



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA GONÇALVES DE OLIVEIRA CAVASSIN

**POLIMORFISMO GENÉTICO DA QUIMIOCINA SDF-1
HUMANA E EXPRESSÃO DO RNA MENSAGEIRO DO SEU
RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA E LINFOMA**

Londrina
2004

GABRIELA GONÇALVES DE OLIVEIRA CAVASSIN

**POLIMORFISMO GENÉTICO DA QUIMIOCINA SDF-1
HUMANA E EXPRESSÃO DO RNA MENSAGEIRO DO SEU
RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA E LINFOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe

Londrina
2004

GABRIELA GONÇALVES DE OLIVEIRA CAVASSIN

**POLIMORFISMO GENÉTICO DA QUIMIOCINA SDF-1
HUMANA E EXPRESSÃO DO RNA MENSAGEIRO DO SEU
RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA E LINFOMA**

BANCA EXAMINADORA

Eiko Nakagawa Itano

Maria Angélica Herrera Watanabe

Fernando Luiz de Lucca

Londrina, 29 de janeiro de 2004.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu amado
filho Matheus

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Angelica por mais uma vez ser minha orientadora e amiga. Agradeço também sua compreensão, paciência e grande visão, sem os quais esse trabalho não poderia ser concretizado.

À meu grande amigo e companheiro Dijalma, por estar presente em todos os momentos importantes de minha vida. Agradeço também sua cooperação nas diversas etapas desse trabalho.

À Nayara que esteve envolvida neste projeto desde o início, sempre auxiliando com presteza e grande competência.

À meu filho pela paciência e também à Laureana, Marla, Kadu, Karen, Dr. Luis Gabriel, Dra. Cristina Faune e Sandra, os quais contribuíram significativamente.

CAVASSIN, Gabriela G.O. **Polimorfismo genético da quimiocina SDF-1 humana e expressão do RNA mensageiro do seu receptor CXCR4 em leucemia e linfoma.** 2004. 91f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

RESUMO

O SDF-1 (fator derivado do estroma da medula óssea), também conhecido como CXCL12, e seu receptor CXCR4 estão envolvidos no tráfego de células B e progenitores hematopoéticos. A medula óssea produz o SDF-1, o qual possui atividade marcante de quimiotaxia através da ligação com seu receptor CXCR4 acoplado a proteína G, em um complexo que envolve 7 domínios glicoprotéicos transmembrana celular. O SDF-1 não é somente expresso na medula óssea, mas também em outros tecidos, sugerindo outras atividades biológicas, não restritas somente à migração de precursores hematopoéticos. Existe a hipótese que o SDF-1 contribui para o extravasamento de leucócitos mesmo na ausência de inflamação, um processo importante no tráfego dos linfócitos. O sequenciamento da quimiocina SDF, (*GenBank*: L 36033), revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não codificadora (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito. Este alelo variante pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de SDF. As análises demonstraram que 38,8% (24/62) dos pacientes portadores de linfoma possuem o genótipo heterozigótico 3'A/wt em contraste com 26,1% (11/42) dos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide. A porcentagem de portadores do gene 3'A teve variação estatisticamente significativa entre os pacientes diagnosticados com linfoma em relação aos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide. Essa variação genética deve representar uma função regulatória importante pelo possível aumento de SDF-1 pelo estroma dos linfonodos. Este trabalho sugere que este polimorfismo pode ser um determinante diferencial nos pacientes acometidos com linfomas e leucemias. Têm-se identificado, em uma proporção crescente, moléculas quimioatraentes capazes de permitir a migração *in vitro* de células linfóides. Um exemplo é a leucemia linfóide crônica, onde as células expressam CXCR4 e podem ser atraídas pelo gradiente da quimiocina SDF-1. Em adição, o CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma, bem como em linhagens mielóides. A fim de se avaliar a importância da expressão do receptor CXCR4 no desenvolvimento das células leucêmicas, tráfego celular e tratamento clínico, realizou-se ensaios para a expressão de RNA mensageiro do receptor CXCR4 em sangue periférico de 10 pacientes com LLA, além da comparação com dados clínicos relevantes. Quando utilizou-se *primers* específicos para o RNA mensageiro do receptor CXCR4, foi detectada uma banda única de 400 pb proveniente do RNA obtido das amostras celulares de sangue periférico de 6 pacientes, os quais sofreram recidiva e foram submetidos à quimioterapia por mais de 3 anos. Além disso, detectou-se o genótipo wt/wt para o SDF-1 nestes mesmos pacientes. Em contraste, o RNA mensageiro específico para CXCR4 não foi encontrado nas células de 4 pacientes, os quais já haviam terminado a quimioterapia. Desses últimos pacientes, observou-se que um era portador do genótipo wt/wt e três eram heterozigotos para o gene SDF1-3'A. Ensaios do RNA mensageiro para o receptor CXCR4 em células de sangue periférico de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda juntamente com a genotipagem de SDF-1, podem representar novos marcadores para avaliar a eficácia do tratamento desses pacientes.

Palavras-chave: Quimiocinas, Quimiocina SDF-1 (fator derivado do estroma da medula óssea), Quimiocina CCL12, Receptor de quimiocina CXCR4, Leucemia linfóide, Linfoma, Região 3' não codificadora (3'UTR) do RNA mensageiro.

CAVASSIN, Gabriela G.O. **Genetic Polymorphism of human SDF-1 chemokine and expression of messenger RNA for its receptor CXCR4 in leukemia and lymphoma.** 2004. 91f. Dissertation (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ABSTRACT

The chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF1), also known as CXCL12, and its monogamous receptor CXCR4 are involved in trafficking of B cells and hematopoietic progenitors. The predominant chemotactic factor produced by bone marrow stromal cells is SDF-1, which has been shown to mediate its effects by binding to its receptor, CXCR4, a GTP-binding protein (G-protein)-coupled 7-transmembrane glycoprotein. SDF-1 is expressed not only in bone marrow, but also in other tissues suggesting that the biological function of SDF-1 is not limited to homing of haematopoietic stem cells. SDF-1 has been hypothesized to contribute to extravasation of leucocytes in the absence of inflammation, a process important for lymphocyte trafficking. Sequence analysis of the human SDF gene (GenBank accession number L36033) has revealed a common variant, designated SDF-1-3'A, consisting of a G→A transition in an evolutionary conserved segment of the 3' untranslated region (3'-UTR). Because this mutation eliminates an *Msp I* restriction site, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR-amplified cDNA can be used for rapid identification of genotypes. This segment of the 3'-UTR may be involved in regulating the transcription and/or translation of the SDF-1 gene, and this variant is thought to increase the production of SDF-1. We identified the heterozygous genotype (3'A/wt) in 38,8% (24/62) lymphoma patients and 26,1 % (11/42) in lymphoid patients. The heterozygous genotype in lymphoma patients was greater than that lymphoid leukemias. This work indicates that lymphoma patients are more likely to carry 3'A gene than that in lymphoid leukemia, suggesting that this polymorphism may be a differential determinant of lymphomas and lymphoid leukemia.

