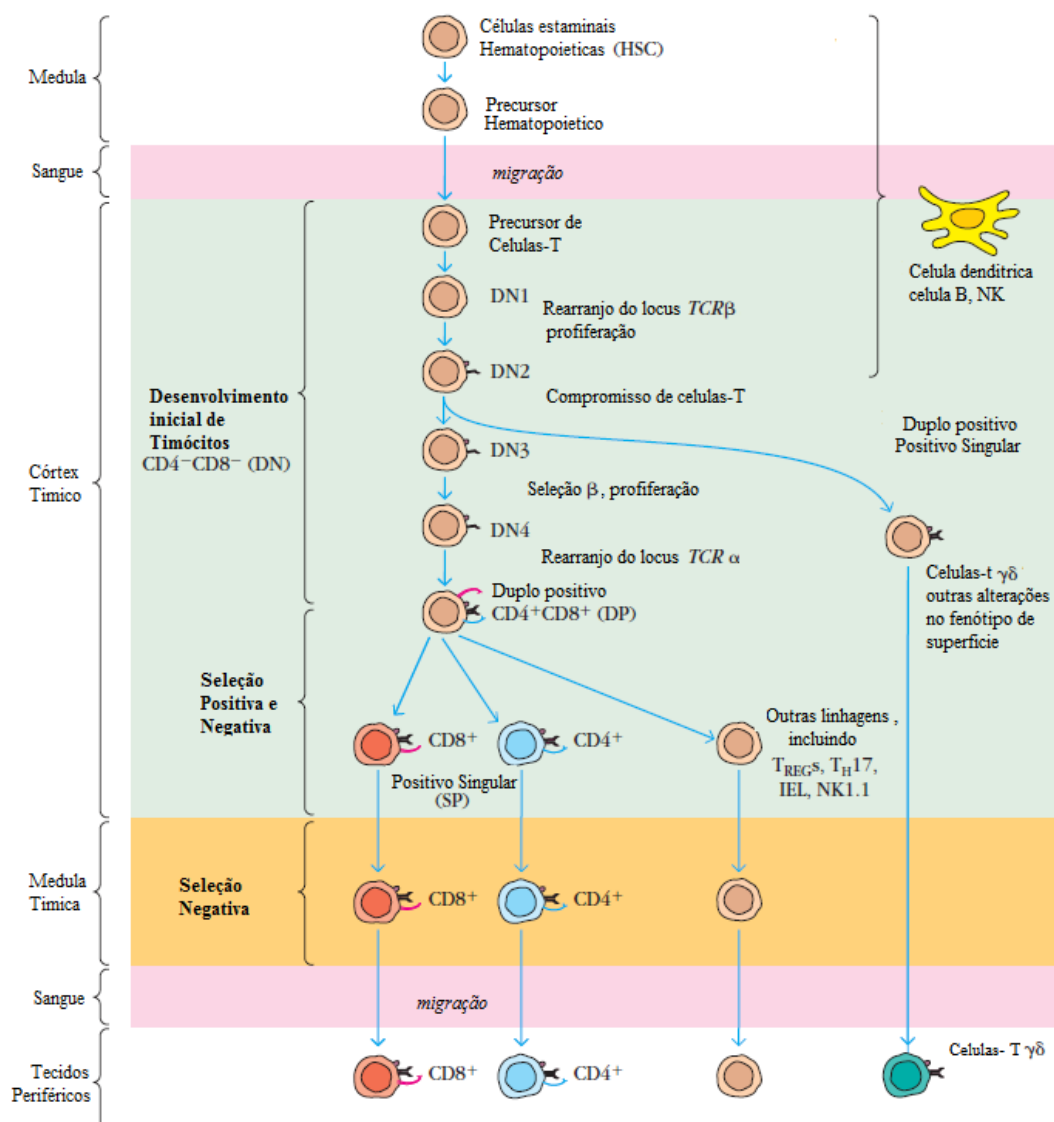


Figura 1. 2: Desenvolvimento de células T em murganhos.

A maioria dos timócitos imaturos são CD4⁻CD8⁻ DN e passam por várias fases. (DN1-DN4) Durante o qual comprometem a linhagem de células T e começam a rearranjar o seu gene do recetor de células T (TCR). Os que

têm sucesso no seu rearranjo da cadeia do TCR β e TCR α tornam-se timócitos CD4⁺CD8⁺ DP. Em seguida, os timócitos DP passam por uma seleção positiva e negativa no córtex do timo. Os timócitos selecionados positivamente continuam a sua maturação e migram para a medula, onde são sujeitos a uma ronda de seleção negativa. As células T maduras expressam CD4 ou CD8 abandonando o timo e podem iniciar uma resposta imune (Adaptado de Owen et al., 2009).

I.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS T (LLA-T)

A LLA-T é uma neoplasia hematológica agressiva que resulta da transformação de progenitores de linfócitos T. É caracterizada por um bloqueio na diferenciação destes progenitores e proliferação clonal com a consequente acumulação de blastos malignos na medula óssea e sangue, disseminando-se para outros órgãos, como por exemplo o timo, baço, fígado e gânglios linfáticos, através do sangue periférico (Herranz et al., 2014).

A LLA-T resulta da acumulação de alterações genéticas em oncogenes e genes supressores tumorais em associação com fatores do microambiente que levam à perturbação do controlo rigoroso da hematopoiese (Pui et al., 2008).

I.3.1 Alterações genéticas

Foram descritas várias anomalias cromossómicas adquiridas em blastos leucémicos de pacientes com LLA associadas com a biologia da doença e que envolvem genes importantes para o desenvolvimento da leucemia (Harrison, 2001). Translocações cromossómicas na leucemia de células T envolvem os loci TCR, em parceria com os genes *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2*, *MYC*, *LCK*, *TANI*, *IGH*, e *TCL1*. (ver tabela 1.1). Estas translocações ocorrem em aproximadamente 30% dos casos de LLA-T (Harrison, 2001).

Tabela 1.1 Anomalias genéticas na LLA-T (Harrison, 2001)

Gene	Localização	Rearranjo
<i>HOX11</i>	10q24	t(10;14)(q24;q11) t(7;10)(q35;q24)
<i>TAL1</i>	1p33	t(1;14)(p33;q11) TALd
<i>TAL2</i>	9q32	t(7;9)(q34;q32)
<i>LYL1</i>	19p13	t(7;19)(q34;p13)
<i>LMO1</i>	11p15	t(11;14)(p15;q11)
<i>LMO2</i>	11p13	t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13)
<i>MYC</i>	8q24	t(8;14)(q24;q11)
<i>LCK</i>	1p34	t(1;7)(p34;q34)
<i>TANI</i>	9q34.3	t(7;9)(q34;q34.3)
<i>IGH</i>	14q32.3	inv(14)(q11;q32)
<i>TCL1</i>	14q32.1	inv(14)(q11;q32) t(14;14)(q11;q32)

I.3.2 Vias de sinalização ativadas em LLA-T

I.3.2.1 NOTCH1

Mais de 50% dos casos da LLA tem mutações ativadoras que envolvem o gene *NOTCH1*, gene que codifica um recetor transmembranar. Este regula o desenvolvimento normal das células T. Quando as células progenitoras migram da medula óssea para o timo através de vasos sanguíneos localizados na zona da junção cortico-medular, os precursores de células T encontram-se com ligandos NOTCH (por exemplo DLL4) que são abundantemente expressos pelo epitélio tímico. Após estimulação, a proteína NOTCH1 é quebrada e a fração intracelular desloca-se para o núcleo onde regula a transcrição de um conjunto diverso de genes, incluindo o oncogene MYC (Pui et al., 2008; Herranz et al., 2014).

O NOTCH1 participa no desenvolvimento celular embrionário e regulação da decisão dos precursores linfoides para se tornarem linfócitos T ou B. O NOTCH1 tem sido identificado como um regulador-chave para o crescimento celular no desenvolvimento da LLA-T, dirigindo um programa de transcrição oncogénico que por sua vez promove a proliferação e sobrevivência celular de linfoblastos na LLA-T (Herranz et al., 2014).

I.3.2.2 Via NF- κ B

A expressão de muitos genes pró-inflamatórios é regulada pela ativação transcripcional do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B). Normalmente, o NF- κ B reside no citoplasma de células não estimuladas como um complexo inativo associado a um membro da família da proteína inibitória I κ B (Burke et al., 2003).

A atividade NF- κ B é regulada por vias de sinalização que dependem de recetores da família do recetor do fator de necrose tumoral (*Tumour Necrose Factor Receptor* – TNFR), tal como o recetor da linfotoxina- β (LT β R) e o RANK. Estes recetores ativam proteínas tais como o fator associado ao recetor do fator de necrose tumoral 6 (TNFR-associated factor 6 - TRAF6), a quinase indutora do NF- κ B (NIK), e a subunidade de NF- κ B RelB, sendo todos cruciais para o desenvolvimento da medula tímica (Takahama, 2006).

Alguns recetores da família TNFR, tais como o RANK, CD40 e LT β R, ativam duas vias distintas do NF- κ B: a via clássica e a via alternativa. Na via clássica, o recetor recruta as proteínas TRAF para induzir a ativação de certas quinases de serina-treonina a jusante, o qual por sua vez ativa o complexo de quinases do I κ B (I κ B kinase – IKK) composta pelas IKK α , IKK β , e NEMO (modulador essencial do NF- κ B). Consequentemente, o complexo IKK fosforila o I κ B α que sequestra o NF- κ B no citoplasma. A fosforilação do I κ B α provoca a sua

degradação pelo complexo de proteossoma 26S-dependente de ubiquitina, o que vai resultar na libertação e translocação de um complexo NF- κ B contendo RelA para o núcleo, dando origem à ativação transcripcional de genes-alvo (ver figura 1.3). Em contrapartida, na via não clássica, o acoplamento dos recetores, induz a estabilização da quinase NIK, que deixa de ser ubiquitinada e degradada pelo complexo de proteínas que inclui as cIAP1/2, a TRAF2, e TRAF3. Normalmente, este complexo degrada a NIK em células não estimuladas. A NIK libertada fosforila a IKK α , que por sua vez fosforila o p100 que após degradação liberta o membro RelB da família NF- κ B, podendo este translocar-se do citoplasma para o núcleo. A fosforilação do p100 provoca a degradação parcial desta proteínas originando uma proteína mais pequena designada de p52, levando à translocação nuclear do complexo RelB/p52, para induzir a expressão de genes-alvo (ver figura 1.3) (Akiyama et al 2012).

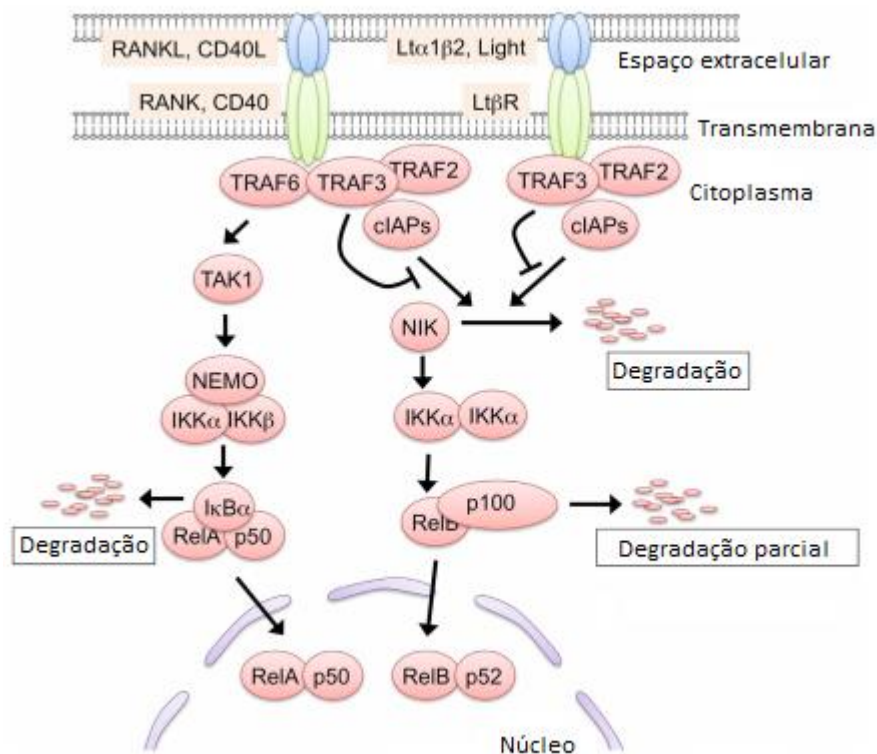


Figura 1.3: As duas vias de ativação do NF- κ B induzido pela sinalização do RANK, CD40 e LT β .

A sinalização RANK, CD40, ou LT β R são capazes de ativar a via NF- κ B alternativa (lado esquerdo). O TRAF6 medeia a ativação do NF- κ B, podendo induzir a expressão do RelB. No entanto, o LT β R também pode ativar a via clássica (adaptado de Akiyama et al., 2012).

A ligação dos ligandos da família do TNF às proteínas da família do recetor TNF (*TNF receptor family* - TNFRF) leva a várias respostas celulares, tais como proliferação, diferenciação, respostas inflamatórias, e apoptose. Vários membros das TNFRF ativam fatores de transcrição da família NF- κ B, assim induzindo a expressão dos genes necessários para estas

respostas celulares. Várias evidências têm indicado que os membros da sinalização TNFRF RANK, CD40 e LT β R desempenham papéis críticos no desenvolvimento e função das mTEC (Akiyama et al., 2012).

As TRAFs são proteínas citoplasmáticas adaptadoras que se ligam a domínios intracelulares de vários recetores da superfamília TNF. Um dos membros desta superfamília, o RANK, contém três supostos domínios de ligação TRAF, e um dos papéis mais importantes na sinalização RANK-RANKL é a ativação do NF- κ B (Wada et al., 2006).

I.3.2.3 Via NFAT

O fator nuclear das células T ativadas (NFATc1, também chamado de NFAT2), que é ativado pela fosfatase calcineurina, foi identificado como um dos alvos a jusante do RANK. (Wada et al., 2006) A expressão do RANKL, que é um indutor da via NFAT durante a diferenciação dos osteoclastos, depende por sua vez das vias NF- κ B e c-Fos, (Leibbrandt e Pen-ninger, 2008), sendo estas importantes para os osteoblastos, formação do osso, controlo da ativação de linfócitos e desenvolvimento da válvula cardíaca (Wada et al., 2006).

Estudos mostraram que as oscilações da concentração do cálcio (Ca²⁺) mediadas pelo RANKL são críticas para a diferenciação terminal de osteoclastos. O NFATc1 é ativado através da via calcineurina, que é por sua vez dependente de Ca²⁺ (ver figura 1.4) (Leibbrandt e Penninger, 2008). Várias proteínas da família dos fatores associados aos recetores TNF (TRAF), associam-se ao domínio citoplasmático do RANK, e transmitem a estimulação do RANK para o NF- κ B (Wada et al., 2006).

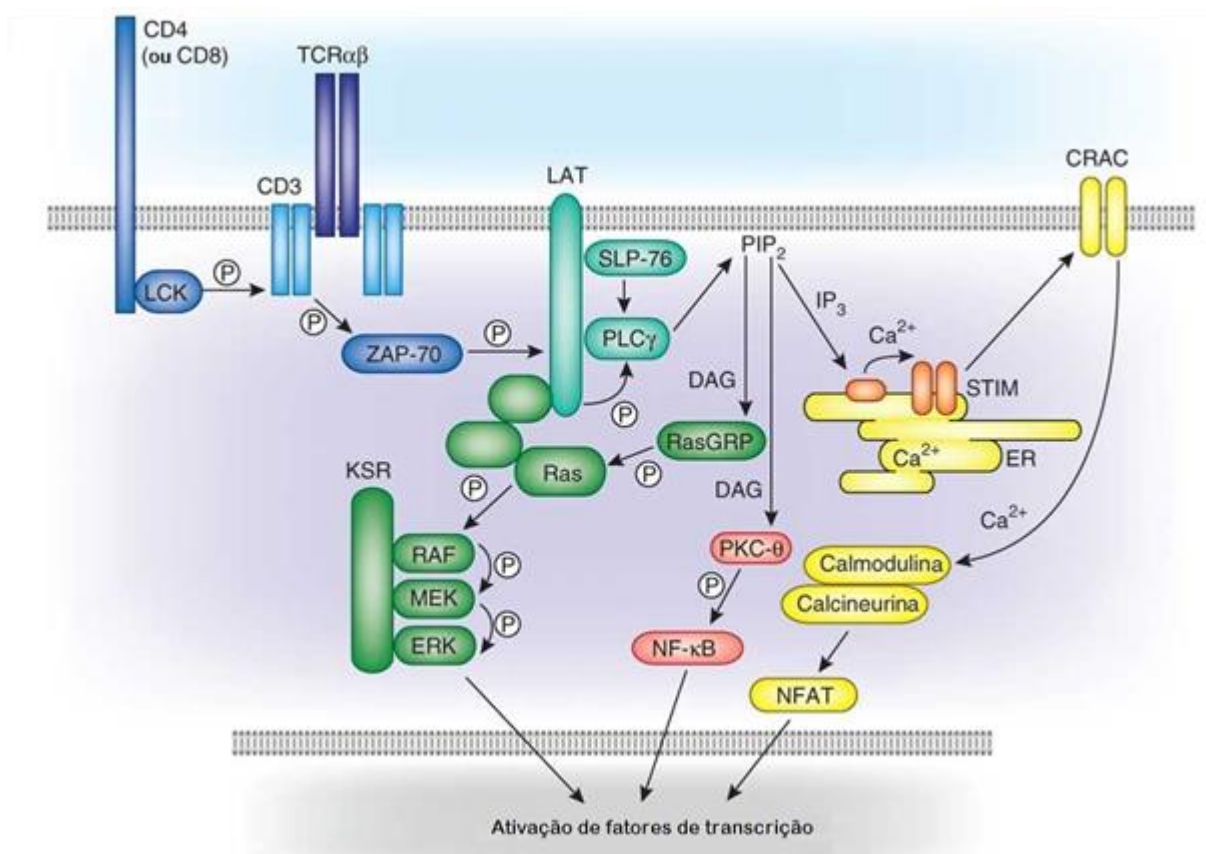


Figura 1. 4 Via de sinalização do TCR.

Via de sinalização pelo Ras-ERK (a verde), ativação do fator de transcrição NF-κB (a rosa) pelo PKC, ativação da via NFAT mediada pelo fluxo Ca^{2+} . (Adaptado de Morris e Alan, 2012)

I.3.2.4 Via Jak/STAT

As quinases JAK e os fatores de transcrição STAT desempenham um papel importante em processos biológicos como a apoptose, diferenciação, proliferação e respostas celulares imunitárias mediadas por fatores de crescimento e citocinas (Cardoso et al., 2008).

Apesar das STATs (*signal transduction and activator of transcription*) serem raramente mutadas no cancro, são frequentemente sobre-expressas e sobre-ativadas por alterações a montante das vias de sinalização, participando na oncogénese através da sobre-expressão de genes que codificam inibidores de apoptose (Mcl-1, Bcl-x) e reguladores do ciclo celular (ciclinas D1/D2, C- Myc). Apesar de ser uma família de 7 proteínas, somente a STAT1 e STAT5 foram relatadas como estando constitutivamente ativas na LLA-T primária (Cardoso et al., 2008). A ativação desta via pode ocorrer em resposta a citocinas e fatores de crescimento presentes em microambientes leucémicos, assim contribuindo para a progressão da LLA-T (Cardoso et al., 2008).

I.3.3 Fatores do microambiente

Microambientes ou nichos são estruturas espaciais especializadas, onde as células estaminais ou progenitoras estão localizadas, e onde recebem estímulos críticos que suportam a sua diferenciação e função (Lai e Kondo, 2008). Sabe-se que os fatores microambientais podem contribuir para a progressão tumoral. Alguns fatores como a IL-7 são produzidos no timo e na medula óssea, que por sua vez são os microambientes onde se desenvolve e expande a LLA-T. Estes microambientes têm então um potencial para modular o crescimento da leucemia (Silva et al., 2011).