An increasing number of chemoattractants capable of supporting the *in vitro* migration of malignant lymphoblasts has been identified. For example, chronic as well as acute B lymphocytic leukemia cells have been observed to express CXCR4 and to be chemoattracted to SDF-1. In addition, CXCR4 is highly expressed in B lymphoma cell lines, as well as in myeloid cell lines and AML blasts. To evaluate the importance of SDF1/CXCR4 in leukemia cell development and trafficking, we assayed messenger RNA for CXCR4 and SDF-1 genotype in peripheral blood cells from 10 patients with lymphocytic leukemia (LL). We observed CXCR4 expression in cells of six patients, all of whom had experienced relapse and had undergone chemotherapy for over 3 years and all of whom had the SDF-1 wt/wt genotype. In contrast, CXCR4-specific mRNA was absent from the cells of four patients, all of whom had finished chemotherapy. These findings suggest that assays of CXCR4 mRNA expression and SDF-1 genotype in peripheral blood cells from LL patients may be useful for assessing the efficacy of treatment of these patients.

Keywords: Chemokines, Chemokine SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), Chemokine CCL12, CXCR4 receptor, Lymphoid leukemia, Lymphoma, 3'UTR (3'untranslated region) of messenger RNA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura tridimensional da quimiocina SDF- 1	20
FIGURA 2 – Leucemia Linfóide Aguda	56
FIGURA 3 – Leucemia Linfóide Aguda subtipo L3	57
FIGURA 4 – Método citoquímico de PAS	58
FIGURA 5 – Método citoquímico de Peroxidase	59
FIGURA 6 – Leucemia Linfóide Crônica	60
FIGURA 7 – Linfoma de Hodgkin tipo celularidade mista	61
FIGURA 8 – Linfoma não Hodgkin difuso de grandes células	61
FIGURA 9 – Integridade do DNA	62
FIGURA 10 – Amplificação do fragmento de 293 bp do SDF	63
FIGURA 11 – Digestão enzimática do fragmento SDF-1	64
FIGURA 12 – Portadores do alelo SDF1-3'A em pacientes com linfoma e leucemia linfóide	66
FIGURA 13 – Genotipagem de SDF em 10 pacientes por RT-PCR seguido da análise por RFLP <i>Msp</i> I	70
FIGURA 14 – Integridade das amostras de RNA obtidos das células de sangue de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda.....	71
FIGURA 15 – Expressão do RNA mensageiro para o receptor de quimiocinas CXCR4 em amostras de sangue de pacientes portadores de Leucemia Linfóide.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação imunológica das leucemias linfóides agudas- ^{EGIL}	26
Tabela 2 – Proposta da WHO para classificação das leucemias agudas (LLA) e sua correlação com a FAB	27
Tabela 3 – Sistema de Escore para a definição das leucemias bifenotípicas agudas (BAL)* ^{EGIL}	31
Tabela 4 – Distribuição de idade e sexo entre as neoplasias estudadas.....	55
Tabela 5 – Frequência alélica do SDF1-3'A em pacientes com Leucemia e Linfoma	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- SDF-1** – Fator derivado do estroma da medula óssea
- LLA** – Leucemia Linfóide Aguda
- CXCR4** – Receptor de quimiocina – 4 – Família CXC
- LLC** – Leucemia Linfóide Crônica
- CXCR3** – Receptor de quimiocina – 3 – Família CXC
- CXCR5** – Receptor de quimiocina – 5 – Família CXC
- RNA** – Ácido ribonucléico
- CC** – Cisteína- Cisteína
- CXC** – Cisteína- X aminoácido- Cisteína
- XC** – X aminoácido- Cisteína
- CX₃C** – Quimiocina com 3 resíduos de aminoácidos entre 2 resíduos de cisteína
- ELR** – Domínio formado por 3 aminoácidos GLU-LEU-ARG- confere propriedade angiogênica
- GPCR** – Receptor acoplado a proteína G
- DARC** – Antígeno *Duffy* receptor para quimiocina
- RAS** – Proteína regulada e secretada
- RGS** – Proteínas regulatórias de sinalização de proteína G
- CXCR1** – Receptor de Quimiocina- 1- Família CXC
- CXCR2** – Receptor de Quimiocina- 2- Família CXC
- CCR3** – Receptor de Quimiocina- 3- Família CC
- CCR7** – Receptor de Quimiocina- 7- Família CC
- CCR1** – Receptor de Quimiocina- 1- Família CC
- CCR2** – Receptor de Quimiocina- 2- Família CC
- CCR4** – Receptor de Quimiocina- 4- Família CC
- CCL25** – Quimiocina – 25- Família CC
- CCL17** – Quimiocina – 17- Família CC
- CCL19** – Quimiocina – 19- Família CC
- TNF- α** – Fator de Necrose Tumoral-alfa
- IL-1** – Interleucina- 1
- NK** – Célula matadora natural- *natural killer*
- PF-4** – Fator plaquetário- 4
- IP-10** – Produto de interferon- 10

MIP- α – Proteína inflamatória de macrófagos- alfa
LESTR – Receptor de Quimiocina agora designado CXCR4
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
CD4 – Marcador de superfície celular- 4
CALLA – Antígeno de diferenciação linfóide
TdT – Desoxinucleotidil transferase terminal
CD10 – Marcador de superfície celular- 10
CD19 – Marcador de superfície celular- 19
CD24 – Marcador de superfície celular- 24
CXCL12 – Quimiocina SDF-1
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
FAB – Grupo Franco Americano e Britânico
EGIL – Grupo Europeu de Estudos para caracterização imunológica das leucemias
OMS – Organização Mundial da Saúde
IFN – Interferon
Ig – Imunoglobulina
RT – Reação de transcrição reversa
PCR – Reação em cadeia de polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ASPECTOS GERAIS	13
1.2 LEUCEMIAS.....	23
1.2.1 Leucemias agudas.....	23
1.2.2 Leucemia Linfóide Aguda.....	27
1.2.3 Leucemia Indiferenciada Aguda (AUL).....	29
1.2.4 Leucemia Aguda Mista e Bifenotípica	29
1.3 LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA.....	31
1.4 LINFOMAS	33
1.4.1 Linfoma de Hodgkin.....	34
1.4.2 Linfomas não Hodgkin	37
2 OBJETIVOS	43
2.1 GERAL	43
2.2 ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 PACIENTES.....	44
3.2 AMOSTRA BIOLÓGICA	44
3.3 MÉTODOS CITOQUÍMICOS.....	45
3.3.1 Coloração de PAS.....	45
3.3.2 Coloração de Peroxidase	46
3.4 COLORAÇÃO DE MAYGRÜNWARD GIEMSA	46
3.5 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA EOSINA	47
3.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA QUIMIOCINA SDF-1	47
3.6.1 Obtenção do DNA	47
3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para SDF-1	48
3.6.3 Tratamento do produto de PCR com a enzima de restrição <i>Msp</i> I.....	50
3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNAM DO RECEPTOR CXCR4	51
3.7.1 Obtenção de Leucócitos para RNA	51
3.7.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)	51
3.7.3 Condições da Reação em Cadeia Polimerásica- \exists actina.....	51

3.7.4 Condições da Reação em Cadeia Polimerásica- CXCR4.....	52
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 IDADE E SEXO.....	54
4.2 LEUCEMIAS LINFÓIDES	55
4.3 LINFOMAS	60
4.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO DNA	62
4.5 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE SDF-1	62
4.6 TRATAMENTO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Msp</i> I	64
4.7 ANÁLISE GENOTÍPICA DO SDF-1	65
4.8 PORTADORES DO ALELO 3' A.....	65
4.9 SDF-LLA.....	69
4.10 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA- \exists ACTINA	70
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNAM- CXCR4	71
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A leucemia aguda é a neoplasia mais comum na infância. As leucemias são alterações clonais caracterizadas por um descontrole da proliferação de células da linhagem hematopoiética. Nas leucemias agudas, existe um bloqueio na diferenciação das células hematopoiéticas ou linfopoiéticas conduzindo a um acúmulo de blastos imaturos circulantes no sangue, medula óssea, e algumas vezes, em sítios extra medulares. A leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde à cerca de 75-85% dos casos de leucemia aguda em pacientes menores de 15 anos de idade (MARGOLAIN & POPLACK, 1997; BATHIA *et al.*, 1999).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças é uma malignidade que possui o potencial de infiltrar o fígado, baço, linfonodos e cérebro. Esta apresentação extra medular é importante para que se entenda a biologia desta doença e também para o desenvolvimento de novos parâmetros prognósticos. O tráfego das células blásticas é explicado pela interação de seus receptores CXCR4 com a quimiocina SDF-1 produzida pelas células do estroma da medula e também de outros órgãos. Demonstrou-se que pacientes com alto nível de infiltração extramedular expressavam o receptor CXCR4 em suas células B maduras (LLA B) de forma mais intensa que os pacientes sem infiltração. Conseqüentemente, a expressão de CXCR4 é preditivo para envolvimento extramedular, independente da contagem de células blásticas a nível de sangue periférico (CRAZZOLARA *et al.*, 2002).

A leucemia linfóide crônica é neoplasia clonal de linfócitos B (raramente linfócitos T), geralmente indolente, provocando acúmulo lento e progressivo de pequenos linfócitos imunoincompetentes. Observa-se uma falha nos mecanismos apoptóticos, imunossupressão, falência medular e infiltração em outros órgãos e tecidos.

As células leucêmicas da LLC expressam receptores para as quimiocinas CXCR3, CXCR4 e CXCR5, os quais contribuem para o tráfego dessas células *in vitro* (BURGER & KIPPS, 2002).

Observou-se que as células leucêmicas escapam da apoptose *in vitro* quando entram em contato com células produtoras de SDF. Sugere-se que as quimiocinas e seus receptores, além de governar a migração das células leucêmicas, também podem contribuir com sua notável resistência à apoptose induzida pela quimioterapia. É possível que os

receptores CXCR4 entre outros possam representar um novo alvo para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esta doença (BURGER & KIPPS, 2002).

Apesar da classificação de linfomas ser baseada em sua maior parte em manifestações anatômicas e histopatológicas, informações adicionais têm sido fornecidas pela imunologia, citogenética e bioquímica. Os linfomas são divididos em duas grandes categorias: (1) doença de Hodgkin e (2) linfomas não-Hodgkin, baseando-se na presença ou ausência de células de Hodgkin, especialmente células de Reed-Sternberg (KLEIN *et al.*, 1992).

O SDF-1 é uma quimiocina produzida pelas células do estroma da medula óssea, a qual tem um importante papel na linfopoese de células B e na migração de células tronco à medula óssea. O seu RNA mensageiro é abundantemente expresso nas células do estroma isoladas de pacientes com linfoma não Hodgkin maligno (BURI *et al.*, 2001). Várias linhagens celulares estudadas, incluindo: células de Burkitt, células difusas, foliculares, etc. expressaram CXCR4 em sua superfície e migraram na presença da quimiocina SDF-1. Diversos estudos demonstraram uma inibição na migração de células de linfoma B aos linfonodos quando utilizado anticorpo monoclonal anti-CXCR4 (ARAI *et al.*, 2000).

Poucos campos de estudo da Biologia Molecular sofreram revolução tão acentuada quanto o campo das quimiocinas. A primeira dessas pequenas moléculas com efeito quimiotático potente para neutrófilos, agora conhecida como IL-8, foi clonada na década de 90 (WOLPE *et al.*, 1988; CHOLLET-MARTIN *et al.*, 1993; WADA *et al.*, 1994). Desde as décadas de 60-70, mais de 40 quimiocinas humanas e muitos homólogos em murinos foram descobertas (CLARK-LEWIS *et al.*, 1991; COLLINS *et al.*, 1993; SCKIDO *et al.*, 1993). O termo quimiocina foi aplicado a estas moléculas pois acreditava-se que sua principal atividade biológica era de quimiotaxia, ou seja, direcionar o movimento de outras células durante os processos inflamatórios. Recentemente tornou-se evidente que seus efeitos estendem-se muito além de atrair leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicam que as quimiocinas participam no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na recirculação dos leucócitos e na regulação imunológica (LUSTER *et al.*, 1995; YOSHIMURA *et al.*, 1987; WALZ *et al.*, 1989; BAGGIOLINI *et al.*, 1994; SARAFI *et al.*, 1997; LUSTER, 1998; CHENSUE, 2001).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, que tem a função de mensageiros intercelulares, as quais carregam sinais regulatórios de célula para célula. São produzidas por vários tipos celulares e estão presentes principalmente em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos é essencial na resposta do hospedeiro durante a infecção (KELNER *et al.*, 1994; BAGGIOLINI *et al.*, 1997).

As quimiocinas formam uma superfamília de cerca de 45-50 proteínas variando em tamanho de 8 a 17 kDa que provavelmente surgiram através de duplicações e modificações de um gene ancestral. Elas apresentam uma homologia estrutural baseada em seus resíduos conservados de cisteína, e também na capacidade particular de ligar-se a receptores acoplados à proteína G transmembrana (ROSSI & ZLOTNIK, 2000; ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). Quatro famílias de quimiocinas foram descritas: CC, CXC, XC, e CX₃C, sendo as famílias CC (beta-quimiocinas, onde os dois primeiros resíduos de cisteína são adjacentes) e CXC (alfa-quimiocinas, que têm um aminoácido que separa os dois primeiros resíduos de cisteína), as mais comuns (CHOE *et al.*, 1996; BAGGIOLINI *et al.*, 1997; LUSTER, 1998). Para cada família de quimiocinas descrita, existem receptores respectivos (CCR, CXCR, XCR E CX₃CR), acoplados à proteína G, os quais mediarão suas funções junto às células-alvo.