Na LLA-T a IL-18, outro fator microambiental, aumenta e atua como um fator proliferativo de células tumorais (Uzan et al., 2014). O IGF1R também é um fator microambiental que medeia sinais de crescimento e sobrevivência importantes nas células LLA-T, tendo um papel crucial na manutenção do volume populacional das células (Medyouf et al., 2011).

I.3.4 Terapias

A LLA-T é caracterizada por um número elevado de leucócitos no sangue, sendo mais frequente em sujeitos do sexo masculino e comumente associada a um melhor prognóstico em crianças. De referir, no entanto, que o cariotipo também é um indicador muito importante no diagnóstico deste tipo de leucemia (Harrison, 2001; Pui et al., 2008).

Análises a estimativas de sobrevivência livre de eventos realizados em crianças, revelaram melhores resultados em crianças entre os 1 e os 9 anos, em relação a outras crianças ou adolescentes. Um relatório do Grupo de Oncologia Infantil revelou que crianças com obesidade e com leucemia linfoblástica aguda de idades superiores a 10 anos têm pior resposta aos tratamentos. Todavia, o progresso constante no desenvolvimento de tratamentos eficazes, tem conduzido a uma taxa de cura de mais de 80% em crianças (Pui et al., 2008).

Pacientes com leucemia ainda são tratados com altas doses de quimioterapia seguida por um transplante de células estaminais hematopoéticas. Porém, este tratamento é extremamente agressivo e está associado a uma toxicidade aguda severa e efeitos secundários a longo prazo, incluindo o desenvolvimento de tumores secundários mais tarde (Durinck et al., 2015; Pui et al., 2008; Mackall et al., 2014).

As terapias direcionadas estão a ser, cada vez mais, de extrema importância, pois permite abolir a quimioresistência a drogas usados em regimes terapêuticos. Na LLA-T já foram identificados alguns novos alvos terapêuticos como por exemplo: a via PI3K, onde já foram identificados alguns inibidores para esta via, como o LY294002, Wortmannin e compostos

naturais que aumentam a apoptose e param o ciclo celular (Cardoso et al., 2008); o c-Myc também foi identificado como um gene alvo da via Notch1, sobrerregulado na LLA-T e crítico para o desenvolvimento da leucemia (Weng et al., 2006) e inibidores desta via, Notch, como a γ -secretase (GSI) demonstraram prevenir o crescimento e induzir a apoptose na LLA-T (Cardoso et al., 2008).

I.3.5 Modelo de murganhos TEL-JAK2

Em mamíferos, a família de quinases JAK é composta por quatro membros (JAK1, JAK2, JAK3, e TYK2) sendo estes especificamente ativados em resposta a diferentes citocinas. Os JAKs partilham regiões de homologia, designadas por segmentos de homologia Jak (HJ). (Springuel et al., 2015)

A ativação induzida por citocinas JAK resulta na fosforilação de uma série de resíduos de tirosina, tanto na própria quinase JAK como no domínio citoplasmático do recetor de citocina associado. Estes resíduos de tirosina fosforilados servem como locais de ancoragem para uma variedade de adaptadores e efetores na sinalização intracelular, incluindo membros específicos da família de reguladores transcricionais STAT. O recrutamento das STATs para as JAK resulta na fosforilação de um resíduo de tirosina, o que leva à sua dimerização, migração para o núcleo e também à ligação a elementos de resposta específicas na região promotora do gene-alvo (Lacronic et al., 1997).

A JAK2 é uma quinase predominantemente ativada em resposta à IL-3, fator de estimulação de colônias granulócito-macrófagos, eritropoetina, trombopoetina, IL-5, hormonas de crescimento e prolactina. Evidências demonstraram que a sinalização da quinase JAK2 está diretamente envolvida na leucemia humana (Lacronic et al., 1997).

A doença desenvolvida por murganhos transgênicos HA-TEL-JAK2 (Figura 1.5) é clínica e patologicamente consistente com a leucemia linfoblástica aguda ou linfoma linfoblástico, apresentando células T leucémicas com um fenótipo de diferenciação aberrante (Carron et al., 2000; dos Santos et al., 2007).

Na LLA-T pediátrica, a justaposição entre o gene *JAK2* e o membro da família-ETS, o *TEL*, resulta da translocação cromossômica t(9;12) (p24;p13) e origina uma proteína quimérica TEL-JAK2 constitutivamente ativa (Cardoso et al., 2008). Inicialmente, a fusão do gene *TEL-JAK2* foi identificado numa recidiva de leucemia de células T infantil (Lacronique et al., 1997).

Os murganhos TEL-JAK2 exibem uma expansão seletiva de células T aberrantes CD8-positivas no sangue, nódulos linfáticos, baço, timo, medula óssea e também apresentam uma invasão de órgãos não-hematopoiéticos por células-T leucémicas, que depende da expressão do

TCR α/β (Cardoso et al., 2008; dos Santos et al. 2007; Carron et al., 2000). A expressão direta da TEL-JAK2 na linhagem linfóide induz uma leucemia de células T rápida e fatal em murganhos. Verifica-se que entre as 4 e as 22 semanas de idade, estes, acusam uma transformação preferencial nas células CD8, que sendo uma doença clonal é caracterizada por células leucémicas altamente invasivas, exibindo uma ativação constitutiva das STAT1 e STAT5.

Os timos destes murganhos leucémicos apresentam uma desorganização arquitetural local ou completa, com conjuntos homogêneos de células leucémicas, tanto na área cortical como na área medular (Carron et al., 2000). Foi demonstrado que a leucemia de células T induzida em ratinhos pela TEL-JAK2 se desenvolve a partir de timócitos imaturos e que o complexo pré-TCR coopera com a TEL-JAK2 para induzir uma rápida leucemia de células T. Contudo, para estes murganhos desenvolverem a LLA-T necessitam da ocorrência de eventos genéticos secundários (Carron et al., 2000; dos Santos et al., 2007).

Este modelo de murganhos pode ser útil para identificar eventos moleculares e celulares adicionais que participem e complementem a função essencial da TEL-JAK2 na leucemia (Carron et al., 2000).

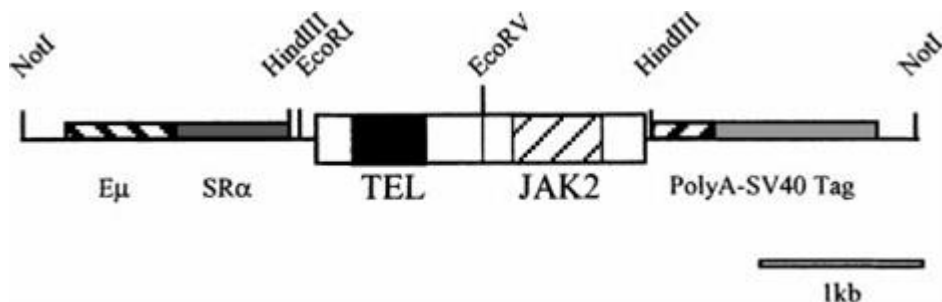


Figura 1. 5: Esquema representativo do transgene HA-TEL-JAK2.

A extremidade 3' do transgene, contém um local de adição de globulina do coelho poli (A). O domínio de auto-associação TEL, está representado por uma caixa preta. E, o domínio HJ1 (domínio catalítico) do JAK2, está representado pela caixa às riscas. (Carron et al., 2000)

I.4 RANK/RANKL

I.4.1 Funcionamento da via

O RANK (também designado recetor ativador do NF- κ B) é expresso à superfície de células dendríticas, monócitos, macrófagos, osteoclastos, células epiteliais do timo e células epiteliais mamárias (Figura 1.6). (Wada et al., 2006; Dougall et al., 1999; Neumann et al., 2005) O RANKL, também conhecido por fator diferenciador de osteoclastos, é expresso na superfície de osteoblastos assim como de osteócitos e células do revestimento do osso. (Singh et al., 2012)

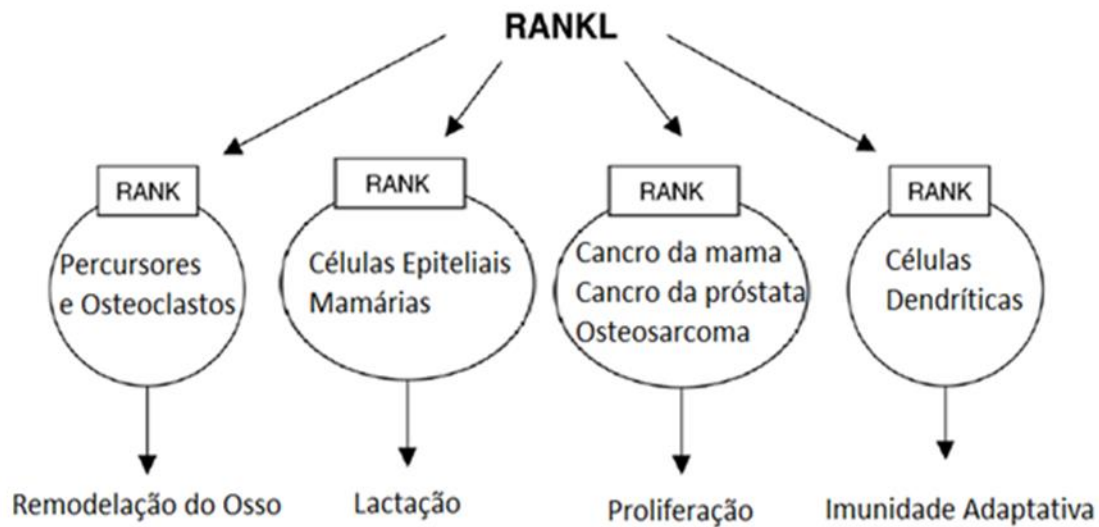


Figura 1. 6 Sistema do RANK/RANKL no osso e outros tecidos.

O RANKL é produzido por uma variedade de tipos celulares e, a sua expressão é regulada por muitos fatores fisiológicos e patológicos. O RANKL pode ser ligado ao OPG e prevenir a interação com o RANK de modo a inibir a formação de osteoclastos. OPG, osteoprotegerina; RANKL, recetor ativador do ligando do fator nuclear κ B. (Adaptado de Boyce e Xing, 2007)

O RANKL na superfície de células osteoblásticas vai ligar-se ao RANK através do contacto célula-a-célula, desencadeando a sinalização dos precursores dos osteoclastos, sendo considerado um ponto determinante na osteoclastogénese (Figura 1.7). (Aoki et al., 2010; Leibbrandt e Penninger, 2008) A ligação do RANKL ao seu recetor RANK fornece o sinal crucial para o desenvolvimento, sobrevivência, diferenciação e ativação dos osteoclastos maduros. Por outro lado, outra proteína da superfamília TNFR, o OPG, regula negativamente a ligação do RANK ao RANKL e portanto inibe a renovação óssea pelos osteoclastos (Figura 1.7) (Kholza, 2001; Wada et al., 2006). O OPG funciona como um recetor-chamariz solúvel de alta afinidade para o RANKL, concorrendo com o RANK para a ligação com o RANKL, (Neumann et al., 2005; Pérez-Sayáns et al. 2010) inibindo assim a diferenciação de precursores osteoclásticos em osteoclastos maduros (Fili et al., 2009).

Após o RANKL se ligar ao RANK em precursores osteoclásticos dá-se a ligação do TRAF a locais específicos no domínio citoplasmático do recetor RANK, sendo o TRAF6 o mais importante na osteoclastogénese mediada pelo RANK (Figura 1.7). Quatro dessas vias de sinalização medeiam a osteoclastogénese (inibidor da quinase NF- κ B (IKK)/NF- κ B, c-jun quinase amino-terminal (JNK) /ativador da proteína-1 (AP-1), c-myc, e calcineurina/fator nuclear de células T ativas (NFATc1)) (Boyce e Xing, 2007).

Com isto, o equilíbrio entre a sinalização RANK/RANKL e os níveis de OPG regulam o desenvolvimento e ativação de osteoclastos, estando fortemente envolvidos no metabolismo do osso. A inibição da função do RANKL através do OPG pode evitar a destruição óssea em inúmeras doenças (Neumann et al., 2005).

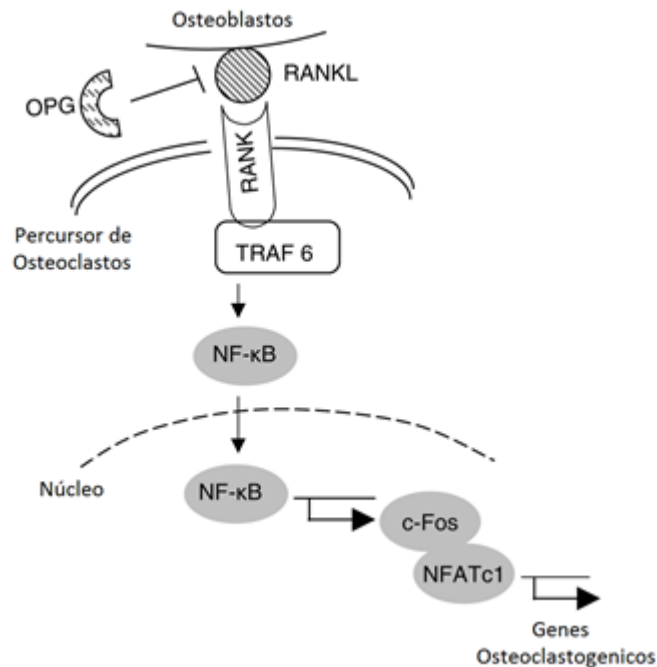


Figura 1. 7 Via de sinalização para a osteoclastogênese normal.

Sob condições fisiológicas, o RANKL produzido por osteoblastos vai-se ligar ao RANK, na superfície de precursores de osteoclastos e, recruta o adaptador da proteína TRAF6, levando à ativação do NF-κB, com a sua translocação para o núcleo. O NF-κB, aumenta a expressão de c-Fos e, interage com o NFATc1, para desencadear a transcrição de genes osteoclastogênicos. O OPG, inibe a iniciação do processo, pela ligação ao RANKL. NFAT, fator nuclear de células T ativadas; NF-κB, fator nuclear-κB; OPG, osteoprotegerina; RANKL, ligando do recetor ativador do fator nuclear-κB; TRAF, recetor do fator de necrose tumoral associado (adaptado de Boyce e Xing, 2007).

I.4.2 OPG

O OPG (osteoprotegerina) é uma molécula que pertence à família TNFRs (Neumann et al., 2005), é produzido por osteoblastos, células estromais e linfócitos (Fili et al., 2009; Wada et al., 2006; Neumann et al., 2005) (ver figura 1.6), e é expresso não só no osso como num vasto número de sistemas celulares e tecidos, como por exemplo os pulmões, fígado, baço, timo, próstata, ovário, gânglios linfáticos, testículos e medula óssea (Fili et al., 2009; Wada et al., 2006; Neumann et al., 2005; Pérez-Sayáns et al. 2010).

Estudos descobriram que o OPG se liga especificamente e com alta afinidade ao RANKL e que a regulação deste mecanismo acontece pela triagem no aparelho de Golgi. (Aoki et al.,

2010; Neumann et al., 2005) Esta proteína tem como função regular o tráfego do RANK, sendo assim crucial para a regulação da osteoclastogênese (Aoki et al., 2010).

I.4.3 Funções

A descoberta de que o RANKL é produzido por células T ativadas, que por sua vez podem induzir diretamente a osteoclastogênese, tem proporcionado um novo paradigma molecular para a perda óssea associada a doenças com envolvimento do sistema imunitário. Foi nomeadamente demonstrado que o RANKL é absolutamente necessário para o desenvolvimento de osteoclastos *in vivo* (Leibbrandt e Penninger, 2008).

Desequilíbrios entre as atividades dos osteoclastos e dos osteoblastos podem surgir a partir de uma variedade de alterações hormonais, perturbações inflamatórias ou certos fatores de crescimento. Estes desequilíbrios podem resultar em anomalias esqueléticas caracterizadas pela diminuição (osteoporose) ou aumento (osteopetrose) da massa óssea (Kong et al., 1999; Wada et al., 2006, Leibbrandt e Penninger, 2008).

Está provado que a remodelação e a perda do osso são controladas pelo eixo RANK-RANKL-OPG (Leibbrandt e Penninger, 2008). As células T ativadas têm um papel central na reabsorção óssea através da regulação positiva do RANK, sublinhando a sua importância como mediador crucial da perda óssea *in vivo* (Leibbrandt e Penninger, 2008). Estudos revelaram um novo paradigma demonstrando que as células imunológicas funcionam como reguladores da fisiologia óssea, dando origem a um novo campo de investigação, o da osteoimunologia, para explicar a interação entre o sistema imune adaptativo e o metabolismo ósseo (Leibbrandt e Penninger, 2008).

A expressão do mRNA do RANKL pode ser detetado em queratinócitos da pele, células epiteliais da glândula mamária, coração, músculo esquelético, pulmões, estômago, placenta, glândula da tiroide e cérebro (Leibbrandt e Penninger, 2008; Wada et al., 2006). No entanto, a maior fonte de RANKL é a superfície do osso, nos osteoblastos bem como nos osteócitos derivados de osteoblastos e células do revestimento do osso (Singh et al., 2012).

Esta proteína também é crucial para o desenvolvimento inicial dos linfócitos e organogénese de gânglios linfáticos (Wang et al., 2001). Tanto o RANKL como o RANK, são expressos no timo. O RANKL é expresso em timócitos SP (CD4⁺ ou CD8⁺) e o RANK é expresso em células epiteliais do timo (Dougall et al., 1999). Estudos já descreveram que murganhos mutantes para o gene *Rank*, aparentemente, exibem um desenvolvimento normal de timócitos (Leibbrandt e Penninger, 2008). No entanto, a ausência de *Rank* perturba o desenvolvimento de células epiteliais do timo, que por sua vez são importantes para o

desenvolvimento de linfócitos T, tolerantes a antígenos próprios (Hikosaka et al, 2008; Akiyama et al, 2012).

I.4.3 RANK /RANKL no cancro

A doença óssea metastática é uma complicação potencialmente debilitante ocorrendo em cerca de 20-75% dos pacientes com tumores sólidos avançados. As metástases ósseas enfraquecem a integridade estrutural do osso colocando os pacientes em alto risco de eventos relacionados com o esqueleto. Isto inclui fraturas patológicas, compressão da medula espinal, colapso vertebral e hipercalcemia maligna levando à necessidade de radioterapia paliativa ou cirurgia óssea (Costa et al., 2013). Nestes pacientes as metástases representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Confirma-se que o microambiente do osso proporciona as condições necessárias para o crescimento de muitos tipos de tumores humanos (Fili et al., 2009).

Foi demonstrado que os tumores ósseos malignos e benignos primários têm uma taxa de expressão elevada para o RANKL/OPG, especialmente em pacientes que sofrem de tumores associados a osteólise (Wittrant et al., 2004). Estudos já demonstraram que células do cancro da mama e da próstata podem ser funcionalmente afetados pelo microambiente local e que fatores específicos como o RANKL podem agravar o seu potencial metastático (Casimiro et al., 2013). Demonstraram ainda que esta via está envolvida tanto no desenvolvimento de células estaminais mamárias como de células de cancro da mama, assim promovendo a iniciação do tumor, progressão e metastização de células epiteliais mamarias humanas. (Casimiro et al., 2013)

Dados também mostraram que as células tumorais podem produzir RANKL, atuando diretamente na diferenciação e ativação dos osteoclastos, como descrito no mieloma múltiplo, cancro da próstata, linhas celulares de carcinoma ou neuroblastoma humano. O RANKL expresso por linfócitos T ou diretamente pelas células cancerígenas liga-se ao seu recetor RANK na superfície dos precursores osteoclastos. A reabsorção osteoclástica, por sua vez, liberta fatores de crescimento a partir da matriz do osso, os quais podem ativar as células tumorais (Wittrant et al., 2004).

Foi levantada a hipótese do anticorpo RANKL humanizado ser o inibidor mais eficaz contra metástases ósseas, em detrimento de outras drogas dirigidas aos osteoclastos. Esta proteína também tem sido descrita como atuando numa fase precoce do desenvolvimento do

tumor, promovendo a tumorigênese. Por conseguinte, a inibição do RANKL poderá conferir uma capacidade preventiva (Tan et al., 2011).