A subfamília CXC é também classificada de acordo com a presença dos domínios ELR ou não ELR, o que significa a presença de três aminoácidos- GLU-LEU-ARG- que precedem o primeiro resíduo de cisteína na estrutura primária dessa subfamília (BLEUL *et al.*, 1996 a; BLEUL *et al.*, 1997). A presença deste domínio ELR confere propriedades angiogênicas à estas quimiocinas, e a ausência desse domínio confere propriedades angiostáticas (BAZAN *et al.*, 1997).

Virtualmente, cada tecido e tipo celular residente pode ser induzido a secretar quimiocinas. Enquanto determinadas células, como os macrófagos por exemplo, podem produzir uma variedade de quimiocinas, há tecidos que exibem uma produção restrita a alguns tipos, sugerindo que algumas quimiocinas têm funções órgão-específicas (CHENSUE, 2001).

Sabe-se que as quimiocinas exercem seus efeitos através de receptores acoplados à proteína G (nucleotídeo guanosina- GPCR), os quais formam uma grande família (mais de mil constituintes, representando 1% do genoma) de receptores que estão envolvidos em um grande espectro de estímulos extracelulares como os hormônios, neurotransmissores, quimiocinas, etc... Em geral, os receptores de quimiocinas possuem 320 a 380 aminoácidos em extensão e mostram uma significativa homologia em sua seqüência. Como todos os receptores GPCR, os receptores para quimiocinas possuem sete domínios transmembrana hidrofóbicos com três domínios intracelulares e três domínios extracelulares. A região extracelular glicosilada amino-terminal está envolvida na ligação com as quimiocinas, enquanto que a região intracelular carboxi-terminal está envolvida na ligação com a proteína G e está sujeita à fosforilação regulatória.

A ativação do receptor de quimiocinas inicia-se com a interação extracelular de seus ligantes e a ativação do complexo de proteína G. Esta interação resulta na dissociação das subunidades de proteína G (subunidade alfa, beta e gama). Esta dissociação por sua vez, ativa enzimas como a fosfolipase C e a fosfoinositidil-3-quinase, as quais convertem o fosfatidilinositol-4,5-difosfato (IP₂) em fosfatidilinositol-1,4,5 trifosfato (IP₃) e diacilglicerol. O IP₃ estimula o influxo de íons cálcio e o diacilglicerol ativa a proteína quinase C (PREMACK *et al.*, 1996; MURPHY,1994; BOKOCH,1995).

As proteínas ligantes estão envolvidas na motilidade celular através da regulação de processos actina-dependentes, tais como ondulação da membrana, formação de pseudópodos e também da organização de complexos focais de adesão. Portanto, o que tem sido demonstrado é que os receptores de quimiocinas ativam múltiplas vias sinalizadoras da célula, os quais regulam a maquinaria intracelular necessária para determinadas respostas celulares (CHENSUE, 2001).

No meio intracelular ocorre uma cascata de eventos envolvendo a fosforilação de diversas enzimas quinases e GTPases como *RAS* e *RHO* que resultam em adesão celular, quimiotaxia, degranulação e *burst* respiratório (LAUDANNA *et al.*, 1996).

Um aspecto interessante é que os receptores de quimiocinas podem ligar-se a diferentes tipos de proteína G, as quais representam uma grande classe de proteínas transdutoras de sinais.

Após a ligação das quimiocinas com os respectivos receptores, haverá internalização destes receptores, os quais devem ser degradados ou reciclados, tornando a membrana celular temporariamente não responsiva a uma ligação posterior. A região C-terminal possui alvos que podem ser fosforilados por proteínas quinases, o que permite a ligação de moléculas regulatórias, que também provocam dessensibilização do receptor através do desacoplamento. Uma outra maneira pela qual pode haver regulação é através da inativação da proteína G pela ação de GTPases como as proteínas regulatórias de sinalização de proteína G (RGS).

As quimiocinas interagem também com dois tipos de moléculas não sinalizadoras. Um tipo é o receptor eritrocitário chamado DARC (antígeno *Duffy* receptor para quimiocinas) (HORUK *et al.*, 1993). Este receptor, conhecido desde os anos 50 como determinante no grupo sanguíneo, é expresso por eritrócitos e células endoteliais. Ele possui relação com os receptores CXC e CC, no entanto, as quimiocinas ligantes a ele não induzem o influxo de cálcio. Este receptor, o DARC, atua eliminando as quimiocinas da circulação sanguínea. O segundo tipo é o grupo de proteoglicanas heparan sulfato. Quimiocinas são

proteínas básicas que se ligam avidamente à moléculas carregadas negativamente, como heparina e heparan sulfato (ROT, 1992; LUSTER, 1995).

Os proteoglicanos heparan sulfato capturam as quimiocinas no meio extracelular e na superfície das células endoteliais, um processo que promove o equilíbrio gradiente iônico local nos pontos de secreção de quimiocinas (TANAKA *et al.*, 1993; LUSTER *et al.*, 1995).

Os receptores de quimiocinas foram primeiramente descritos nos leucócitos. Posteriormente eles também foram encontrados em células endodérmicas, mesenquimais, ectodérmicas e neuroectodérmicas. As quimiocinas também participam do crescimento e migração de células epiteliais, digestivas, do sistema reprodutor, das células neuronais e gliais do sistema nervoso central.

Análises da expressão de receptores de quimiocinas revelaram que os diversos subtipos de receptores estão expressos em diferentes estágios de maturação das células, direcionando sua resposta aos vários tipos de quimiocinas. Por exemplo, os neutrófilos expressam receptores CXCR1 e CXCR2 tornando-os responsivos aos ligantes CXC ELR+, enquanto que os eosinófilos são mais responsivos aos ligantes CCR3. A importância dessas análises reside no fato que, a expressão de receptores de quimiocinas está sujeita à regulação mediada pelas quimiocinas, a qual permite um controle eficiente das respostas celulares baseado na localização dos órgãos e também no estado imunológico dos hospedeiros (CHENSUE, 2001).

A expressão de receptores para quimiocinas nos linfócitos também é variável segundo o estágio de maturação. Os linfócitos TCD4+ virgens expressam receptores CCR7 e CXCR4, permitindo sua recirculação normal pelos órgãos linfóides. Após o encontro com os antígenos, as células diferenciar-se-ão em linfócitos T helper 1 e T helper 2, expressando a partir daí outros receptores complementares. Os primeiros expressam CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, enquanto os segundos expressam CCR2, CCR3, CCR4 e CCR8. A ativação posterior dos linfócitos de memória resulta na expressão do receptor CCR7 e CXCR5 a fim de facilitar o movimento celular para os órgãos linfóides secundários. Muitas dessas observações foram realizadas inclusive *in vitro* com a utilização de receptores transgênicos. Muito ainda deve ser explorado neste campo, para o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficientes (GONZALO *et al.*, 1996; SALLUSTO *et al.*, 1997).

O timo é o órgão crítico para o desenvolvimento dos linfócitos T. Este expressa transcritos para diversas quimiocinas que possuem propriedades quimiotáticas para os linfócitos, tais como: CCL25, CCL17, CCL21, CCL19 e SDF-1. O desenvolvimento dos

linfócitos no timo envolve diversas etapas desde o influxo de células pré-T imaturas do córtex à medula e depois à circulação sanguínea quando esses adquirem maturidade. As quimiocinas estão envolvidas nesse processo, assim como a expressão dos diversos receptores (LOETSCHER *et al.*, 1996).

Há muitos eventos migratórios que envolvem os linfonodos e o movimento de linfócitos, células dendríticas e também os macrófagos. As quimiocinas CCL21, CCL17 entre outras, também estão envolvidas na formação dos órgãos linfóides secundários, além da recirculação dos linfócitos (SALLUSTO *et al.*, 1997; CHENSUE, 2001).

As quimiocinas influenciam a atividade medular muito além de suas propriedades quimiotáticas. Várias quimiocinas CC e CXC demonstraram atividade mielossupressora, interferindo com a proliferação celular em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Um excelente exemplo é a quimiocina MIP-1 α , que causa uma inibição dose-dependente sobre as células progenitoras quando administrada em camundongos. Essas quimiocinas mielossupressoras têm um grande potencial para serem exploradas como agentes adjuvantes no tratamento quimioterapêutico das leucemias, protegendo as células precursoras residuais normais, por esse estado não-proliferativo (LODI *et al.*, 1994; GONG & CLARK-LEWIS, 1995; ALKHATIB *et al.*, 1996; GRIM & DOE, 1996; LAHRTZ *et al.*, 1997).

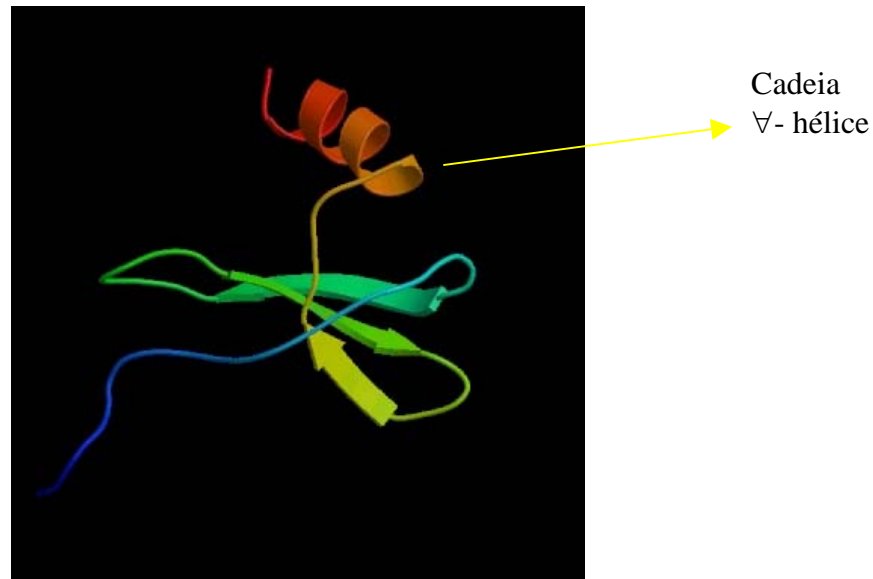
As quimiocinas também possuem uma íntima associação com os diversos tipos de citocinas, que por sua vez modulam a produção e liberação de quimiocinas em vários modelos de agressão celular. O fator de necrose tumoral (TNF- α), citocina produzida pelos macrófagos, é um importante indutor da síntese de quimiocinas nos mais diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos, fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliais e epiteliais (LEE *et al.*, 2002; VICARI & CAUX, 2002).

Quando uma superfície epitelial é invadida por microrganismos, as quimiocinas liberadas são oriundas das células danificadas e também dos macrófagos subepiteliais, os quais respondem inicialmente aos componentes dos microrganismos. Os macrófagos também produzem citocinas como o TNF- α e a IL-1, os quais podem ativar as células mesenquimais teciduais, como os miofibroblastos, contribuindo para a liberação de mais quimiocinas. As citocinas também ativam o endotélio localmente para expressar moléculas de adesão a fim de preparar o recrutamento de leucócitos. Após a iniciação, os leucócitos são recrutados do sangue. As células recrutadas como neutrófilos e células *natural killer* liberam uma dose adicional de citocinas e também de quimiocinas. Se o sistema inato

não for capaz de deter a infecção, as células T reativas produzirão mais citocinas que por sua vez promoverão uma amplificação local na produção de quimiocinas (CHENSUE, 2001).

As quimiocinas estão envolvidas no movimento dos leucócitos em desenvolvimento, na homeostasia e inflamação. O extravasamento de leucócitos do sangue para os tecidos, envolve uma série de interações coordenadas entre leucócitos e células endoteliais (BUTCHER,1991; SPRINGER,1994). Diversas famílias de moléculas regulatórias como integrinas, quimiocinas e selectinas controlam diferentes etapas deste processo. As selectinas facilitam o movimento dos leucócitos ao longo da superfície das células endoteliais (“rolling”). Acredita-se que as quimiocinas produzem sinais específicos que convertem as interações de baixa afinidade entre integrinas e selectinas, em interações de alta afinidade, o que resultaria no extravasamento dos leucócitos (KERST *et al.*, 1993; VICARI & CAUX, 2002).

As quimiocinas controlam homeostaticamente a circulação dos leucócitos pelos tecidos. A contínua recirculação de linfócitos pelo sangue, tecidos e vasos linfáticos ocorre de maneira organizada; trazendo linfócitos imaturos aos linfonodos a fim de que eles encontrem diferentes antígenos e se transformem em linfócitos de memória garantindo a nossa imunidade. Os macrófagos, eosinófilos e mastócitos também migram aos tecidos. Apesar destas células serem produzidas pela medula óssea, elas residirão em outros tecidos. O papel das quimiocinas na regulação do movimento celular para os tecidos começou a ser elucidado através do estudo em camundongos deficientes de alguma quimiocina em particular. Por exemplo, o fator celular derivado do estroma-I (SDF-1) (Figura1) é crítico para a migração de precursores mielóides do fígado fetal à medula óssea (NAGASAWA *et al.*, 1994; SHIROZU *et al.*, 1995; NAGASAWA *et al.*, 1996). A eotaxina é importante no recrutamento de eosinófilos aos tecidos. Uma elevação dramática na secreção de quimiocinas durante o processo inflamatório resultará no recrutamento seletivo de leucócitos ao tecido atingido (GARCIA-ZEPEDA *et al.*, 1996; LUSTER & ROTHENBERG,1997; MACLEAN e cols., 1996; ROTHENBERG *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1996).



Fonte: PPB (*PROTEIN DATA BANK/ site: www.rcsb.org*)

Figura 1 – Estrutura tridimensional da quimiocina SDF-1.