O Denosumab, um anticorpo monoclonal dirigido contra o RANKL, inibe a ligação entre o RANK e o seu ligando, RANKL (Schmiedel et al., 2013). Tem sido utilizado em pacientes nos Estados Unidos e na Europa para prevenir complicações ósseas em pacientes com tumores sólidos. Contudo, o mesmo não se verifica em pacientes com mieloma múltiplo (Costa et al., 2013).

I.4.4 Deleção condicional do RANK em células epiteliais com expressão de queratina 5 positivas

Os genes *knockout* fornecem uma ferramenta poderosa para identificar e caracterizar a função de um gene, pela manipulação do genoma de murganhos, através de recombinação homóloga nas células estaminais embrionárias. Alvejar um gene condicionalmente usando o sistema de recombinação mediado por Cre/loxP oferece uma nova abordagem para determinar a função do gene. A expressão da enzima Cre pode ser confinada a certos tecidos em linhas de murganhos transgênicos, através de promotores específicos para os tipos de células em estudo. Com isto, a recombinase Cre pode reconhecer sítios loxP e catalisar a recombinação específica de um segmento génico ou genómico numa célula ou tecido específico. Assim, este modelo de murganhos transgênicos, onde a recombinase Cre é induzida, facilita ainda mais a análise do gene *knockout* condicional e permite o estudo da função do gene em células e momentos específicos de forma altamente controlada (Liang et al., 2009).

A queratina 5 (K5), um membro de queratinas do tipo II, é expressa em parceria com uma queratina do tipo I, queratina 14 (K14), em células epiteliais do timo e na camada basal do epitélio escamoso estratificado da pele. Liang et al., demonstraram que utilizando o promotor do gene da K5, a expressão do gene repórter controlado por este, em murganhos transgênicos, recapitula os perfis de expressão da K5 endógena no epitélio basal.

I.5 OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho está focado no potencial envolvimento da via de sinalização RANK/RANKL na leucemia de células T, uma vez que vários estudos já demonstraram que tanto o recetor como o ligando podem ser expressos, respetivamente, em células cancerígenas

e linfócitos T ativados. Para este propósito, foram utilizados modelos de murganhos TEL-JAK2, a linha celular EL4.2 e murganhos K5-CRE/Rank Flox.

Os objetivos principais deste estudo são:

1. Determinar os níveis de expressão de RANKL em células T leucémicas:
 - 1.1 Estudar a expressão do mRNA de RANKL em células T leucémicas de murganhos TEL-JAK2 e comparar com timócitos de estirpe selvagem por RT-PCR quantitativo.
 - 1.2 Verificar a expressão da proteína RANKL tanto à superfície como no interior das células de murganhos TEL-JAK2 e comparar com células de estirpe selvagem por imunofluorescência em citometria de fluxo.
2. Analisar como a expressão do gene *RankL* é modulada pela estimulação da sinalização do TCR:
 - 2.1 Verificar a expressão de RANKL em células de órgãos linfoides em modelo de murganhos TEL-JAK2 e em células da linha celular de linfoma EL4.2, por citometria de fluxo, quando colocadas em cultura com ativadores da via de sinalização do recetor TCR (PMA, Ionomicina e PHA).
 - 2.2 Verificar a expressão de RANKL por citometria de fluxo em células leucémicas TEL-JAK2 quando postas em culturas com inibidores da via de sinalização TCR, como o caso do inibidor IKK (BMS-345541) e Actinomicina D.
3. Por último, queremos verificar se a expressão de RANKL à superfície das células depende da expressão do RANK em células microambientais.
 - 3.1 Para se obter murganhos *knockout* para o gene *Rank*, K5-CRE⁺/ Rank^{F/F}, quisemos realizar cruzamentos entre murganhos de estirpe K5-CRE e estirpe Rank Flox.
 - 3.2 Verificar a expressão da proteína RANKL, por citometria de fluxo, em timócitos de murganhos K5-CRE⁺/ Rank^{F/F} e comparar com timócitos de murganhos de estirpe selvagem.
 - 3.3 E ainda, queremos verificar a expressão da proteína RANKL por citometria de fluxo em células leucémicas transplantadas em murganhos K5-CRE⁺/ Rank^{F/F} e K5-CRE⁺/ Rank^{+F}.

O objetivo deste trabalho centrou-se na aquisição de mais e melhor informação sobre os mecanismos da via de sinalização RANK/RANKL na LLA-T e, por outro lado, responder à

questão sobre se o RANKL desempenha ou não um papel importante no desenvolvimento deste tipo de leucemia em humanos, de forma a elaborar estratégias terapêuticas dirigidas contra a sinalização RANK/RANKL.

CAPITULO II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 Manutenção e cruzamento de murganhos geneticamente modificados

Para este estudo foram utilizados:

- 1) Murganhos (espécie *Mus musculus*) transgênicos E μ SR α -TEL-JAK2 (Carron et al., 2000) que expressam a proteína de fusão TEL-JAK2 em células de linhagem linfóide, que foram fornecidos pelo Dr. Jacques Ghysdael (Institut Curie, França);
- 2) Murganhos mutantes Rank-floxed (Hanada et al., 2009), que contêm sequências loxP a flanquear os exões 2 e 3 do gene *Tnfrsf11a*, foram fornecidos pelo Dr. Josef Penninger (IMBA, Áustria);
- 3) Murganhos transgênicos Tg.K5-Cre (Tarutani et al., 1997), que expressam a recombinase Cre em células epiteliais do timo e da pele, fornecidos pela Dra. Paula Martinez (CNIO, Espanha) com autorização do Dr. Junji Takeda (Universidade de Osaka, Japão).

Para verificar o papel da sinalização do RANK, no desenvolvimento e progressão de células T, inativamos o recetor *Rank*. Como a inativação do gene *Rank* leva a uma série de anomalias graves, no desenvolvimento pós-natal do osso, usámos uma estirpe de murganhos “knockout” condicional para inativar este gene só em células epiteliais que expressem queratina 5 (K5). Murganhos transgênicos K5-Cre expressam a recombinase Cre em queratinócitos e células epiteliais do timo, por isso a inativação do *Rank* será limitada a apenas alguns tipos de células, permitindo assim um desenvolvimento normal dos murganhos sem o aparecimento de anomalias ósseas (Hanada et al., 2009). Para obtermos murganhos *Rank knockout* realizámos cruzamentos entre murganhos da estirpe Rank-flox e murganhos da estirpe K5-CRE obtendo, no final, murganhos K5-CRE⁺/Rank^{Flox/Flox}. Nestes animais, devido à presença de sequências loxP a flanquear os exões 2 e 3 do gene *Tnfrsf11a*, estes serão especificamente eliminados pela recombinase CRE expressa em células da pele e do timo, (ver figura 2.1) (Hanada et al., 2009 e Tarutani et al., 1997).

Todos os murganhos foram mantidos no Biotério CBMR/UA1g (Faro, Portugal) e, sendo que todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da comissão Europeia (2010/63/UE) e da Direção-Geral da Alimentação e Veterinária (Decreto-Lei nº113/2013), para o cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os murganhos (estirpe selvagem, transgênicos e mutantes) foram sacrificados por inalação de CO₂. Murganhos portadores do transgene TEL-JAK foram mortos após aparecimento de sinais de doença, como

dispneia causada pela expansão maciça de células leucémicas no timo ou fraqueza causada pela disseminação de células leucémicas em órgãos vitais, como a medula óssea, pulmões e fígado.

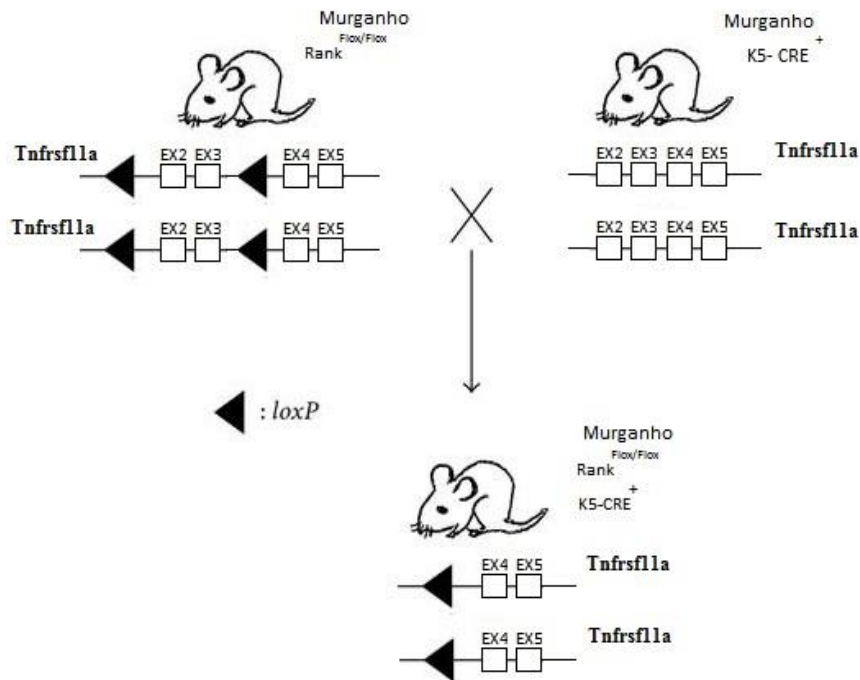


Figura 2. 1 Diagrama esquemático de como gerar um murgancho *knockout* condicional.

Para gerar um murgancho *knockout* condicional para o gene *Rank* realizaram-se cruzamento entre murganchos K5-CRE⁺ (em cima do lado direito) com murganchos que sejam homocigóticos para o alelo flox (em cima do lado esquerdo). Os murganchos *knockout* são homocigóticos para o alelo flox e positivos para a recombinase CRE, enquanto que os murganchos da estirpe selvagem são CRE⁻ (não apresentados na figura), e são obtidos por genotipagem, como descrito no ponto II.2.

II.2 GENOTIPAGEM DE MURGANHOS

A genotipagem foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA genómico, extraído da ponta da cauda do respetivo murgancho. Em primeiro lugar, a cauda foi digerida a 55°C durante a noite usando 100 µg/ml de proteinase K em 500 µl de solução-tampão de lise [200 mM NaCl, 100 mM Tris.HCl (pH8.3), 5 mM EDTA, 1% Triton X-100]. Após a dissociação completa da cauda, inativou-se a proteinase K por incubação a 90°C durante 10 minutos. Em seguida fez-se a purificação do DNA das amostras: centrifugou-se a 14000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf contendo 500 µl de isopropanol e voltou-se a centrifugar durante 10 minutos a alta velocidade para obter o DNA precipitado como *pellet*. Descartou-se o sobrenadante por inversão do tubo e adicionou-se 500 µl de etanol a 70% seguindo-se nova centrifugação durante 3 minutos a alta velocidade.

O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA resuspendido em 200 µl de solução-tampão TE (pH 8) [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA] para dissolver o DNA. Quando não utilizadas imediatamente, as amostras foram armazenadas a 4°C.

A amplificação por PCR foi feita usando uma mistura que continha 2 µl do DNA extraído, 2,5 µl de 10X Tampão DreamTaq (que já inclui 20 mM de MgCl₂) (Thermoscientific), 0,5 µl de mistura de nucleótidos (dNTP), 0,5 µl de cada primer, (indicados na tabela 2.1), 0,1 µl de Taq polimerase de DNA (Thermoscientific), e água MilliQ esterilizada para completar o volume total de 25 µl. A amplificação foi realizada no aparelho C1000 ThermalCycler (Bio-Rad) sob condições que estão descritas também na tabela 2.1.

Em seguida, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose (Lonza) (entre 1% e 2% de agarose, dependendo do peso molecular dos produtos de PCR a analisar) em Tampão TAE (40 mM Tris base, 40 mM ácido acético, 1 mM EDTA), corados com Green SafePremium (Nzytech) e visualizados através de luz UV. A interpretação dos resultados foi feita como indicado na tabela 2.1.

Tabela 2. 1: Primers e condições de PCR utilizados na genotipagem

Gene de rato	Primers	Sequência de primers	Produto PCR	condições de amplificação por PCR	
Rank Flox	Rank-Int3 Forward	5'-CTGGTGGTTGTTCTCCTGGTGTCAT-3'	Alelo selvagem	256 bp	95°C 5 minutos
	Rank-Int3 Reverse	5'-AGTGTGCCTGGCATGTGCAGACCTT-3'	Alelo flox	390 bp	95°C 30 segundos
	Rank-Int1 Forward	5'-GGCAGAACTCGGATGCACAGATTGG-3'	Alelo deletado	566 bp	60°C 45 segundos 35 ciclos 72°C 45 segundos
K5-CRE	CRE-3Forward	5' CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG 3'	K5-CRE +	642 bp	72°C 5 minutos
	CRE-3 Reverse	5' CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG 3'			95°C 8 minutos
					94°C 30 segundos
					60°C 45 segundos 30 ciclos
					72°C 1 minuto
					72°C 10 minutos

II.3 RECOLHA DE AMOSTRAS DE CÉLULAS DO TIMO E LISE CELULAR

Os órgãos linfóides foram recolhidos de murganhos sacrificados, pesados e mantidos numa solução de Tampão salino de fosfato (Phosphate buffered saline – PBS) (LONZA) estéril a 4°C durante o menor tempo possível, até ao seu processamento. O timo ou um fragmento deste, foi colocado num 1 ml de reagente de Trizol (Invitrogen) para a extração de RNA. Para dissolver os tecidos, fizeram-se consecutivas passagens através de uma ponta do pipetador de 1000 µl, seguido de uma seringa com agulhas estéreis de diâmetro interno cada vez menor (21G, 23G, e 26G). Depois, as amostras em Trizol (Invitrogen) foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, para permitir a dissociação completa dos complexos núcleo proteicos. As amostras em Trizol assim obtidas foram colocadas a -80°C para serem conservadas até à sua utilização.

II.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi extraído usando o reagente de Trizol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Em primeiro lugar, adicionou-se 200 µl de clorofórmio (BDH Prolabo) por ml de Trizol a cada tubo preparado no ponto anterior, agitou-se vigorosamente durante 15 segundos e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugou-se as amostras (Centrifuga 3K15, Sigma) a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µl de isopropanol (BDH prolabo) para precipitar o RNA, misturou-se cuidadosamente e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000xg durante 10 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 ml de etanol a 75% (livre de RNase) e agitou-se no vortex. As amostras foram de novo centrifugadas a 7500xg durante 15 minutos a 4°C e os *pellets* obtidos foram deixados a secar em vácuo à temperatura ambiente entre 5 a 10 minutos. De seguida, os *pellets* foram dissolvidos em 50 µl de água tratada com DEPC (livre de Rnases), seguindo-se uma incubação a 55°C. As amostras assim obtidas foram armazenadas a longo prazo a -80°C.

A quantidade de RNA total de cada amostra foi avaliada pela determinação da densidade ótica no espectrofotómetro Nanodrop 2000c (ThermoScientific) e a sua qualidade foi avaliada através da migração de bandas num gel de agarose. Para tal, 2 µl de cada amostra de RNA foi

diluída em 8 µl de água tratada com DEPC em microtubos estéreis, ao qual se adicionou 2 µl de solução de carregamento com corante Orange (6X). Carregou-se cada poço do gel com 12 µl das diferentes amostras. De seguida migrou-se num gel de agarose a 120 V durante 30 minutos. Finalmente, recorrendo ao aparelho Syngene GeneFlash, verificou-se a fluorescência das bandas e, estando o RNA intacto, visualizando-se claramente 3 bandas correspondentes ao RNA ribossomal (28S, 18S, e 5S).

II.5 ELIMINAÇÃO DE DNA CONTAMINANTE NAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL

O DNA genómico contaminante em amostras de RNA total foi removido pela digestão com DNase I (Fermentas). Ao volume correspondente a 1 µg de RNA total previamente extraído foi adicionado 1 µl de reação tampão 10X com MgCl₂, 1 µl DNase I livre de RNase (1U/ µl) e água tratada com DEPC para perfazer o volume de 10 µl. De seguida, as amostras foram agitadas e sujeitas a uma breve centrifugação, seguindo-se a incubação a 37°C durante 30 minutos. Para inativar a enzima no final da reação, adicionou-se 1 µl de 25 mM EDTA e as amostras foram sujeitas a nova incubação durante 10 minutos a 65°, sendo posteriormente transferidas para gelo.

II.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

As amostras de RNA preparadas como descrito em II.2 a II.4 foram processadas utilizando o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific) para se obter o DNA complementar (cDNA). Para este fim, adicionou-se 1 µl de oligo(dT)₁₈ primer (0,5 µg/ µl) a 11 µl de amostra de RNA, preparado como descrito no ponto anterior. Incubou-se as amostras a 70°C durante 5 minutos e posteriormente arrefeceu-se em gelo. Nesta fase adicionou-se os seguintes componentes: 4 µl de tampão de reação 5X, 1 µl de inibidor de ribonucleases RiboLock (20U/µl) e 2 µl da mistura de 10 mM de dNTP. Após este procedimento, a mistura foi centrifugada para recolher todo o conteúdo no fundo do tubo, e em seguida incubou-se a 37°C durante 5 minutos. Depois adicionou-se 1 µl de RevertAid M-MuLV Transcritase (200U/µl) e incubou-se a mistura durante 60 minutos a 42°C. A reação foi terminada aquecendo a mistura a 70°C durante 10 minutos, seguindo-se o arrefecimento em gelo.

Preparou-se séries de 3 diluições (1/10, 1/20 e 1/40) do produto original do RT em água estéril desionizada. As amostras assim obtidas foram armazenadas a -20°C, a curto prazo, até serem usadas para amplificação por PCR.

II.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVO (RT-qPCR)

Para quantificar a expressão de *RankL*, o cDNA preparado como descrito em II.6 foi amplificado recorrendo à reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo, utilizando *primers* específicos indicados na Tabela 2.2. Para este propósito foi usado Máxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermoscientific).

As reações de PCR foram preparadas em micro-placas de 96 poços (ThermoScientific). Os 23 µl da mistura principal continham: 2X mistura principal Máxima SYBR Green/ROX qPCR, 0,3 µM de cada *primer* e um volume de água desionizada estéril para completar o volume de 23 µl, ao qual foi adicionado 1 µl de cDNA de cada amostra, diluído a 1/20. Os poços foram selados com papel adesivo B Microseal® (Bio-Rad). O PCR foi realizado usando um ThermalCycler C1000 (BioRad) associado a um sistema de deteção de PCR a tempo real CFX 96, efetuado sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos seguido de emparelhamento a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Água estéril foi usada como controlo negativo. Os resultados de PCR foram analisados pelo software CFX Manager (Bio-Rad), versão 1.6, e tratados com o método comparativo C_T (método $2^{-\Delta\Delta C(T)}$) relacionado com o número ciclos necessários para a deteção limiar de cada produto PCR e normalizado para expressão de *Hprt1* (gene de referência) como controlo endógeno. (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 2. 2: Sequências de *primers* utilizados em RT-qPCR

Gene de rato	Primer	Sequência de primers	Produto PCR
	mHprt1		
Hprt1	Forward	CGCCTCCCGCTCCATGTTCC	249 bp
	Reverse	GTCCTTCTGCACGGCCCCC	
	mRankl-MF		
RankL	Foward	CGCCTCCCGCTCCATGTTCC	257 bp
	Rverse	GTCCTTCTGCACGGCCCCC	

Hprt1, Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase; RANKL, ligando do recetor ativador do fator nuclear kapa B.

II.8 LINHAS CELULARES

Para este trabalho foi selecionada a linha celular linfoblastóide EL4.2 isolada de um linfoma de linfócitos T de murganho.

II.9 CÉLULAS PRIMÁRIAS

As suspensões celulares primárias foram preparadas a partir de timos e baços de murganhos TEL-JAK2; K5-CRE/Rank-Flox e murganhos do tipo selvagem, dissociando o órgão contra um filtro celular Falcon® 70 µm (BD Biosciences) com a ajuda de um êmbolo, ambos estéreis, e lavado com uma solução estéril de PBS.

Para determinar a concentração e número de células, pipetou-se 20 µl de suspensão celular para um tubo eppendorf e adicionou-se 10 µl de azul de tripano a 5% (Sigma). As células viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer (Optik Labor). A equação para determinar o número de células por milímetro quadrado é a seguinte:

$$N \text{ células por ml (suspensão)} = \text{células / quadrado (cada quadrado tem } 9 \text{ mm}^2 \text{ de área)} \times 10^4 \times \text{fator de diluição (azul de tripano e diluições a partir da suspensão original)}$$

II.10 CULTURAS CELULARES

Como culturas celulares para estudar a expressão de RANKL utilizámos a linha celular EL4.2 e células primárias TEL-JAK2 e K5-CRE/Rank Flox.

O isolamento e a dissociação dos órgãos linfóides das células primárias foram feitos com PBS.

As células EL4.2 foram mantidas em meio RPMI-1640 (LONZA), suplementado com 10 % de Soro fetal bovino (*fetal bovine serum* - FBS), Penicilina (100 unidades/mL)/Estreptomicina (100 µg/mL) e 2 mM L-glutamina e diluídas regularmente com meio de cultura fresco de forma a manter a concentração celular abaixo de 1×10^6 células/ml. Primeiro, dissociaram-se os agregados de células pipetando várias vezes a cultura com o auxílio de uma pipeta de 10 mL, seguindo-se a contagem das células, como descrito no ponto II.9.

Para o isolamento de células primárias foi utilizado o procedimento descrito no ponto II.9.

O volume correspondente a 2×10^6 de células foram suspensas em 10 ml de meio RPMI-1640 (LONZA) suplementado e transferido para placas de 6 poços, onde cada poço continha 1,5 ml. As células foram estimuladas com 10 ng/ml de Forbol 12-miristil 13-acetato (PMA) (SIGMA), 250 ng/ml de Ionomicina (SIGMA), 5 µg/ml de Fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA), 10 µM de inibidor IKK (BMS-344501) (CALBIOCHEM), ou 1 ng/ml Actinomicina D (SIGMA), conforme indicado, e incubou-se a 37°C numa atmosfera humidificada de CO₂ a 5% durante 18 CO.

II.11 CITOMETRIA DE FLUXO

II.11.1 Detecção de proteínas à superfície celular

Um volume contendo 1×10^6 células foi transferido para um tubo de poliestireno de 5 ml com fundo redondo (BD Falcon) e adicionou-se 1 ml de solução PBS/3%FBS/10 mM NaN₃ fria. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi posteriormente descartado e as células foram incubadas em gelo, no escuro, durante 1 hora, com anticorpos marcados com fluorocromo (BioLegend) nas concentrações indicadas (Tabela 2.3) num volume total de 50 µl de solução PBS/3%FBS/10 mM NaN₃ fria. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de solução PBS/3%FBS/10 mM NaN₃, resuspendidas com 1 ml de solução PBS/10 mM NaN₃ e analisadas no citómetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences). Para determinar a viabilidade celular, preparou-se um tubo com células suspendidas num 1 ml de solução PBS/10 mM NaN₃ contendo 2.5 µg/ml de iodeto de propídio (IP). Os resultados foram analisados usando o *software* CellQuest (BD Bioscience).

II.11.2 Detecção de proteínas intracelulares

Um volume contendo 1×10^6 células foi transferido para um tubo de poliestireno de 5 ml com fundo redondo (BD Falcon) e adicionou-se 1 ml de solução PBS/3%FBS/10 mM NaN₃ fria. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300xg durante 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante descartado por inversão do tubo. De seguida, as células foram fixadas com 100 µl de uma solução de fixação e permeabilização 1X (BD Biosciences) à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 1 ml de solução PBS/0.5% BSA/0.1% saponina fria e centrifugou-se novamente durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 50 µl de PBS/0.5% BSA/0.1% saponina contendo anticorpo nas concentrações indicadas (Tabela 2.3) e incubou-se durante 1 hora no gelo. Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes com 1 ml de solução PBS/0.5% BSA/0.1% saponina, resuspendidas num 1 ml de PBS/10 mM NaN₃e analisadas no citómetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences).

Tabela 2. 3: Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo

Antigene de murganho	Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Concentração Final
CD3ε	Armenian hamster IgG	145-2C11	FITC	1/200
CD4	Rat IgG2b, κ	GK1.5	FITC	1/200
CD4	Rat IgG2b, κ	GK1.5	PE	1/200
CD8-PE/Cy5	Rat IgG2a, κ	53-6.7	PE/Cy5	1/400
CD90.2 (Thy1.2)	Rat IgG2b, κ	30-H12	FITC	1/500
RankL (CD254)	Rat IgG2b, κ	IK22/5	PE	1/200

II.12. INJEÇÃO INTRA VENOSA DE CÉLULAS LEUCÉMICAS

Sacrificaram-se murganhos leucémicos TEL-JAK2 em que foi retirado o timo para se proceder à suspensão celular primária como descrito no ponto II.9. Em seguida fez-se contagem de células por ml, onde se retirou um volume contendo 5×10^6 células para injetar (volume de 0.1 ml) na veia da cauda de cada um dos murganhos, murganhos K5-CRE⁺/Rank^{Flox/Flox} e K5-CRE⁺/Rank^{+ /Flox}. Aproximadamente 15/20 dias após a injeção de células, verificando-se sinais de leucemia, os murganhos foram abatidos. Recolheu-se o timo para suspensão celular, como descrito no ponto II.9. Posteriormente realizou-se uma análise de citometria de fluxo para detetar a expressão da proteína RANKL à superfície da célula, como descrito no ponto II.11.1.

CAPITULO III – RESULTADOS

III.1 CARACTERIZAÇÃO DA LEUCEMIA EM CÉLULAS TEL-JAK2 A NÍVEL DE EXPRESSÃO CD3, CD4 E CD8

Inicialmente quisemos confirmar a caracterização do desenvolvimento de leucemia em murganhos TEL-JAK2. Para isso, vigiámos murganhos TEL-JAK2 até apresentarem sintomas de doença terminal, sendo posteriormente mortos para análise. Uma vez que as células leucémicas originam-se no timo e espalham-se para vários órgãos linfóides (Fernandes et al., 2015), procedemos à extração de células do timo, baço e gânglios linfáticos.

Após análise feita por citometria de fluxo a fim de verificar a expressão de CD3, CD4 e CD8, observamos uma grande proporção de células CD4⁺CD8⁺ DP no timo saudável (> 80%), tal como esperado. No entanto, na presença de um timo doente, constatámos um aumento de células CD4⁻CD8⁺ (CD8⁺ SP) em detrimento de células DP (Figura 3.1 A). Igualmente verificamos que o baço de um animal doente apresentava um aumento de células nos compartimentos CD4⁺CD8⁺ DP e CD8⁺, enquanto que os gânglios linfáticos apresentavam uma população mais frequente de células CD8⁺ SP (Figura 3.1 A).

Quanto à expressão de CD3 em murganhos doentes, entre o timo doente e o timo saudável não anotámos grandes diferenças. Sendo no timo selvagem a população maioritária CD3⁺CD4⁺, constatando um ligeiro aumento de células CD3⁺ SP no timo doente. No baço doente havia um aumento na população CD3⁺CD4⁺, no entanto nos gânglios linfáticos a população maioritária era CD3⁺CD4⁻, correspondendo, muito provavelmente, a células CD3⁺CD8⁺ (Figura 3.1 B).

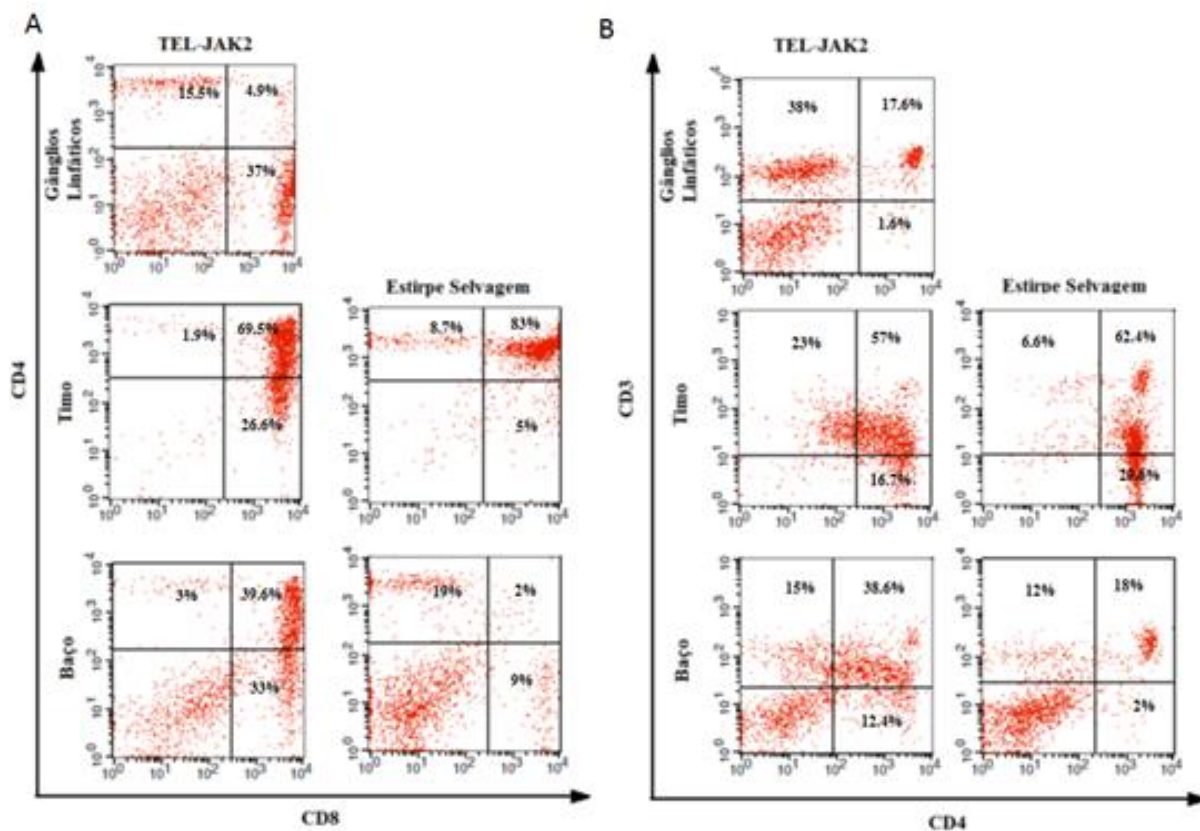


Figura 3. 1: Caracterização das células leucémicas em murganhos leucêmicos TEL-JAK2 CD3, CD4 e CD8 através de citometria de fluxo.

A) Caracterização de células CD4 CD8 em suspensões celulares de nodos linfáticos, timo e baço de murganhos leucêmicos TEL-JAK2 (n=2) e o seu controlo com murganhos de estirpe selvagem (n=2). B) Caracterização de células CD3 CD4 em suspensões celulares de nodos linfáticos, timo e baço de murganhos leucêmicos TEL-JAK2 (n=2) e o seu controlo com murganhos de estirpe selvagem (n=2). Indica a percentagem de células em cada quadrante.

III.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2

III.2.1 O RANKL é significativamente mais expresso em células leucémicas TEL-JAK2 do que em timócitos de estirpe selvagem

Para quantificar a expressão de RANKL em células leucémicas recolhidas de ratinhos transgênicos TEL-JAK2 com doença terminal, realizou-se uma análise quantitativa por RT-PCR. Os valores de CT referentes à expressão de RANKL para cada amostra foram obtidos em triplicado e normalizados recorrendo à determinação da expressão do gene de referência *Hprt1*. Entre outros genes de referência este foi testado anteriormente no laboratório de acolhimento e foi demonstrado ser apropriado para este tipo de amostras biológicas (Fernandes et al., 2015).

Como se pode verificar na figura 3.2, os níveis de expressão de RANKL são mais elevados em timócitos leucémicos TEL-JAK2 quando comparado com timócitos de estirpe selvagem. Apesar de terem sido analisadas poucas amostras, estes resultados estão de acordo com resultados obtidos previamente no laboratório (Anexo A). Portanto, ambos os estudos apoiam a hipótese de um aumento na expressão do RANKL durante o desenvolvimento da leucemia de células T nos murganhos TEL-JAK2.

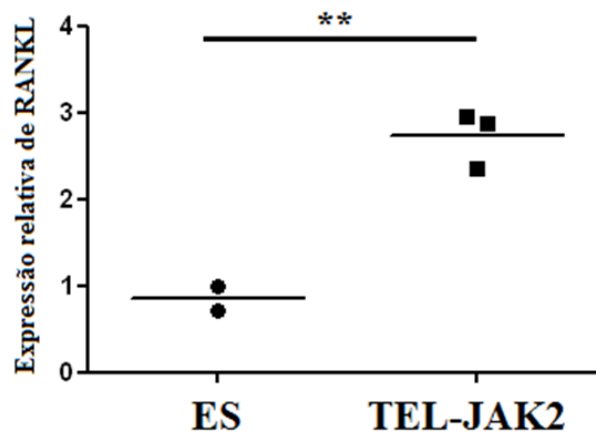


Figura 3. 2: Níveis relativos de expressão de mRNA de *RankL* em timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos de estirpe selvagem (ES).

Análise dos níveis de mRNA de *RankL* (normalizado pela expressão de *Hprt1*) em timócitos leucémicos recolhidos de três murganhos transgênicos TEL-JAK2 (TEL-JAK2) e, duas amostras de timócitos recolhidos de murganhos de estirpe selvagem (ES) (relativo à expressão de uma amostra de estirpe selvagem, normalizado para 1) por RT-qPCR. **: P = 0,0056 (teste *t* de Student emparelhado)

III.2.2 A proteína RANKL é mais expressa no interior das células leucémicas TEL-JAK2

Para verificar a quantidade de RANKL total em células leucémicas comparando com timócitos de estirpe selvagem, procedeu-se a uma análise por citometria de fluxo em células fixadas e permeabilizadas na qual se utilizou um anticorpo monoclonal para a proteína RANKL conjugado com ficoeritrina (RANKL-PE). Este método permite-nos detetar a proteína total em ambos os compartimentos, tanto à superfície como no interior das células.

A nossa análise cingiu-se à população de células grandes (leucócitos viáveis), como indicado na Figura 3.3 A e B. Na figura 3.3 C pode-se verificar que as células leucémicas recolhidas de gânglios linfáticos de murganhos transgênicos TEL-JAK2 apresentavam um ligeiro aumento da expressão de RANKL comparativamente às células dos gânglios linfáticos de murganhos de estirpe selvagem (que incluem uma composição complexa de células hematopoiéticas). Em contraste com as células leucémicas de gânglios linfáticos, os timócitos

leucémicos TEL-JAK2 apresentavam um grande aumento da expressão de RANKL comparando com a expressão em timócitos de estirpe selvagem. Com estes resultados podemos concluir que a expressão de RANKL é maior em células leucémicas TEL-JAK2 que em timócitos normais.

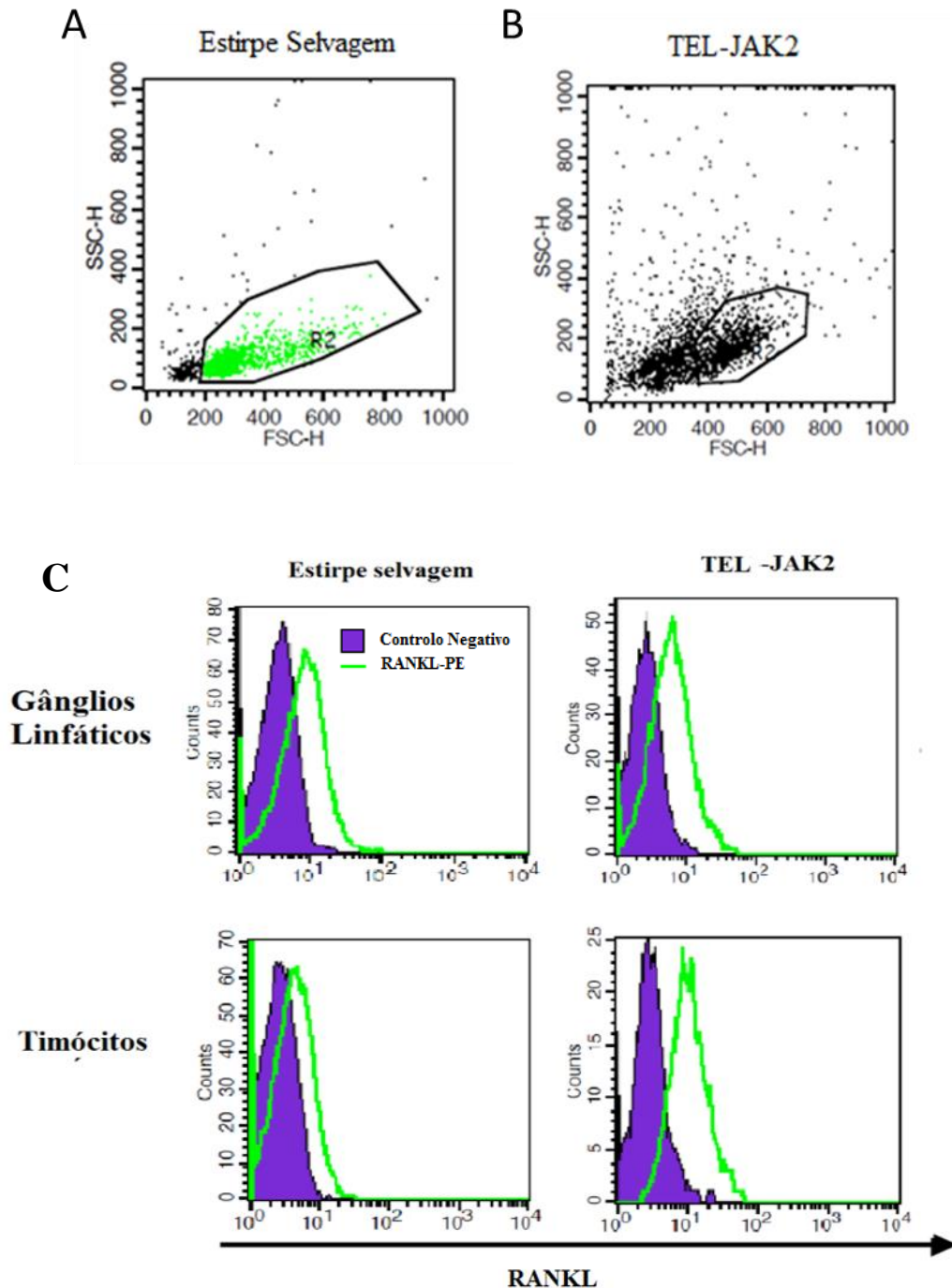


Figura 3. 3: Análise da expressão da proteína RANKL no interior de células leucémicas e células de estirpe selvagem (ES) recolhidas do timo e de gânglios linfáticos de murganhos TEL-JAK2 e murganhos de estirpe selvagem por citometria de fluxo.

A) Estratégia de seleção de células de estirpe selvagem analisadas (R2); B) Estratégia de seleção de células leucémicas TEL-JAK2 analisadas (R2); C) Expressão de RANKL em células leucémicas e de tipo selvagem recolhidas dos gânglios linfáticos e do timo. O sombreado roxo corresponde a células sem anticorpo e a linha verde

corresponde a células marcadas com anticorpo específico, RANKL-PE. Esta experiência foi realizada em células dos gânglios linfáticos: uma amostra da estirpe selvagem e duas amostras de células leucémicas TEL-JAK2; e em timócitos: duas amostras da estirpe selvagem e seis amostras leucémicas TEL-JAK2 cultivadas durante 18 horas em meio RPMI contendo DMSO.

III.2.3 Linfócitos T leucémicos TEL-JAK2 apresentam níveis superficiais de proteína RANKL muito baixos.