As quimiocinas podem também modular a angiogênese, o crescimento tumoral e inibir a proliferação das células tronco. O fator plaquetário-4 (PF-4) e o produto de interferon-10 (IP-10) inibem a neovascularização, o crescimento tumoral e a metástase (GOTTLIEB, 1988; SHARPE *et al.*, 1990; LUSTER *et al.*, 1993; LUSTER *et al.*, 1995; STRIETER *et al.*, 1995). Em contraste, a interleucina-8 promove a angiogênese e a metástase tumoral (KOCH *et al.*, 1992; STRIETER *et al.*, 1995). O mecanismo básico na inibição da angiogênese deve estar relacionado à habilidade que certas quimiocinas têm de deslocar outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblasto e o fator transformador de crescimento alfa, dos sítios de heparan sulfato nas células endoteliais. A habilidade de certas quimiocinas em inibir a proliferação de células tronco pode ter propriedades terapêuticas (GRAHAM *et al.*, 1990). O MIP-1 alfa e análogos com atividade anti-células tronco (mas sem atividade pró-inflamatória) estão sendo desenvolvidos como adjuvantes à quimioterapia para o câncer. Se essas quimiocinas apresentam a capacidade de impedir a replicação seletiva das células tronco, os indivíduos poderão tolerar melhor as doses de quimioterápicos.

Algumas quimiocinas têm um papel crítico no desenvolvimento fetal. Camundongos deficientes em SDF-1 morrem no período peri-natal, demonstrando defeitos na linfopoiese de células B e no recrutamento de progenitores do fígado fetal à medula óssea, e também defeito de septo ventricular. Esse fenótipo alterado, demonstra que as quimiocinas

realmente têm um papel importante na organização celular durante o desenvolvimento (HASEGAWA, 2001).

O receptor CXCR4 foi originalmente clonado por Loestcher e colaboradores como um receptor órfão, e sua denominação inicial foi LESTR. Encontrou-se a expressão deste receptor em neutrófilos, células mielóides e células T. LESTR foi posteriormente identificado como um cofator essencial à invasão celular pelos vírus HIV 1 e 2, na fusão mediada pela proteína *env* e as proteínas CD4+ (LOESTCHER *et al.*, 1994; BLEUL *et al.*, 1996 a; BLEUL *et al.*, 1996 b; LEGLER *et al.*, 1996; OBERLIN *et al.*, 1996; CHENSUE, 2001). Posteriormente a quimiocina SDF-1 foi reconhecida como o ligante natural para LESTR e este receptor foi então reclassificado como CXCR4.

A expressão do receptor CXCR4 em células T é superregulada pela interleucina 4, e subregulada após estímulo com CD28, CD3 e CD2. Camundongos *null* para o gene CXCR4 exibiram a linfopoiose e a mielopoiose prejudicados; e também defeitos na migração de neurônios cerebelares e formação de vasos sanguíneos do trato gastrointestinal (BLEUL *et al.*, 1997; MURDOCH & FINN, 2000).

O processo de desenvolvimento e tráfego de células hematopoiéticas inclui migração e adesão. O fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1) é uma quimiocina

C-X-C que atua como um quimioatraente para progenitores hematopoiéticos. GOTOH *et al.*, (1999), analisaram o efeito do SDF-1 sobre a adesão de células progenitoras para fibronectina e observaram que o SDF-1 não promove apenas quimiotaxia, mas também participa na modulação da adesividade das células progenitoras para componentes da matriz extracelular (GORDON, 1988; GOTOH *et al.*, 1997).

O crescimento do tumor primário, a invasão e a metástase para órgãos distantes são dependentes de uma verdadeira rede de eventos altamente regulados que incluem: transformação celular, ambiente pró-angiogênico, crescimento das células tumorais, invasão através da matriz extra-celular e das células endoteliais, entrada na circulação sanguínea e finalmente a metástase não randômica das células tumorais à órgãos distantes. Além do papel que as quimiocinas têm na regulação do tráfego dos leucócitos, tem-se demonstrado seu envolvimento em cada um dos eventos descritos acima, desde o crescimento tumoral primário até as metástases (ARVANITAKIS *et al.*, 1997; VICARI & CAUX, 2002).

Além da interferência no processo de metástase, as quimiocinas interferem no recrutamento de diferentes populações de leucócitos ao ambiente de desenvolvimento das células tumorais. Um exemplo típico é o recrutamento de macrófagos pelo gradiente de quimiocinas liberadas, e que proverão ao tumor uma fonte de fatores de crescimento e fatores

angiogênicos entre outros. Outras células envolvidas na resposta imune também são recrutadas pela presença das quimiocinas, como por exemplo, as células dendríticas e as células T. Esse recrutamento celular ativo deve representar um esforço imunológico para o combate às células tumorais, no entanto, dentro do meio tumoral existem fatores que promovem um desequilíbrio na resposta imune, como por exemplo a liberação de citocinas como a IL-10, o TGF beta e a PGE2 pelos macrófagos. Nesse contexto, observa-se ainda, a via de migração de células dendríticas aos órgãos linfóides secundários prejudicada, assim como a geração de linfócitos T citotóxicos. Ainda, o recrutamento ativo de células dendríticas imaturas para o meio tumoral pode favorecer a manutenção de resposta imune supressora pela indução de células T regulatórias (AUST *et al.*, 2001; VICARI & CAUX, 2002).

Verificou-se recentemente que, células tumorais como as células do tumor de mama podem ser guiadas através da corrente sanguínea até órgãos distantes que expressem quimiocinas como o SDF-1, pois estas células possuem receptores que possibilitam este evento. As células tumorais invadiriam estes órgãos e então formariam tumores secundários. Diante desse quadro, novas pesquisas apontam no sentido de evitar esses mecanismos, tentando por exemplo interferir na interação entre receptores celulares e quimiocinas (MULLER *et al.*, 2001; MURPHY, 2001).

As metástases derivadas do câncer de mama, caracterizadas no século XIX por Paget, têm um padrão distinto que envolve preferencialmente os linfonodos regionais, a medula óssea, os pulmões e o fígado. A expressão dos receptores CXCR4 e CCR7 é maior nos tumores malignos de mama que nos tecidos normais. Os ligantes para esses receptores, SDF-1 para CXCR4, e CCL21 para CCR7, possuem uma expressão aumentada nos órgãos em que as células malignas de mama metastizam.

Observou-se também que a sinalização dos receptores CXCR4 e CCR7 promovem a polimerização de actina, formação de pseudópodes e induzem a respostas quimiotáticas e de invasão.

A expressão seletiva de CXCR4 também foi observada em tumores humanos de ovário, nos quais as células tumorais metastizam preferencialmente para os linfonodos (HALL, 2003).

O sequenciamento da quimiocina SDF (CXCL12), (GenBank: L 36033), revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não codificadora (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito. Este polimorfismo, designado SDF-3'A está presente no SDF-1 \exists , mas não no transcrito SDF-1 \forall . Este alelo

variante pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de SDF. (WINKLER *et al.*, 1998).