Para detetar a expressão de RANKL à superfície de linfócitos T, procedeu-se uma vez mais à análise por citometria de fluxo utilizando o mesmo anticorpo monoclonal de murganho RANKL-PE. Como se pode ver na figura 3.4, os timócitos leucémicos TEL-JAK2 apresentavam um ligeiro aumento na expressão de RANKL, à superfície das células comparado com os timócitos da estirpe selvagem.

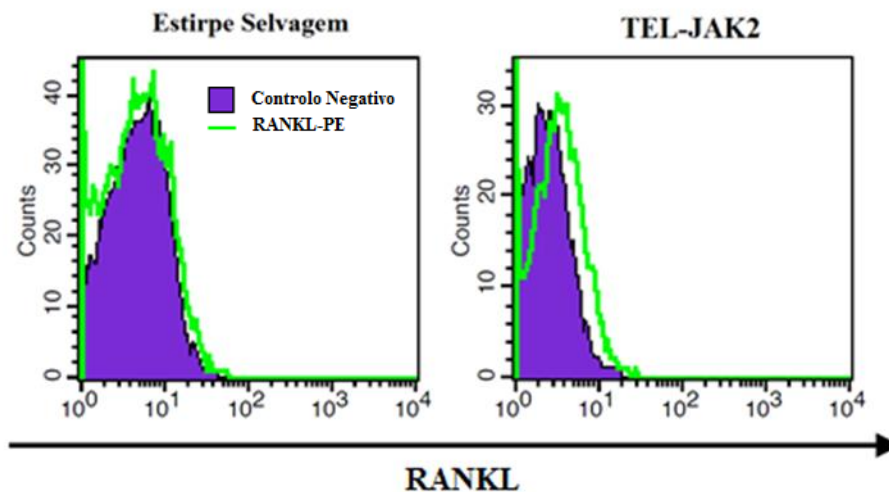


Figura 3. 4: Detecção da expressão de RANKL à superfície de timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos da estirpe selvagem por citometria de fluxo.

O sombreado roxo corresponde a células sem anticorpo e a linha verde corresponde a células marcadas com anticorpo específico RANKL-PE. Esta experiência foi realizada com duas amostras de timócitos de estirpe selvagem e quatro amostras de timócitos leucémicos TEL-JAK2 cultivadas durante 18 horas em meio RPMI contendo DMSO.

A análise destes resultados permite-nos confirmar um aumento da expressão da proteína RANKL à superfície de células leucémicas, no entanto esta proteína aparenta estar presente em maior quantidade no interior das células T do que na sua superfície. Com estes resultados podemos deduzir que a proteína RANKL será armazenada em compartimentos intracelulares das células T, migrando para a sua superfície por mecanismos não determinados para se ligar ao seu recetor RANK e assim ativá-lo.

III.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS PELA ESTIMULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO TCR

III.3.1 Expressão de RANKL à superfície das células leucémicas TEL-JAK2 é induzida através da mimetização da ativação da sinalização por TCR

Como a estimulação da sinalização do recetor de células T (TCR) induz a expressão de múltiplos genes e induz a sobrevivência e proliferação de linfócitos T, pretendeu-se determinar se a expressão de RANKL em células leucémicas é controlada por esta via de sinalização, especificamente através da ativação das vias que ativam os fatores de transcrição NF- κ B e NFAT. Para isso, utilizaram-se os compostos forbol miristil acetato (PMA), que atua a nível da quinase de proteínas C (PKC) ativando a via NF- κ B, e Ionomicina, que atua a nível da cascata de cálcio ativando a via calcineurina/NFAT. Assim, os timócitos da estirpe selvagem e timócitos leucémicos foram incubados em cultura com PMA+Ionomicina ou fitohemaglutinina (PHA), um ativador da proliferação de linfócitos T, durante 18 horas, seguindo-se a análise da expressão de RANKL por citometria de fluxo. Na figura 3.5 D observamos que nos timócitos leucémicos TEL-JAK2 a expressão de RANKL aumentou consideravelmente quando aqueles foram tratados com PMA+Ionomicina, o que já não aconteceu quando foram tratados com PHA.

A figura 3.5 E ilustra a análise estatística dos resultados apresentados na figura 3.5 D, onde se verifica que o aumento da expressão de RANKL nos timócitos leucémicos TEL-JAK2 após tratamento com PMA+Ionomicina (PMA+I) foi consistentemente e significativamente superior ao aumento da expressão em timócitos normais.

Para verificar se nas células leucémicas é preciso a ativação simultânea das vias de sinalização PKC/NF- κ B e calcineurina/NFAT para induzir o aumento da expressão de RANKL, cultivámos células com PMA e a Ionomicina separadamente. Como se pode ver na figura 3.5 F, a indução da expressão de RANKL é muito baixa nas culturas com estes compostos separadamente. Por isso, podemos concluir que nestas células é necessária a ativação destas duas vias de sinalização, NF- κ B e NFAT, para induzir um forte aumento na expressão de RANKL, ou seja, o PMA e a Ionomicina funcionam em sinergia para aumentar a expressão de RANKL nestas células.

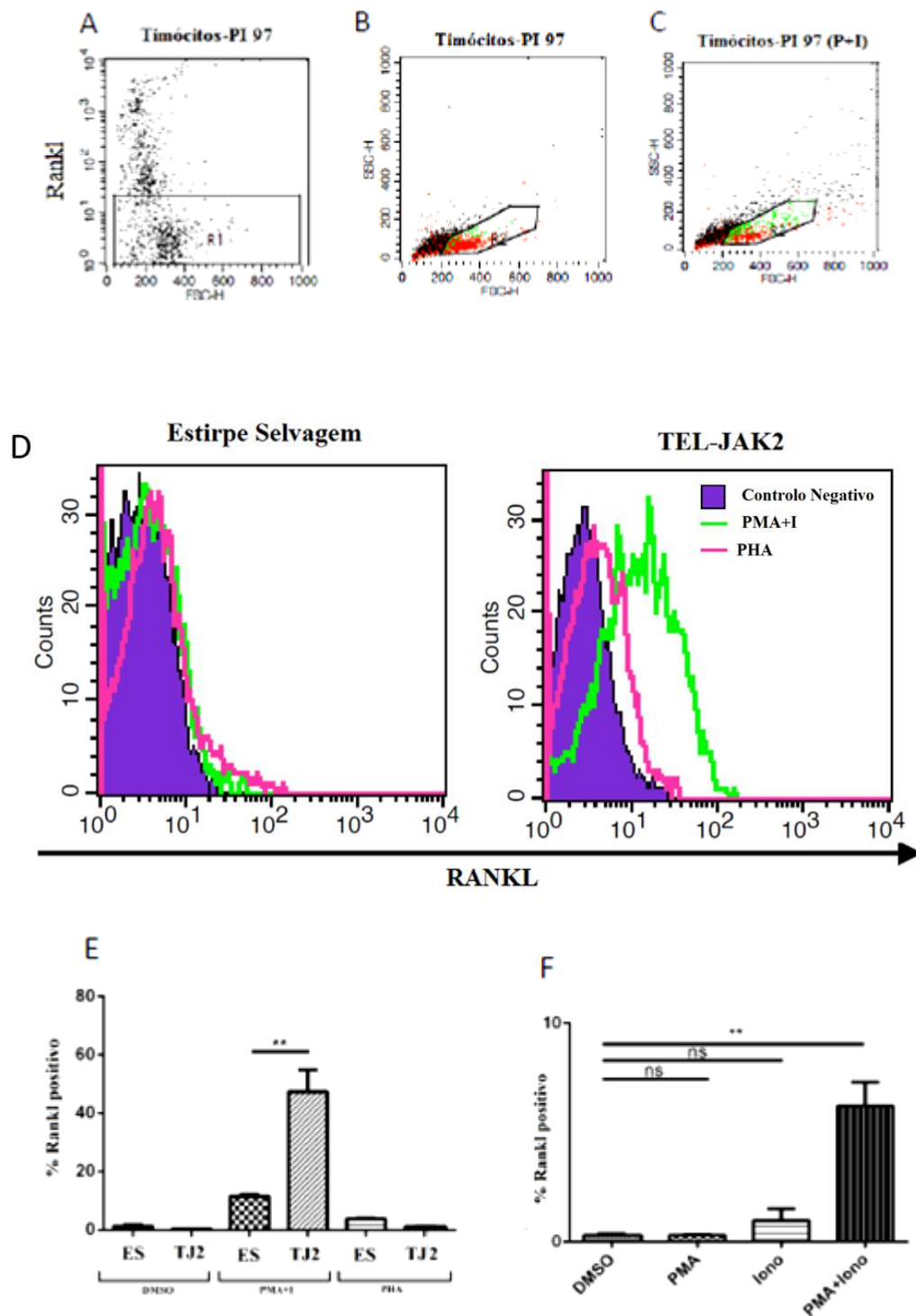


Figura 3. 5: Detecção da expressão de RANKL à superfície de timócitos leucémicos TEL-JAK2 e timócitos de estirpe selvagem (ES) tratados com PMA e Ionomicina ou PHA.

A) As células viáveis foram identificadas e selecionadas (R1) para análise através da marcação com Iodeto de propídio (PI); B) Estratégia de seleção de timócitos leucémicos TEL-JAK2 não tratados incluídas na análise (R2); C) Estratégia de seleção de timócitos leucémicos TEL-JAK2 tratados com PMA+Ionomicina incluídas na análise (R2); D) expressão de RANKL em timócitos da estirpe selvagem (lado esquerdo) e timócitos leucémicos TEL-

JAK2 (do lado direito): o sombreado roxo representa células não tratadas (com DMSO, controlo negativo), a linha verde representa células tratadas com PMA+Ionomicina e a linha rosa são células tratadas com PHA, todas marcadas com anticorpo RANKL-PE (n=2); E) Análise estatística da expressão de RANKL em timócitos normais e timócitos leucémicos TEL-JAK2: sem tratamento (com DMSO, que é o controlo negativo) (ES n=2, TEL-JAK2 n=4), tratados com PMA+Ionomicina (ES n=2, TEL-JAK2 n=4), e tratados com PHA (ES n=2, TEL-JAK2 n=2). **;P= 0,087 (teste *t de Student*). F) Análise da expressão de RANKL em timócitos leucémicos TEL-JAK2 em triplicados: sem tratamentos (com DMSO, que é o controlo negativo), tratados com PMA, tratados com Ionomicina e tratados com PMA+Ionomicina. **; P= 0,0088; (DMSO vs PMA+Iono) ns = não significativo (P≥0.05) (DMSO vs Iono) (DMSO vs PMA) (teste *t de Student* emparelhado)

III.3.2 Aumento da expressão de RANKL em timócitos leucémicos TEL-JAK2 depende da ativação das vias de sinalização NF-κB e da transcrição do gene *RankL*

Para confirmar formalmente se o aumento da expressão de RANKL induzido pelo tratamento com PMA+Ionomicina poderá ser devido à ativação da via de sinalização NF-κB e consequente aumento da transcrição génica, utilizou-se BMS-344501 (inibidor de IKK) e Actinomicina D (inibidor da transcrição) para bloquear estes processos. Células leucémicas recolhidas de gânglios linfáticos de murganhos transgênicos TEL-JAK2 terminalmente doentes foram incubadas com BMS-344501 em combinação com PMA+Ionomicina durante 18 horas. Após incubação analisou-se a expressão de RANKL em células fixadas e permeabilizadas por citometria de fluxo. Como se pode verificar na figura 3.6 A, tanto o BMS-344501 como a Actinomicina D demonstraram capacidade de inibir a indução da expressão de RANKL por PMA+Ionomicina. Estes resultados indicam portanto que a ativação dos fatores de transcrição NF-κB são importantes para a indução da expressão de RANKL (Figura 3.6 B).

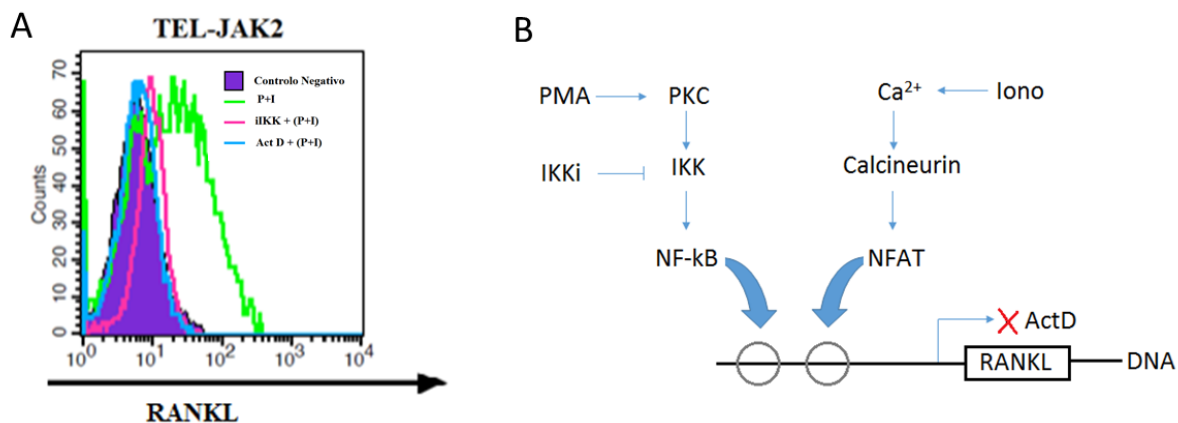


Figura 3. 6: Determinação da expressão de RANKL em timócitos leucémicos TEL-JAK2 fixadas e permeabilizadas por citometria de fluxo após tratamento com: BMS- 344501 (IKKi) em combinação com PMA+Ionomicina, Actinomicina D em combinação com PMA+Ionomicina e PMA+Ionomicina.

A) Expressão de RANKL numa amostra de timócitos leucémicos TEL-JAK2: o sombreado roxo representa células não tratadas (DMSO, controlo negativo) com anticorpo, a linha verde representa células tratadas com PMA+Ionomicina, a linha rosa representa células tratadas com o BMS- 344501 em combinação com

PMA+Ionomicina e a linha azul diz respeito a células tratadas com Actinomicina D em combinação com PMA+Ionomicina, todas marcadas com anticorpo RANKL-PE; B) Esquema informativo do nível de atuação dos diferentes compostos utilizados: o PMA induz a ativação da enzima PKC que por sua vez ativa a via NF- κ B; o composto BMS- 344501 vai inibir o IKK inibindo consequentemente a via NF- κ B; a Ionomicina vai atuar na cascata de cálcio, ativando a via NFAT/calcineurina; finalmente, a actinomicina D vai inibir a transcrição do gene *Rankl*.

III.3.3 A mimetização da sinalização por TCR também induz a expressão de RANKL na linha celular linfoblástica EL4.

Para verificar se noutro modelo experimental a expressão de RANKL seria igualmente induzida por mimetização da ativação das vias de sinalização ativadas por TCR, tratou-se a linha celular linfoblástica de murganho EL4.2, com PMA e Ionomicina ou PHA durante 18 horas em cultura. Realizou-se posteriormente uma análise por citometria de fluxo para avaliar a expressão de RANKL na superfície das células EL4.2 sujeitas ou não a tratamento. Como podemos ver na Figura 3.7 A, quando postas em cultura com DMSO, ou seja, sem tratamento específico, e marcadas com e sem anticorpo RANKL-PE, as células EL4.2 expressam altos níveis de RANKL. Na Figura 3.7 B pode-se verificar que a expressão de RANKL aumentou ligeiramente em células EL4.2 tratadas com PMA+Ionomicina comparando com o controlo negativo, efeito este que não se verificou em células EL4.2 tratadas com PHA.

Para averiguar se nestas células seria necessário ativar as duas vias de sinalização, NF- κ B e NFAT, incubou-se as células EL4.2 com PMA e Ionomicina separadamente durante 18 horas e de seguida analisou-se por citometria de fluxo a expressão de RANKL na superfície das células. Como se pode observar na Figura 3.7 C e D, as células EL4.2 tratadas com PMA isoladamente sofreram uma indução da expressão de RANKL semelhante aquela de células tratadas com PMA+Ionomicina. Este resultado poderá sugerir que provavelmente as células EL4.2 já terão a via NFAT ativa (Figura 3.7 E) e por isso a Ionomicina não influenciará a expressão de RANKL neste contexto.

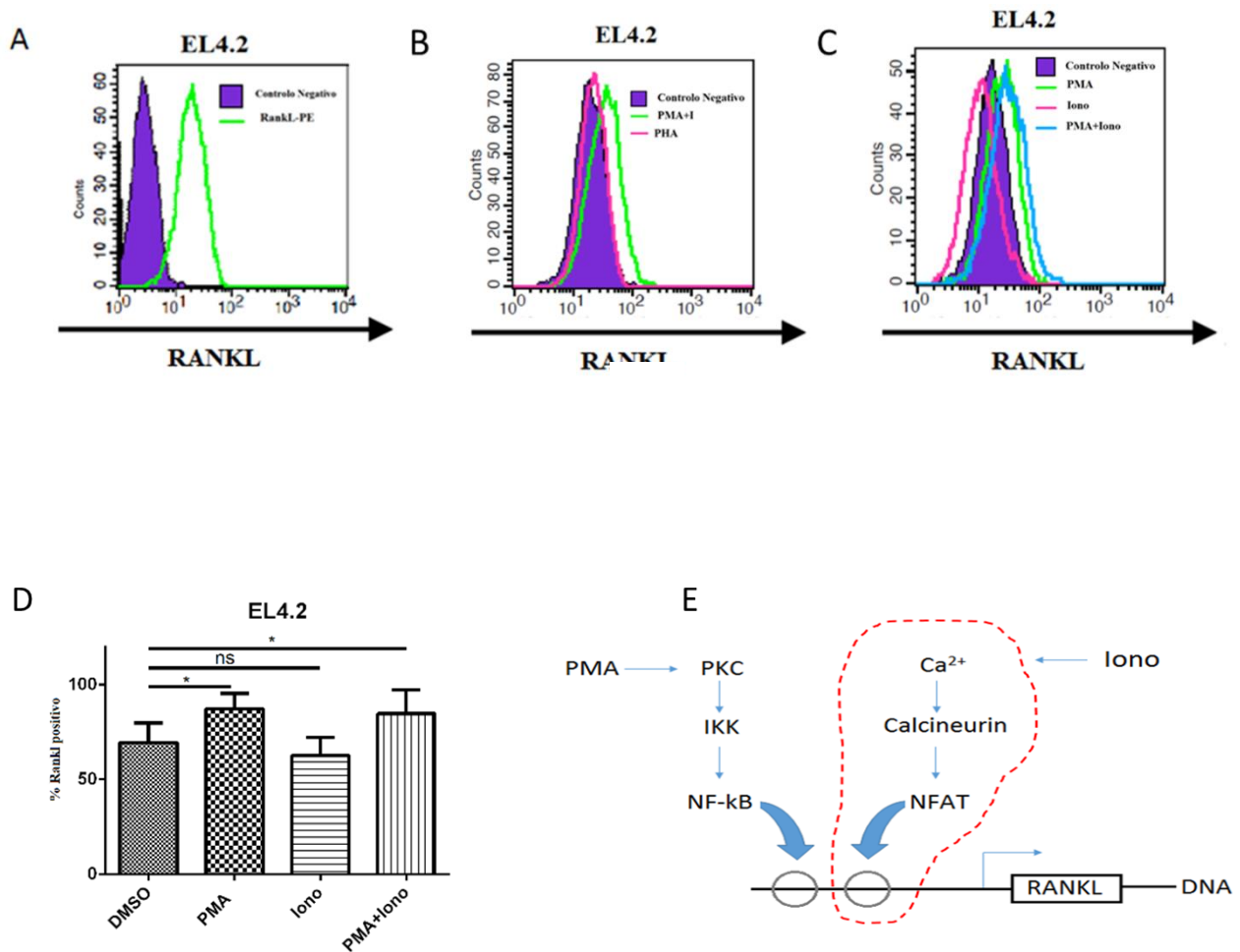


Figura 3. 7: Detecção da expressão de RANKL à superfície de células EL4.2 tratadas com PMA+Ionomicina, PMA, Ionomicina e PHA por citometria de fluxo.

A) Expressão de RANKL em células EL4.2 sem anticorpo RANKL-PE, a roxo, e com anticorpo RANKL-PE, a linha verde. B) Expressão de RANKL em células EL4.2: o sombreado roxo representa células não tratadas (em cultura com DMSO, controlo negativo) e com o anticorpo, a linha verde representa células tratadas com PMA+Ionomicina e a linha rosa representa a células tratadas com PHA, todas marcadas com anticorpo RANKL-PE; C) Expressão de RANKL em células EL4.2: o sombreado roxo células não tratadas (DMSO, controlo negativo), a linha verde representa células tratadas com PMA, a linha rosa representa células tratadas com Ionomicina e a linha azul diz respeito a células tratadas com PMA+Ionomicina, todas marcadas com anticorpo RANKL-PE; D) Análise estatística de células EL4.2: não tratadas (DMSO, n=4), células tratadas com PMA (n=1), células tratadas com Ionomicina (n=1) e células tratadas com PMA+Ionomicina (n=4). *: $P = 0,0411$ (DMSO vs PMA+Iono); *: $P = 0,0304$ (DMSO vs PMA); ns - não significativa (DMSO vs Iono). (teste *t* de Student emparelhado). E) Esquema informativo do nível de atuação dos diferentes compostos utilizados: o PMA induz a ativação da enzima PKC que por sua vez ativa a via NF-κB; a Ionomicina vai atuar na cascata de cálcio, ativando a via NFAT/calcineurina, a linha a vermelho está a sinalizar a via que, em princípio, já está ativa nestas células.

III.4 AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DA EXPRESSÃO DE RANKL À SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2 DEPENDER DA EXPRESSÃO DO RECETOR RANK EM CÉLULAS DO MICROAMBIENTE

III.4.1. Aumento da expressão do RANKL em timócitos maduros de estirpe selvagem mutados para o gene *Rank*

Com o objetivo de estudar o impacto de expressão de RANK em células epiteliais do microambiente ($Krt5^+$) na expressão de RANKL à superfície de células leucémicas TEL-JAK2 realizou-se um cruzamento entre murganhos da estirpe Krt5-CRE e estirpe Rank-Flox para se obter murganhos $Krt5-CRE^+;Rank^{F/F}$ e $Krt5-CRE^+;Rank^{+/F}$ (controlo negativo). A utilização do Krt5-CRE deve-se ao facto desta enzima inativar os alelos “floxed” em células que expressam queratina 5, especificamente células epiteliais da pele e do timo. De forma a analisar a expressão da proteína RANKL na superfície dos timócitos destes murganhos recolheu-se células do timo para marcação e posterior análise por citometria de fluxo. Neste estudo utilizaram-se os anticorpos CD3-FITC, CD8-Cy5 e RANKL-PE para marcar as células. Como também se pretendia analisar o efeito da ausência do RANK microambiental em células T maduras CD4 SP (“Single Positive”), as células foram selecionadas por expressarem CD3 e não expressarem CD8 (células $CD3^+$ e $CD8^-$; na Figura 3.8 A, B).

Na figura 3.8 C pode-se observar que a expressão de RANKL na superfície de timócitos recolhidos de murganhos $Krt5-CRE^+;Rank^{F/F}$ (murganhos que expressam queratina 5 e não têm RANK nas células epiteliais tímicas) é consideravelmente mais elevada do que em timócitos recolhidos de murganhos $Krt5-CRE^-/Rank^{+/F}$ (células controlo). Como se pode verificar na Figura 3.8 D, o aumento da expressão de RANKL em timócitos CD4SP na ausência do seu recetor no microambiente é consistente e estatisticamente significativo.

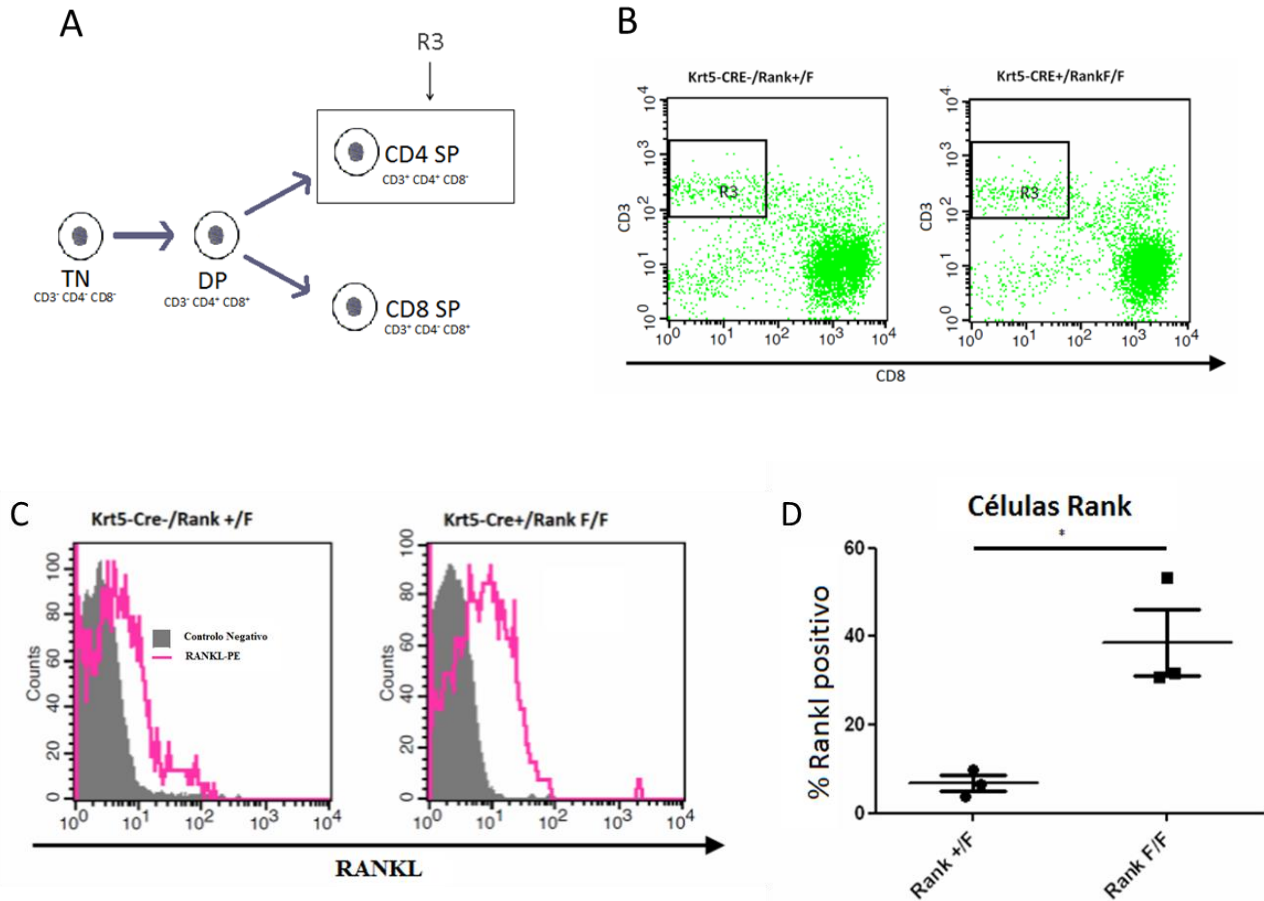


Figura 3. 8: Expressão de RANKL na presença ou ausência do seu recetor à superfície de células do microambiente.

Análise da expressão da proteína RANKL por citometria de fluxo em células recolhidas de murganhos com deleção condicional de *Rank* em células queratina 5-positivas do microambiente tímico. A) Esquema do desenvolvimento das células T no timo: células triplas negativas (TN; CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻) adquirem a expressão de CD4 e CD8 “Double-Positive” (DP; CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) e diferenciam-se por fim em células CD4 “Single-Positive” (CD4SP) ou CD8 “Single-Positive” (CD8SP). B) Estratégia de seleção das células CD4 SP por expressarem CD3 na ausência de expressão de CD8. (R3) C) Expressão da proteína RANKL em células recolhidas de murganhos Krt5-CRE⁻/*Rank*^{+/F} (n=3) e células recolhidas de murganhos Krt5-CRE⁺/*Rank*^{F/F} (n=3); o sombreado cinzento representa células não marcadas com anticorpo e a linha rosa representa células marcadas com anticorpo RANKL-PE. D) Análise estatística da expressão da proteína RANKL em todas as amostras nas quais se procedeu à análise por citometria de fluxo. *; $P=0,0139$ (teste t)

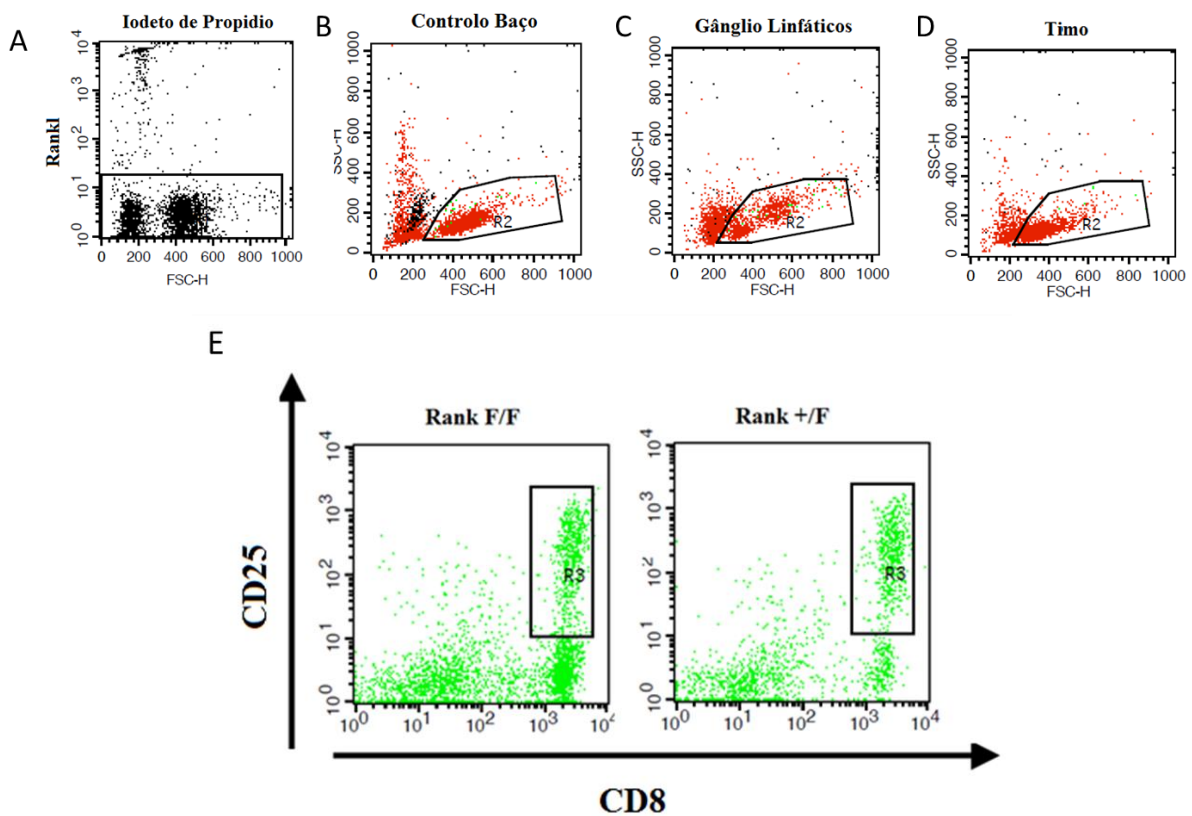
III.4.2. A ausência do gene *Rank* em células do microambiente tímico não influencia a expressão de RANKL em células leucémicas

Células leucémicas recolhidas do timo de um murganho TEL-JAK2 doente foram injetadas na veia caudal de murganhos K5-CRE⁺/*Rank*^{+/F} e K5-CRE⁺/*Rank*^{F/F}, como descrito no ponto II.12 dos Materiais e Métodos. Após 2 a 3 semanas, os murganhos apresentaram sinais de leucemia e foram sacrificados. Vários órgãos foram retirados e pesados incluindo o timo, baço

e gânglios linfáticos. Em seguida verificamos a expressão de RANKL nos órgãos linfoides (timo, baço e gânglios linfáticos) de animais dos dois genótipos (K5-CRE⁺/Rank^{+F} e K5-CRE⁺/Rank^{F/F}). Inicialmente fizemos uma seleção de células viáveis através das regiões R1 e R2, como ilustrado na Figura 3.9 A a D. Depois selecionamos as células leucêmicas através da marcação CD8⁺ e CD25⁺, como indicado na caixa R3 da Figura 3.9 E. Como podemos ver na figura 3.9 F, as células do baço não apresentam qualquer expressão superficial de RANKL, enquanto que as células dos gânglios linfáticos e do timo apresentaram expressão um pouco mais elevada de RANKL. No entanto esse pequeno aumento foi pouco significativo.

Comparando os dois genótipos verificamos que não houve diferenças significativas na expressão de RANKL (Figura 3.9 G). Com estes resultados podemos verificar que a ausência do gene *Rank* em células do microambiente não influenciou a expressão da proteína RANKL em células leucêmicas, e também não aparentou influenciar o desenvolvimento de leucemia de células T.

Esta experiência encontra-se ainda numa fase inicial, uma vez que foram realizadas mais amostragens (anexo B), mas insuficientes para obter resultados conclusivos.



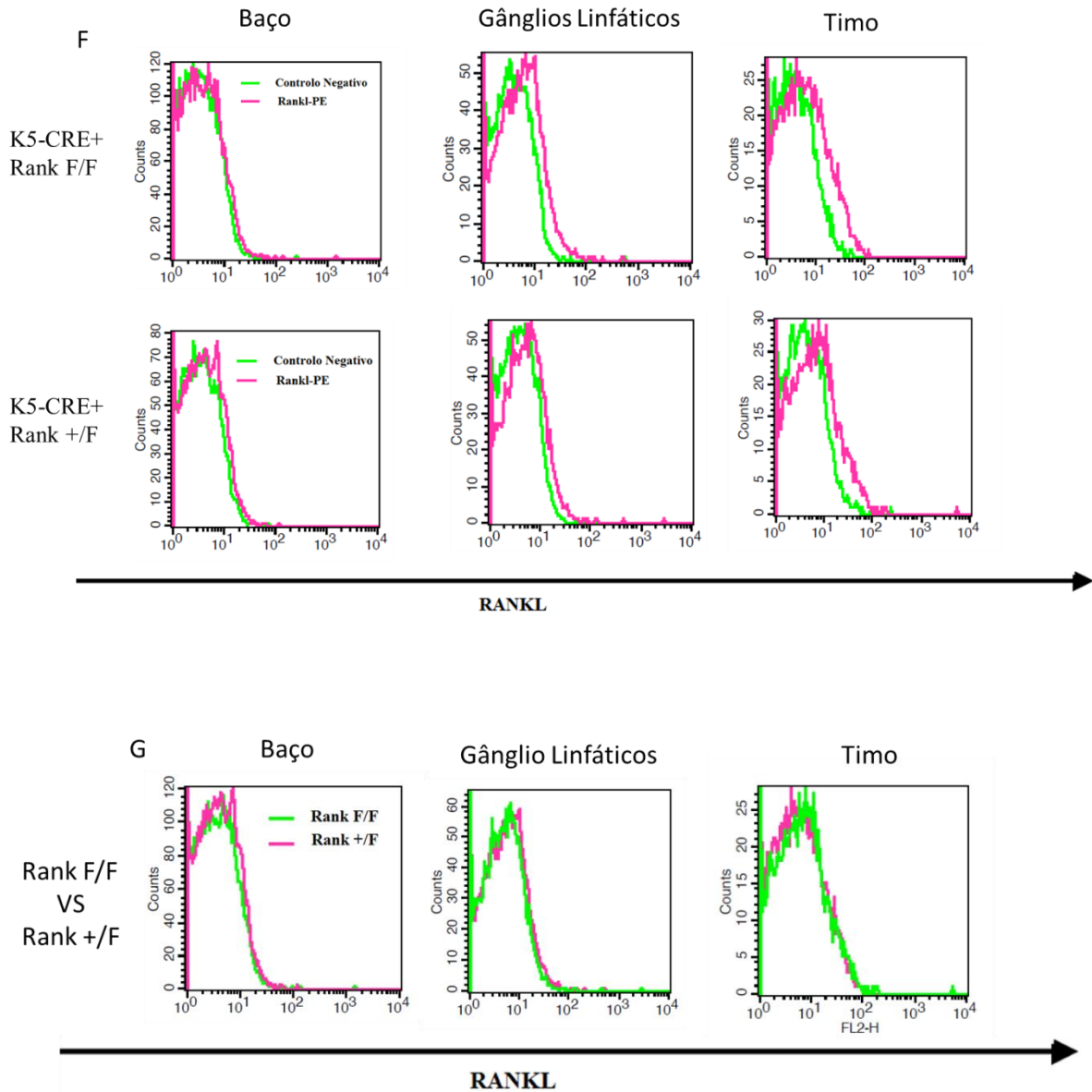


Figura 3. 9: Detecção da proteína RANKL na superfície de células leucémicas na ausência do seu recetor em células do microambiente.

Análise da expressão de RANKL por citometria de fluxo. A) As células viáveis foram identificadas e selecionadas (R1) para análise através da marcação com Iodeto de propídio; B) Estratégia de seleção de células leucémicas do Baço usadas para análise (R2); C) Estratégia de seleção de células leucémicas dos Gânglios Linfáticos usadas para análise (R2); D) Estratégia de seleção de células leucémicas do Timo usadas para análise (R2); E) Estratégia de seleção das células leucémicas por seleção de células CD25⁺ e CD8⁺ (R3) e seleção de células saudáveis CD25⁻ e CD8⁻ (R4) F) Expressão da proteína RANKL no Baço, Gânglios Linfáticos e Timo de células de murganços com dois genótipos diferentes (K5-CRE⁺/ Rank^{+/-} (n=2) e K5-CRE⁺/ Rank^{F/F} (n=2) através da seleção feita pela caixa R3, a linha verde é referente a células sem anticorpo (Controlo negativo) e a linha rosa é referente a células com anticorpo RANKL-PE; G) Comparação da expressão de RANKL no Baço, Gânglio Linfáticos e Timo, entre os dois genótipos (K5-CRE⁺/ Rank^{+/-} e K5-CRE⁺/ Rank^{F/F}), a linha verde é referente a células com anticorpo RANKL-PE do murganço K5-CRE⁺/Rank^{F/F} (n=2) e a linha rosa é referente a células com anticorpo RANKL-PE do murganço K5-CRE⁺/Rank^{+/-} (n=2).

CAPITULO IV – DISCUSSÃO

IV.1 FATORES MICROAMBIENTAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA LLA-T

A leucemia de células T é um cancro hematológico agressivo, que resulta da transformação de células T progenitoras. Nesta doença é importante a ativação de oncogenes, de fatores de transcrição e desregulação das redes reguladoras da transcrição (Herranz et al., 2014). Pensa-se que a LLA tem origem a partir da ocorrência de várias lesões genéticas que sendo importantes em células progenitoras do sangue comprometem a sua diferenciação em células T maduras e funcionais (Pui et al., 2008). O microambiente de certos órgãos, como o timo, são estruturas especializadas onde se localizam as células progenitoras, e como tal revelaram-se importantes para o desenvolvimento da LLA-T (Lai e Kondo, 2008; Medyouf et al., 2007).

Estudos revelaram que a estimulação das vias de sinalização do NF- κ B e NFAT induzem a expressão de RANKL em células T normais (Hikosaka et al., 2008; Walsh et al., 2013). Sendo o RANKL um ligando do recetor ativador do NF- κ B (RANK) expresso em células T, células pro-B e células estromais da medula óssea, foi assim sugerido que a principal função do sistema RANK/RANKL no contexto da resposta imunitária seria a promoção da interação entre as células T e as células dendríticas (Walsh et al., 2013; Dougall et al., 1999; Wang et al., 2001). Estas vias têm mostrado ter um papel importante na regulação do metabolismo do osso, na patofisiologia de malignidades hematológicas e nas metástases de tumores sólidos (Schmiedel et al., 2013).