Tem sido identificado uma proporção crescente de moléculas quimioatraentes capazes de permitir a migração *in vitro* de células linfóides malignas (LEGDEUR *et al.*, 1997; MOHLE *et al.*, 1998; BURGER *et al.*, 1999), como por exemplo na leucemia linfóide crônica, onde as células expressam CXCR4 e podem ser atraídas pelo gradiente da quimiocina SDF-1 (BURGER *et al.*, 1999; MOHLE *et al.*, 1999; NISHII *et al.*, 1999; BRADSTOCK *et al.*, 2000; MOHLE *et al.*, 2000). Em adição, o CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma, bem como em linhagens mielóides (BURGER & KIPPS, 2002).

Baseado nessas informações a hipótese levantada pelo presente trabalho, advém do fato que, se a mutação descrita produz um aumento na concentração da quimiocina SDF-1 (BALTER, 1998; BENBOUBKER *et al.*, 2001; GODDARD *et al.*, 2001; LAPIDOT, 2001; STEINERT *et al.*, 2001; SWEENEY & PAPAYANNOPOULOU, 2001; COLVIN & THOMSON, 2002; SCHROPPEL *et al.*, 2002), que implicações esse aumento teria nas leucemias linfóides e linfomas.

Com o objetivo de avaliar a importância da expressão do receptor CXCR4 no desenvolvimento das células leucêmicas, tráfego celular e tratamento clínico, foi realizado ensaios para a expressão de RNA mensageiro para CXCR4 em sangue periférico de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda, além da comparação com dados clínicos relevantes.

1.2 LEUCEMIAS

1.2.1 Leucemias Agudas

As neoplasias hematológicas são distúrbios clonais de células hematopoéticas, cujas alterações genéticas levaram à perda dos mecanismos normais controladores da proliferação, maturação celular, ou apoptose.

Este grande grupo de entidades é subdividido tradicionalmente em doenças mielóides e linfóides. Entre as neoplasias mielóides enquadram-se as leucemias agudas, as mieloproliferações crônicas (doenças mieloproliferativas) e as síndromes mielodisplásicas

(pré-leucemias). As neoplasias linfóides abrangem as linfoproliferações agudas, incluindo as leucemias linfóides agudas ou linfoblásticas e os linfomas de células precursoras, e as linfoproliferações crônicas, às quais pertencem as leucemias linfóides crônicas, o mieloma múltiplo e os linfomas de células maduras (YAWATA, 1998).

As leucemias agudas são, portanto, doenças clonais, cujo mecanismo leucemogênico leva a um aumento descontrolado na capacidade proliferativa e perda da capacidade maturativa de células precursoras na medula óssea. São caracterizadas pelo aumento de blastos na medula óssea e no sangue periférico.

Dependendo da linhagem a qual pertença o blasto, as leucemias agudas são subdividas classicamente em mielóides (aumento de blastos mielóides) ou linfóides (aumento dos blastos linfóides) (LEE *et al.*, 1998).

Com o advento da imunofenotipagem através da utilização de anticorpos monoclonais, passaram a ser incluídas dentre as leucemias agudas as leucemias bifenótípicas (aumento de blastos com expressão de antígenos mielóides e linfóides) e as leucemias indiferenciadas (aumento de blastos indiferenciados, caracterizados pela ausência de antígenos mielóides e linfóides em sua superfície).

Devido a necessidade imperativa de definir uma conduta terapêutica mais específica e o prognóstico do paciente, as leucemias foram ao longo dos anos agrupadas e sub-agrupadas. Assim surgiram cronologicamente várias classificações (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A primeira classificação mundialmente aceita e que se tornou linguagem comum entre os profissionais da hematologia foi proposta em 1976, por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos, a classificação FAB. Esta classificação tomou por base apenas critérios morfológicos e citoquímicos e definiu como leucemia aguda aquelas entidades patológicas que apresentavam acima de 30% de blastos na medula óssea. Ela inicialmente subdividiu as leucemias agudas em mielóides (M1 a M6) e linfoblásticas (L1, L2 e L3) (BENNETT *et al.*, 1976).

Em 1985, esta classificação foi revisada e expandida, passando a adotar critérios imunofenotípicos para o diagnóstico de uma entidade ainda não incluída em sua classificação original, o subtipo LMA M7, que foi definida como leucemia megacariocítica aguda, através da confirmação de blastos plaquetários por microscopia eletrônica ou pela presença de antígenos da linhagem plaquetária em sua superfície (BENNETT *et al.*, 1985 a; BENNETT *et al.*, 1985 b). Em 1991, a FAB, também através de critérios imunológicos, passou a definir o subtipo M0, denominada então como leucemia mielóide aguda

minimamente diferenciada, definida apenas através dos marcadores monoclonais, já que seus blastos não apresentavam caracteres morfológicos ou citoquímicos que os definissem como da linhagem mielóide (BENNETT *et al.*, 1991).

Na tentativa de suprir algumas deficiências da classificação FAB e de trazer maiores informações preditivas para o prognóstico e conduta terapêutica, é proposta em 1986 a classificação MIC (Morfológica, Imunológica e Citogenética) para as leucemias linfoblásticas agudas e em 1988 para as leucemias mielóides agudas. Esta classificação foi baseada em critérios morfológicos e imunológicos associados a dados citogenéticos. Ela definiu subtipos morfológico-imunológicos de leucemias com anormalidades cariotípicas específicas. Sem dúvida, esta classificação veio preencher a lacuna existente na classificação FAB que, com exceção dos subtipos LMA M3 e M3v, M4 variante eosinofílica, alguns casos de M2 e nas LLA L3, carece de boa correlação prognóstica e de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Em 1995, o Grupo Europeu de Estudos (EGIL- European Group of Immunological Characterization of Leukaemias), propõe a classificação imunológica para as leucemias agudas. Esta classificação baseia-se apenas em critérios imunológicos (expressão de antígenos na superfície celular) a partir de sofisticados painéis de anticorpos monoclonais. Além de trazer maior precisão e exatidão para o diagnóstico das leucemias mielóides agudas, principalmente nas M0, M6 e M7, ela passa a predizer o fenótipo B ou T para as LLA, o que, hoje em dia, é sabidamente bem mais importante que os critérios morfológicos L1 e L2 da FAB.

A classificação EGIL, além de subdividir as LLA B e T em seus vários estágios de diferenciação (BI, BII, BIII, BIV e TI, TII, TIII e TIV), também delimita critérios e sistemas de score, que definem as leucemias bifenotípicas agudas (BAL), e as diferenciam das entidades agudas com expressão anômala de antígenos de outra linhagem, as LMA com co-expressão de antígenos linfóides –LMA +Ly e as LLA com co-expressão de antígenos mielóides –LLA +My. Define também um grupo incomum de leucemias sem evidências de diferenciação mielóide ou linfóide que correspondem às leucemias agudas indiferenciadas (Tabela 1) (BENE *et al.*, 1995).