O microambiente local de células cancerígenas do cancro da mama e da próstata pode ser modulado por fatores como o RANKL que podem agravar o potencial metastático das células malignas (Casimiro et al., 2013). O facto da via de sinalização do RANKL não ter sido ainda estudada na LLA-T foi o motivo pelo qual se pretendeu identificar os mecanismos de sobreexpressão do RANKL em células leucémicas e assim conhecer melhor a sua importância no desenvolvimento desta patologia.

Para este estudo foi utilizado o modelo de murganho transgénico E μ SR α -TEL-JAK2, o qual expressa a proteína de fusão TEL-JAK2 em células linfóides. Estes murganhos desenvolvem espontaneamente uma leucemia rápida e fatal a partir de timócitos entre as 4 e as 22 semanas de idade. A doença desenvolvida por estes murganhos é clínica e patologicamente consistente com a leucemia linfoblástica aguda/linfoma humana (dos Santos et al., 2007; Carron et al., 2000).

Anteriormente, investigadores caracterizaram as células leucémicas de murganhos TEL-JAK2 provenientes de timos, e verificaram que estas apresentaram um drástico aumento de células $CD4^-CD8^+$ e uma diminuição na percentagem de células $CD4^+CD8^+$ DP. Já as células de baços e gânglios linfáticos afetados apresentavam um aumento de células $CD4^+CD8^+$ DP e $CD8^+$ SP (Carron et al., 2000). Os resultados obtidos no ponto III.1 confirmam estes resultados publicados.

IV.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO RANKL EM CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2

Foi demonstrada a expressão de RANKL em timócitos $CD4^+ CD8^-$ ou $CD4^- CD8^+$ SP de murganhos de estirpe selvagem, sendo contudo a expressão mais alta em células $CD4^+$ SP (Josien et al., 1999). De acordo com ensaios de RT-qPCR realizados no laboratório de acolhimento (dados não publicados, ver anexo A) foi confirmado que o mRNA do RANKL é sobre-expresso em células leucémicas TEL-JAK2, em comparação com timócitos de estirpe selvagem. Quando analisámos a expressão de RANKL tanto à superfície como no interior de timócitos leucémicos TEL-JAK2 por citometria de fluxo, observámos que a expressão de RANKL é mais elevada no interior das células leucémicas do que à superfície. No entanto, a expressão do RANKL intracelular foi mais acentuada nas células leucémicas do timo quando comparadas com as dos gânglios linfáticos, quando comparados com células de estirpe selvagem. Uma hipótese a considerar será de o timo possuir um microambiente especializado, distinto do dos gânglios linfáticos.

Com estes resultados podemos concluir que timócitos leucémicos expressam níveis elevados de RANKL. Porém, a expressão desta proteína é mais acentuada no interior dos timócitos leucémicos do que à sua superfície, deduzindo assim que o RANKL está presente no interior das células e só depois é que migra para a sua superfície.

IV.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RANKL PELA ESTIMULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO TCR

A sinalização do TCR favorece a disseminação ou acumulação de células leucémicas em órgãos linfoides periféricos de murganhos TEL-JAK2 (dos Santos et al., 2007). Além disso, também se sabe que o TCR ativa a via NF- κ B (Moore et al., 1995) sendo que esta se encontra frequentemente ativada em células leucémicas da LLA-T (dos Santos et al., 2007; dos Santos et al., 2010). Foi já demonstrado que culturas de células na presença de estimuladores das vias NF- κ B (através do composto PMA) e NFAT (através do composto Ionomicina) podem ser utilizadas para avaliar os níveis de RANKL associada à membrana em células osteoblásticas, (Singh et al., 2012). Com efeito, foi verificado que a expressão de RANKL aumenta em timócitos quando estes são estimulados com PMA em conjunto com Ionomicina (Hikosaka et al., 2008; Walsh NC., 2013). Anteriormente verificou-se um aumento da proliferação em timócitos leucémicos TEL-JAK2 quando estimulados com PMA em conjunto com Ionomicina (dos Santos et al. 2007). Para se poder determinar se a expressão do RANKL depende da ativação de NF- κ B e/ou NFAT, estimulou-se a via de sinalização do recetor de células T (TCR) usando PMA e ionomicina. Para isso, realizámos culturas celulares de timócitos de murganhos transgênicos TEL-JAK2 e células da linha celular linfoblástica EL4.2 com o PMA, ativando a PKC/NF- κ B, e/ou a Ionomicina, que por sua vez ativa a cascata de cálcio/NFAT. Também se utilizou o PHA, usado como desencadeador da divisão celular de linfócitos T. (ver Figura 4.1).

Após análise da expressão de RANKL em células leucémicas TEL-JAK2 por citometria de fluxo, verificámos que somente as células que são postas em cultura com o PMA em conjunto com a Ionomicina aumentam a expressão do RANKL e isto tanto na forma superficial como na proteína total das células. Já o mesmo não se verificou para as células estimuladas com PHA ou com PMA e Ionomicina separadamente. Estes resultados obtidos estão em consonância com outros estudos realizados onde se verificou que a expressão da proteína RANKL é induzida à superfície de timócitos quando estes são colocados em cultura com PMA e Ionomicina, imitando assim a seleção positiva induzida pelo TCR (Hikosaka et al., 2008; Walsh NC., 2013; dos Santos et al. 2007). Contudo, os níveis de expressão após tratamento com PMA e Ionomicina foram sempre superiores nas células leucémicas TEL-JAK2 que nos timócitos normais.

Noutro modelo experimental, a linha celular EL4, investigadores demonstraram que quando estas são estimuladas com PMA os níveis de IL-2 aumentam (Servan-Chiara et al.,

1986). Procedemos então a culturas celulares com células EL4.2 tratadas com PMA, com Ionomicina ou com PHA, para verificar se estes compostos aumentam a expressão de RANKL. Constatámos que o tratamento com o PMA juntamente com a Ionomicina aumentava a expressão de RANKL. Deduzimos contudo que esse aumento foi causado pelo tratamento com PMA, uma vez que após tratamento com PMA, Ionomicina e PHA, separadamente, somente as células colocadas em tratamento com PMA tiveram a capacidade de induzir a expressão de RANKL. Estes resultados assemelham-se a estudos realizados com a proteína IL-2 onde as células EL4, quando estimuladas com PMA juntamente com PHA, aumentam a expressão desta proteína. Pensa-se no entanto, que esse aumento será provocado unicamente pelo composto PMA, sugerindo assim que o PKC/NF- κ B não estará normalmente ativo nestas células (Servan-Chiara et al 1986; Dornand et al., 1987).

Culturas celulares de tímócitos leucémicos TEL-JAK2 com os compostos BMS-344501 (inibidor de IKK) e Actinomicina D inibiram a indução da expressão de linfotoxina alpha e beta (LT α ; LT β) causada pelo PMA e a Ionomicina em conjunto (Fernandes et al, 2015). Para verificar se o aumento da expressão de RANKL em células leucémicas de murganhos TEL-JAK2 induzido pelo tratamento com PMA juntamente com Ionomicina depende de um aumento da transcrição controlada por NF- κ B, utilizaram-se os compostos BMS-344501 (inibidor IKK) e Actinomicina D em culturas celulares durante 17 horas. O BMS-345541 é um inibidor altamente seletivo da quinase IKK, inibindo a transcrição dependente do NF- κ B de citocinas pro inflamatórias. Esta seletividade é evidente nas células, porque somente os estímulos que induzem a fosforilação do I κ B α é que são inibidos pelo composto, enquanto outras cascatas de transdução de sinal não são afetadas (Burke et al., 2003). Igualmente foram realizados trabalhos onde se demonstrou que diferentes doses de actinomicina D têm um efeito inibidor da síntese de várias espécies de RNA (Perry e Kelley, 1970; Reich et al., 1961). Após a análise da expressão de RANKL por citometria de fluxo, verificámos que estes dois compostos também têm a capacidade de inibir a indução da expressão de RANKL induzida pelo PMA e Ionomicina em conjunto, tal como o que acontece com a proteína LT β (Fernandes et al, 2015).

Com estes resultados podemos sugerir que os tímócitos leucémicos TEL-JAK2, apesar de terem as vias NF- κ B e NFAT ativadas, (dos Santos et al., 2008; Medyouf et al., 2007), o tratamento com PMA juntamente com Ionomicina poderá ativar ainda mais estas vias, aumentando assim ainda mais a expressão de RANKL. Essa estimulação, dever-se-á a uma maior ativação das vias de sinalização do NF- κ B, NFAT e aumento da transcrição génica. Por sua vez, nas células EL4.2 a via NFAT parece já estar ativa, explicando assim o facto destas

células expressarem alguma quantidade de RANKL sem serem estimuladas, e também de não responderem ao estímulo do tratamento com Ionomicina.

Com os elementos obtidos seria interessante realizar experiências de culturas com tímócitos TEL-JAK2 e células EL4.2 com um pré-tratamento do inibidor da calcineurina (ciclosporina A – CsA) antes de estimular com PMA juntamente com Ionomicina. Desta forma verificar-se-ia se nestas células se a via de sinalização calcineurina-NFAT estaria ou não envolvida na regulação da expressão do RANKL. Estudos realizados por Walsh et al., sugerem o envolvimento desta via de sinalização na regulação da expressão do RANKL em células T primárias e células T Jurkat (linha celular humana de LLA de linfócitos T). Como podemos verificar na Figura 4.1, a ativação da via calcineurina-NFAT leva à indução do RANKL, sendo esta inibida através da ciclosporina A. (Medyouf et al., 2007; Walsh et al., 2013).

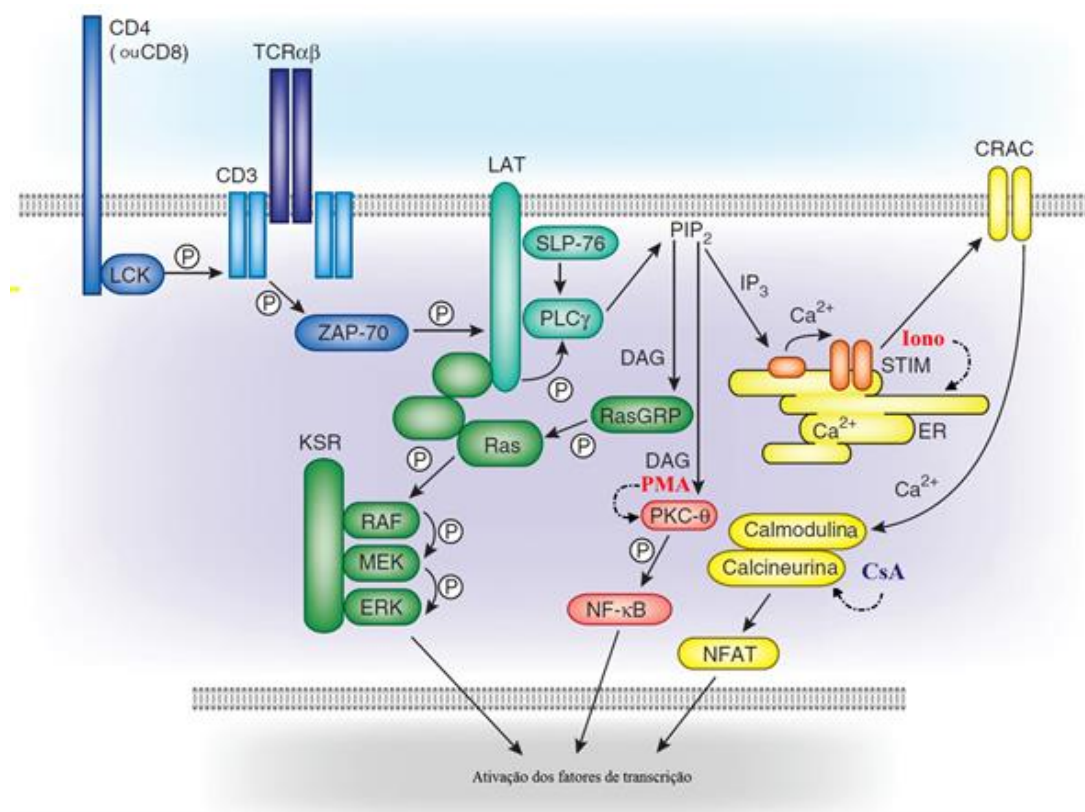


Figura 4. 1 Sinalização do TCR.

Ativação da via PKC/NF-κB através do composto PMA, ativação da via Ca²⁺ /NFAT. A vermelho são os compostos utilizados nas experiências, e a Azul o composto que não foi utilizado (Ciclosporina A). PMA - phorbol myristate acetate; Iono – Ionomicina; CsA – Ciclosporina A. (Adaptado de Morris e Alan, 2012)

IV.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPRESSÃO DO RECETOR RANK EM CÉLULAS DO MICROAMBIENTE NA EXPRESSÃO DE RANKL À SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS LEUCÉMICAS TEL-JAK2

Murganhos *knockout* para o *Rank* ou o *RelB*, entre outros, apresentam uma medula tímica defeituosa com redução no número de células epiteliais tímicas medulares (Takahama, 2006). Os murganhos *Rank knockout* apresentam uma arquitetura geral do baço intacto, no entanto têm um tamanho reduzido do corpo, com membros curtos, agregados linfóides, inclusive com indícios de uma elevada osteoporose (Dougall W.C. et al., 1999). Note-se porém que estes murganhos *knockout* não parecem apresentar defeitos na diferenciação/desenvolvimento de tímócitos (Leibbrandt e Penninger, 2008; Dougall W.C. et al., 1999).

Pretendemos então verificar o impacto da expressão do RANK em células do microambiente tímico que expressam queratina 5 na expressão do RANKL à superfície de células leucémicas TEL-JAK2. Para a realização desta experiência, criámos murganhos *Knockout* condicionais para o gene *Rank* (K5-CRE/*Rank* Flox), obtendo assim a inativação do *Rank* somente em células epiteliais tímicas que expressassem K5. Primeiramente analisámos a expressão de RANKL à superfície de tímócitos não leucémicos, por citometria de fluxo, em murganhos *Rank knockout* condicional (K5-CRE⁺/*Rank*^{F/F}) e comparámos com murganhos sem inativação de *Rank* (K5-CRE⁻/*Rank*^{F/F}). Verificámos que a expressão de RANKL à superfície de tímócitos CD4SP de murganhos *Rank knockout* é superior à expressão detetada em tímócitos de murganhos controlo. Concluímos então que a presença de RANK no microambiente tímico reduz a expressão de RANKL em tímócitos CD4SP por um mecanismo ainda por definir.

Uma vez que as células leucémicas de murganhos TEL-JAK2 têm uma elevada expressão de RANKL, quando comparados com tímócitos de murganhos de estirpe selvagem, (ver ponto IV.2) fomos verificar o que aconteceria a estas células na ausência do gene *Rank* em células do microambiente tímico. Para tal, extraímos célula leucémicas de timos de murganhos TEL-JAK2 em doença terminal para depois injetar por via endovenosa em murganhos K5-CRE⁺/*Rank*^{F/F} e murganhos controlo K5-CRE⁺/*Rank*^{+F}. Após 15/20 dias, os murganhos começaram a mostrar sintomas de leucemia sendo então abatidos para se proceder à recolha de células do baço, do timo e gânglios linfáticos, para análise por citometria de fluxo.

Análises anteriormente realizadas mostraram que células T leucémicas de murganhos TEL-JAK2 apresentam um fenótipo de diferenciação aberrante, caracterizado pela expressão de CD8, CD4, e CD25, entre outros marcadores de superfície (dos Santos et al., 2007;

Fernandes et al., 2015). Seguidamente, procedemos à análise da expressão de RANKL por citometria de fluxo em células leucémicas selecionando especificamente células com a marcação CD25⁺/CD8⁺. Com os resultados obtidos nesta análise, constatámos que as células CD25⁺/CD8⁺ apresentavam um ligeiro aumento na expressão de RANKL, pelo facto dos murganhos terem sido injetados com timócitos leucémicos TEL-JAK2. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente, no ponto III.2.3, onde os timócitos leucémicos TEL-JAK2 também apresentavam expressão de baixo nível de RANKL à superfície das células. Convém notar que comparando a expressão de RANKL no baço, timo e gânglios linfáticos de murganhos dos dois genótipos diferentes, K5-CRE⁺/Rank^{F/F} e K5-CRE⁺/Rank^{+F}, não se verificaram diferenças significativas na expressão desta proteína. Podemos pois assim inferir que a ausência do gene *Rank* em células do microambiente não influencia a expressão da proteína RANKL à superfície de células leucémicas, ao contrário do que ocorre em timócitos CD4SP. Nas experiências de transplantação que fizemos parece que a ausência do gene *Rank* também não influencia o desenvolvimento de LLA-T pois todos os animais tinham tumores de dimensão semelhante.

Alguns estudos relataram a importância do OPG como inibidor da ativação do RANK, apresentando uma grande afinidade de ligação com o RANKL (Aoki et al., 2010; Neumann et al., 2005; Khosla, 2001; Fili et al., 2009; Pérez-Sayáns et al. 2010). Em minha opinião, seria interessante e até possivelmente útil acrescentar a este estudo (nomeadamente a esta última experiência, onde os resultados não foram os esperados) um ensaio de certificação ou verificação se a expressão do OPG aumenta em células leucémicas quando estas são sujeitas às mesmas condições. Para além disso, seria interessante também comparar esses resultados com a expressão de OPG em timócitos não leucémicos *Rank knockout*.

IV.5 CONCLUSÕES GERAIS

Resumindo, os resultados deste estudo sugerem que durante o desenvolvimento da leucemia em murganhos TEL-JAK2 as células leucémicas aumentam a expressão de RANKL. Também se verificou que timócitos leucémicos de murganhos TEL-JAK2 apresentam uma maior expressão de RANKL quando estimulados com PMA juntamente com Ionomicina, sugerindo assim que estes compostos estimulam mais a ativação das vias NF-κB e NFAT. Já em células da linha celular EL4.2 verificámos que somente quando tratadas com PMA é que aumentam a

expressão de RANKL, o que nos faz sugerir que talvez a via NFAT possa já estar totalmente ativa.

Pudemos demonstrar ainda, que murganhos *Rank knockout* condicionais expressam a proteína RANKL à superfície de timócitos, se bem que, não apresentam diferenças significativas na expressão desta proteína à superfície de células leucémicas transplantadas. Para que estes resultados sejam mais precisos e concludentes, seria necessário repetir algumas destas experiências, recorrendo a uma maior amostragem de alguns pontos, tais como: a do ponto III.3.2, ponto III.3.3, células tratadas com PMA e Ionomicina separadamente e mais amostragens da experiência do ponto III.4.2. Isto de forma a confirmar as análises e obter assim resultados mais concludentes.

Outros e maiores estudos serão necessários para melhor se entender os mecanismos moleculares fundamentais no envolvimento da sinalização do RANK/RANKL na LLA-T. É pois de extrema importância tentar descobrir, primeiramente, se o RANK é fundamental no desenvolvimento da leucemia, a par da verificação do que acontece a esta proteína em leucemias humanas, antes do mesmo poder ser usado como alvo terapêutico desta enfermidade.

CAPITULO V – BIBLIOGRAFIA

Adolfsson J, Mansson, R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O, Thoren LAM, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SEW. (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 121: 295-306.

Akiyama T, Shinzawa M, Akiyama N. (2012) TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front Immuno* 3: 278.

Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, Udagawa N, Suzuki H. (2010) Function of OPG as a Traffic Regulator for RANKL Is Crucial for Controlled Osteoclastogenesis. *Bone and Mineral Research*. 25 (9): 907–1921.

Boyce BF, Xing L. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, 9(Suppl 1):S1.

Burke JR, Pattoli MA, Gregor KR, Brassil PJ, MacMaster JF, McIntyre KW, Yang X, Iotzova VS, Clarke W, Strnad J, Qiu Y, Zusi FC. (2003) BMS-345541 Is a Highly Selective Inhibitor of I_B Kinase That Binds at an Allosteric Site of the Enzyme and Blocks NF- κ B -dependent Transcription in Mice. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 278 (3):1450–1456.

Cardoso BA, Gírio A, Henriques C, Martins LR, Santos C, Silva A, Barata JT. (2008) Aberrant signaling in Tcell acute lymphoblastic leukemia: biological and therapeutic implications. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 41: 344-350.

Carron C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, Daniel M, Bernard O, Ghysdael J. (2000) TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood*. 95: 3891-3899.

Casimiro S, Mohammad KS, Pires R, Tato-Costa J, Alho I, Teixeira R, Carvalho A, Ribeiro S, Lipton A, Guise A, Costa L. (2013) RANKL/RANK/MMP-1 Molecular Triad Contributes to the Metastatic Phenotype of Breast and Prostate Cancer Cells In Vitro. *PLoS ONE* 8 (5): e63153.

Costa L, Lipton A, Hadji P, Chen YM., Kosmidis P. (2013) Treatment of bone metastases before the onset of pain. *International Journal of Clinical Oncology* 18 (3): 531-538.

Dornand J, Sekkat C, Mani JC, Gerber M. (1987) Lipoxygenase inhibitors suppress IL-2 synthesis: relationship with rise of [Ca ++]i and the events dependent on protein kinase C activation. *Immunology Letters*, 16: 101-106.

dos Santos NR, Ghezso MN, da Silva RC, Fernandes MT. (2010) Review: NF- κ B in Tcell Acute lymphoblastic leucemia: Oncogenic functions in leucemia and microenvirenmental cells. *Cancers* 2: 1838-1860.

dos Santos NR, Rickman DS, de Reynies A, Cormier F, Williame M, Blanchard C, Stern MH, Ghysdael J. (2007) Pre-TCR expression cooperates with TEL-JAK2 to transform immature thymocytes and induce T-cell leukemia. *Blood*. 109: 3972-3981.

dos Santos NR, Williams M, Gachet S, Cormier F, Janin A, Weih D, Weih F, Ghysdael J. (2008) RelB-dependent stromal cells promote T-cell leukemogenesis. *PLoS ONE*. 3:e2555.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko M. E, Maliszewski CR., Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh JA. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 13: 2412-2424.

Durinck K, Goossens S, Peirs S, Wallaert A, Loocke WV, Matthijssens F, Pietersa T, Milani G, Lammens T, Rondou P, Roy NV, De Moerloose B, Benoit Y, Haigh J, Speleman F, Poppe B, Van Vlierberghe P. (2015) Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Elsevier Experimental Hematology* 43: 625-639.

Fernandes MT, Ghezzi MN, Silveira AB, Kalathur RK, Póvoa V, Ribeiro AR, Brandalise SR, Dejardin E, Alves NL, Ghysdael J, Barata JT, Yunes JA, dos Santos NR. (2015) Lymphotoxin- β receptor in microenvironmental cells promotes the development of T-cell acute lymphoblastic leukaemia with cortical/mature immunophenotype. *British Journal of Haematology*, in press. DOI: 10.1111/bjh.13760.

Fili S, Karalaki M, Schaller B. (2009) Mechanism of bone metastasis: The role of osteoprotegerin and of the host-tissue microenvironment-related survival factors. *Cancer Letters* 283: 10–19.

Gameiro J, Nagib P, Verinaud L. (2010) The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. *Cell Adhesion & Migration* 4:3 382-390.

Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, Trichereau J, Paolino M, Qadri F, Plehm R, Klaere S, Komnenovic V, Mimata H, Yoshimatsu H, Takahashi N, Haeseler A, Bader M, Kilic SS, Ueta Y, Pifl C, Narumiya S, Penninger JM. (2009) Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 462: 505-509.

Harrison CJ. (2001) Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14 (3): 593-607.

Herranz D, Ambesi-Impiombato A, Palomero T, Schnell SA, Belver L, Wendorff AA, Xu L, Castillo-Martin M, Llobet-Navás D, Cordon-Cardo C, Clappier E, Soulier J, Ferrando AA. (2014) A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 20: 1130-1137.

Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yoshikai Y, Inoue JI, Akiyama T, Takahama Y. (2008) The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Cell press Immunity* 29: 438-450.

Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1999) TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cells subsets and induce cytokine production in dendritic cells. *Journal Immunol* 162 (5): 2562-2568.

Khosla S. (2001) Minireview: The OPG/RANKL/RANK. *System Endocrinology* 142(12):5050–5055.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997) Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91: 661-672.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397: 315-323.

Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffé M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. (1997) A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 14;278(5341):1309-1312.

Lai AY, Kondo M. (2008) T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol.* 20 (4): 207-212.

Leibbrandt A, Penninger JM. (2008) RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143: 123-150.

Liang CC, You LR, Chang JL, Tsai TF, Chen CM. (2009) Transgenic mice exhibiting inducible and spontaneous Cre activities driven by a bovine keratin 5 promoter that can be used for the conditional analysis of basal epithelial cells in multiple organs. *Biomedical Science* 16:2.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *METHODS.* 25: 402-408.

Mackall C, Merchant M, Fry T. (2014) Immune-based therapies for childhood cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 11: 693-703.

Medyouf H, Alcade H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, Janin A, Decaudin D, de Thé H, Ghysdael J. (2007) Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine.* 13: 736-741.

Medyouf H, Gusscott S, Wang H, Tseng JC, Wai C, Nemirovsky O, Trumpp A, Pflumio F, Carboni J, Gottardis M, Pollak M, Kung AL, Aster JC, Holzenberger M, Weng AP. (2011) High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *Journal of experimental Medicine* 208 (9): 1809-1822.

Moore NC, Girdlestone J, Anderson G, Owen JJ, Jenkinson EJ. (1995) Stimulation of thymocytes before and after positive selection results in the induction of different NF-kappa B/Rel protein complexes. *Journal Immunol.* 55(10):4653-60.

Morris GP, Allen PM. (2012) How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nature Immunology* 13:121–128.

Neumann E, Gay S, Muller-Ladner U. (2005) The RANK/RANKL/Osteoprotegerin System in Rheumatoid Arthritis: New Insights From Animal Models. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 52 (10): 2960–2967.

Owen J A, Punt J, Stranford S A. (2009) KUBY Immunology. Ed. 7. New York, W. H. Freeman and Company: 299-389.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JMG, García-García A. (2010) RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *ELSEVIER Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 109 (5): 679-686.

Perry RP, Kelley DE. (1970) Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: Characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of Cellular Physiology* 76 (2): 127-233.

Pui CH, Robison LL, Look AT. (2008) Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*. 371: 1030-1043.

Reich E, Franklin RM, Shatkin AJ, Tatum EL. (1961) Effect of Actinomycin D on Cellular Nucleic Acid Synthesis and Virus Production. *Science* 134 (3478): 556-557.

Rezzani R., Bonomini F., Rodella L. F. (2008) Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *ELSEVIER Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 43: 73-120.

Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M, Schneider P, Grosse-Hovest L, Salih HR. (2013) Receptor Activator for NF- κ B Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, Function, and Modulation of NK Cell Immuno surveillance. *Immunology* 190 (2): 821-831.

Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M, Schneider P, Jung G, Grosse-Hovest L, Salih HR. (2013) RANKL expression, function and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research* 73: 683.

Servan-Chiara F, Grausz JD, Garnier F, Gerlier D. (1986) Sustained IL-2 production by the EL4 subline during continuous phorbol diester stimulation is related to an increase of IL-2-mRNA. *Journal Immunol Methods*. 88(2):207-215.

Silva A, Laranjeira ABA, Martins LR, Cardoso BA, Demengeot J, Yunes JÁ, Seddon B, Barata JT. (2011) IL-7 Contributes to the Progression of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *Cancer Research* 71 (14): 4780-4789.

Singh PP, van der Kraan AGJ, Xu J., Gillespie MT, Quinn JMW. (2012) Membrane-bound receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Elsevier Biochemical and Biophysical Research Communications* 422(1): 48-53.

Springuel L, Renauld JC, Knoops L. (2015) JAK Kinase Targeting In Hematologic Malignancies: A Sinuous Pathway From Identification Of Genetic Alterations Towards Clinical Indications. *Haematologica* 100: 1240-1253.

Takahama Y. (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology* 6:127-135.

Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M. (2011) Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signaling. *Nature* 470: 548-553.

Tarutani M, Itami S, Okabe M, Ikawa M, Tezuka T, Yoshikawa K, Kinoshita T, Takeda J. (1997) Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *PNAS* 94 (14): 7400-7405.

Uzan B, Poglio S, Gerby B, Wu CL, Gross J, Armstrong F, Calvo j, Cahu X, Deswarte C, Dumont F, Passaro D, Besnard-Guérin C, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Ballerini P, Baud V, Ghysdael J, Baleyrier F, Porteu F, Pflumio F. (2014) Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO Molecular Medicine* 6: 821-834.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. (2006) RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Cell - TRENDS in Molecular Medicine* 12 (1): 17-25.

Walsh NC, Alexander KA, Manning CA, Karmakar SK, Wang JF, Weyand CM, Pettit AR, Gravalles EM. (2013) Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL. *Genes and Immunity* 14: 336–345.

Wang R, Zhang L, Zhang X, Moreno J, Luo X, Tondravi M, Shi Y. (2001) Differential Regulation of the Expression of CD95 Ligand, Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL), TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), and TNF- α During T Cell Activation. *Immunology* 166 (3): 1983-1990.

Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del B C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. (2006) C-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.*21(5): 625.

Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Rédini F. (2004) RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta reviews on cancer* 1704 (2): 49– 57.

ANEXO A

Resultados RT-qPCR

A figura 1 representa os resultados da expressão do mRNA relativo de RANKL que foram determinados pelos valores CT. (dados não publicados, Fernandes, MT)

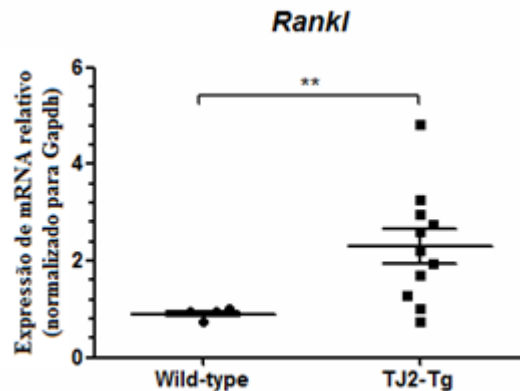
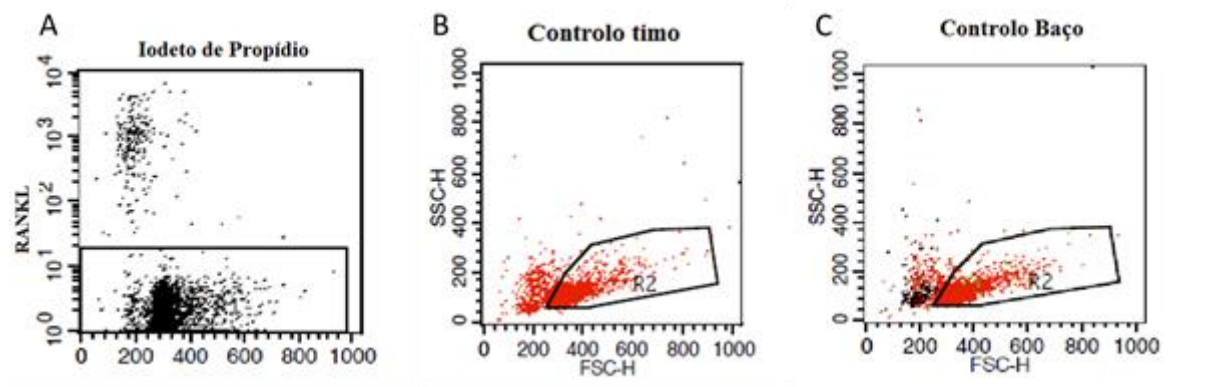


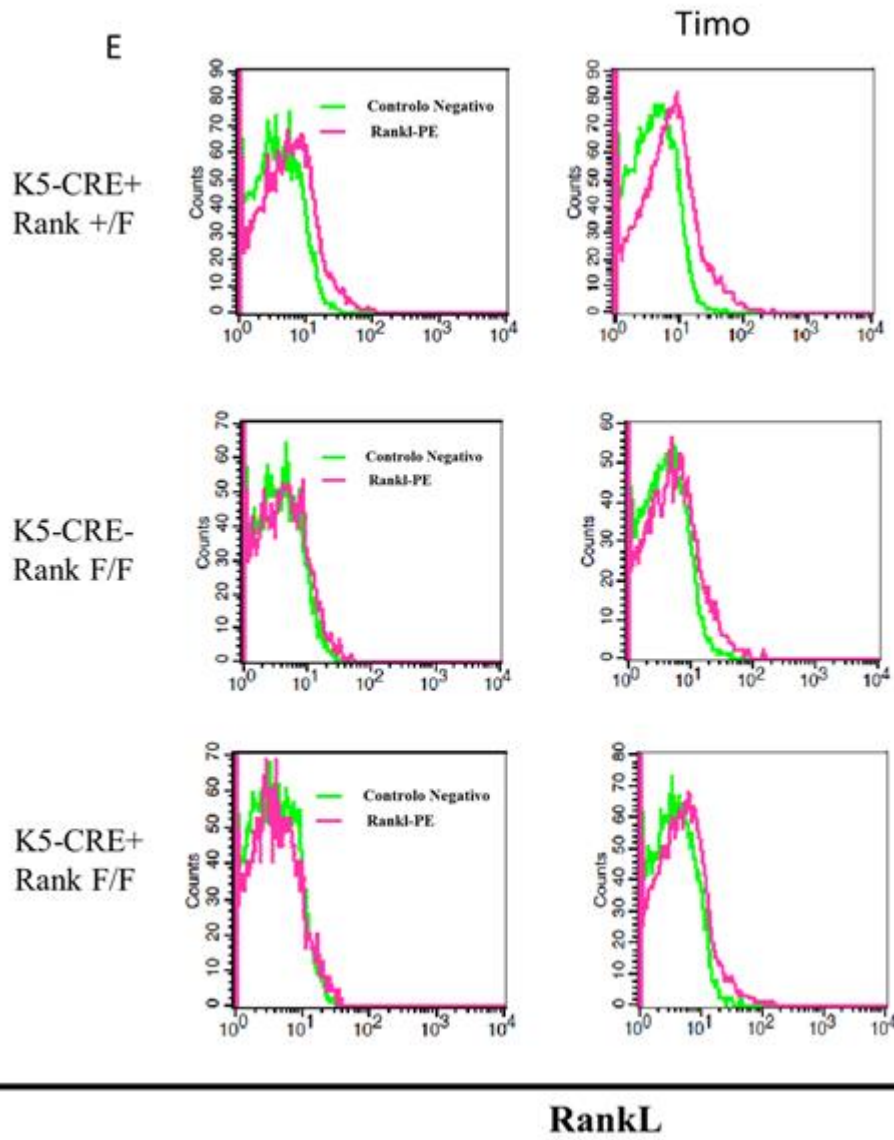
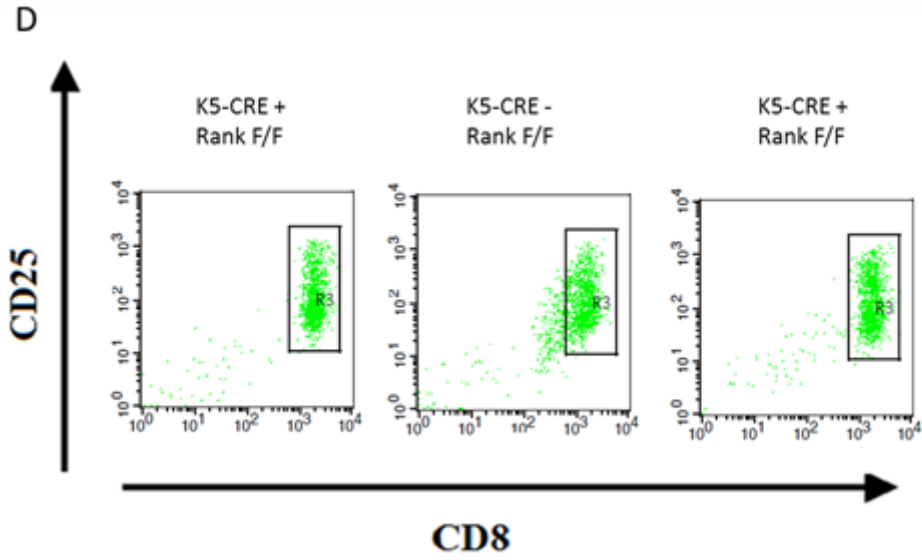
Figura 1. Níveis de mRNA relativo de RANKL em tímócitos leucémicos TEL-JAK2 e wild-tipe (estirpe selvagem).

Análise dos níveis mRNA de *RankL* em tímócitos de onze amostras TEL-JAK2 transgênicos e 4 amostras wild-type (Estirpe Selvagem) (relativo à expressão de uma amostra wild-type, standardizado para um) por RT-qPCR. ** P < 0.01

ANEXO B

A figura 2 representa os resultados da detecção da proteína RANKL na superfície de células leucémicas na ausência do seu recetor em células do microambiente.





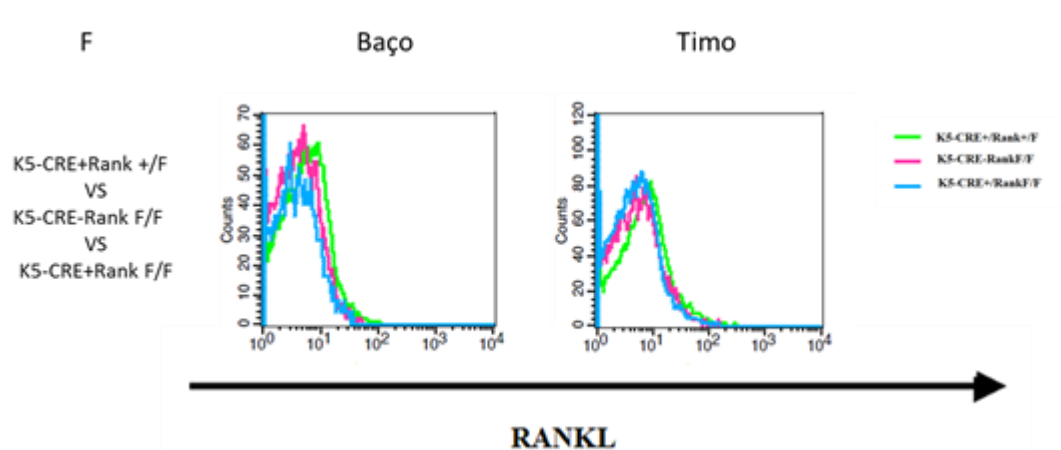


Figura 2. Análise da expressão de RANKL por citometria de fluxo.

A) As células viáveis foram identificadas e selecionadas (R1) para análise através da marcação com Iodeto de propídio; B) Estratégia de seleção de células leucémicas do Baço usadas para análise (R2); C) Estratégia de seleção de células leucémicas do Timo usadas para análise (R2); D) Estratégia de seleção das células leucémicas por seleção de células CD25⁺ e CD8⁺ (R3); E) Expressão da proteína RANKL no Baço e Timo de células de murganhos com três genótipos diferentes (K5-CRE⁺/Rank^{+/F}, K5-CRE⁻/Rank^{F/F}, K5-CRE⁺/Rank^{F/F}) através da seleção feita pela caixa R3, a linha verde é referente a células sem anticorpo (Controlo negativo) e a linha rosa é referente a células com anticorpo RANKL-PE; F) Comparação da expressão de RANKL no Baço e Timo, entre os três genótipos, a linha verde é referente a células com anticorpo RANKL-PE do murganho K5-CRE⁺/Rank^{+/F}, a linha rosa é referente a células com anticorpo RANKL-PE do murganho K5-CRE⁻/Rank^{F/F} e a linha azul é referente a células com anticorpo RANKL-PE do murganho K5-CRE⁺/Rank^{F/F}.