Tabela 1 – Classificação imunológica das leucemias linfóides agudas (EGIL)

<p>LLA linhagem B: (CD19 + e/ou CD79 a+ e/ou CD22+)* B-I: sem expressão de outros antígenos de diferenciação BII (B comum): CD10+ (CALLA +) B-III: IgM citoplasmática + B-IV: Kappa ou Lambda citoplasmática ou de membrana</p>
<p>LLA linhagem T: (CD3+ citoplasmático ou de membrana)** T-I: CD7+ T-II: CD2+ e/ou CD5+ e/ou CD8+ T-III: CD1 a+ T-IV: CD3+ membrana, CD1 a- LLA-T \forall/\exists +: TCR \forall/\exists + LLA-T (/ * +: TCR (/ * +</p> <p>LLA com expressão anômala de antígenos mielóides Sem critério de escore para bifenotípica</p>
<p>* <i>positivo para no mínimo dois dos três marcadores. Muitos casos são TdT+, HLA-DR+, exceto em B-IV que geralmente são TdT-</i> ** <i>muitos casos são TdT+, HLA-DR-, CD34-, porém esses marcadores não são considerados para efeito de diagnóstico ou classificação dessas neoplasias</i></p>

Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2002.

Em 1997, foi proposta por patologistas, oncologistas e hematologistas a classificação da Organização Mundial da Saúde para as doenças neoplásicas do tecido hematopoético e linfóide (Tabela 2), publicada então em 1999, a classificação OMS. Esta classificação separa e define os subtipos de leucemias agudas de acordo com a linhagem mielóide (onde inclui as bifenotípicas) ou linfóide, não levando em conta apenas um critério fixo como “Gold Standard” para definição de cada subtipo. Segundo a classificação WHO, o limite de blastos para caracterização de uma leucemia aguda passa a ser de 20%, em confronto com os antigos 30% propostos pela classificação FAB. Para a OMS, pacientes com > 20% de blastos na medula óssea não diferem na sobrevida em relação a pacientes com mais de 30% de blastos e teriam comportamento clínico similar (HARRIS *et al.*, 1999).

Tabela 2 – Proposta da WHO para classificação das leucemias linfóides agudas (LLA) e sua correlação com a FAB

Classificação WHO	Subtipo FAB
Leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras t(9;22) (q34;q11); BCR/ABL anormalidade 11q23 (rearranjo MLL) t (1;19) (q23;p13) E2A / PBX 1 t (12;21) (p12;q22) ETV/ CBF-alpha	L1 ou L2
Leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras	L1 ou L2
Leucemia de células de Burkitt	L3

Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2002.

1.2.2 Leucemia Linfóide Aguda

A teoria mais aceita para a fisiopatologia da LLA relaciona o seu desenvolvimento com a transformação de uma única célula progenitora hematopoiética mutante, capaz de proliferar indefinidamente por auto-renovação, levando a produção de precursores hematopoiéticos malignos e pouco diferenciados. Os eventos que levam a este processo de mutação são complexos e multifatoriais. Têm sido proposto que a LLA se desenvolveria como resultado da mutação que ocorreria em células linfóides de linhagem T ou B (GRAVES, 1986; SANDER & ROSS, 1997; MARGOLAIN & POPLACK, 1997; PUI & CRIST, 1999). GRAVES (1986) sugere que uma ou mais comumente duas mutações sequenciais ocorreriam em genes reguladores importantes na população celular linfóide sob estresse proliferativo, e com isso caracterizaria a alteração.

Para a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a definição de cada entidade patológica é baseada no seu aspecto de maior relevância prognóstica e de tratamento, seja ele citogenético, molecular, morfológico, imunofenotípico ou simplesmente clínico. As LMA, por exemplo, passaram a ser inicialmente valorizadas através de seus dados de recorrência citogenética e de história clínica ou aspectos displásicos na medula óssea. As LLA, por sua vez foram divididas em subtipos B e T que, por sua vez, foram subdivididos com base citogenético/molecular (para as antigas LLA FAB L1 e L2, que deveriam ser extintas) mas também valorizando a morfologia da célula de Burkitt (característica da LLA L3 da antiga FAB) (SAWYERS, 1997).

Se por um lado a classificação da OMS colhe informações a partir de tecnologia de ponta, como dados imunofenotípicos e de biologia molecular, ela também valoriza dados clínicos, morfológicos (medula displásica) e citogenéticos, obtidos a partir de um profissional qualificado. Enfim, busca de modo lúcido a valorização dos pontos positivos das demais classificações (HARRIS *et al.*, 1999).

A classificação da leucemia aguda aumenta de cerca de 70% até 99%, quando os critérios morfológicos são suplementados por informações citoquímicas e imunofenotípicas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Estudos das LLA têm confirmado que a transformação leucêmica pode ocorrer nos diversos estágios de maturação no processo de diferenciação linfóide. Anticorpos monoclonais podem detectar antígenos associados com diferentes fases de maturação e linhagens hematopoiéticas. Estes anticorpos são agrupados de acordo com a molécula ou antígeno que reconhecem sob um número de "cluster" de designação ou diferenciação (CD).

As LLA de linhagem T também são subclassificadas por anticorpos monoclonais capazes de detectar antígenos de superfícies presentes nos diferentes estágios de maturação e diferenciação dos linfócitos T, caracterizados pela expressão de seus *clusters* de diferenciação (PUI *et al.*, 1993; STASI *et al.*, 1995; MARGOLIN & POPLACK, 1997).

Apesar de muitos casos de LLA não apresentarem uma condição genética predisponente reconhecível, esta doença é considerada como tendo uma base genética, isto é, alterações genéticas somáticas adquiridas que modificam função de proteínas que contribuem para a patogênese da LLA e têm implicações importantes no diagnóstico e tratamento (THANDLA & APLAN, 1997; BIONDI *et al.*, 2000).

De acordo com THANDLA & APLAN (1997) as alterações genéticas associadas às neoplasias humanas, podem ser decorrentes de: (1) mutação de ponto, isto é, mudança de um único par de base, (2) amplificação gênica, com aumento da expressão de determinado gene, (3) deleções gênicas, resultando na perda de material genético da célula, (4) inativação funcional por hipermetilação, (5) translocação cromossômica ou (6) mutagênese por inserção viral, na qual um genoma viral ativa um gene do hospedeiro por inserção de um promotor ou intensificador.

1.2.3 Leucemia Indiferenciada Aguda (Aul)

Essa expressão refere-se às leucemias agudas que não apresentam as características morfológicas e imunológicas de ambas as linhagens, linfóide e mielóide. No passado, até 15% a 20% dos pacientes eram classificados como portadores de (AUL). Desde a introdução de anticorpos específicos para linhagens, o número relativo de pacientes com leucemias não classificadas decresceu substancialmente (HARRIS *et al.*, 1999).

Muitos blastos leucêmicos indiferenciados têm o rearranjo do gene para as imunoglobulinas característico dos precursores linfóides comprometidos com a diferenciação em linfócitos B. Em outros, podem ser demonstrados os rearranjos de um ou mais dos genes para TCR. A demonstração da expressão da mieloperoxidase com sondas moleculares por células que são citoquimicamente negativas para a mieloperoxidase sugere uma origem mielóide. Entretanto, alguns pacientes possuem células com as características fenotípicas de mais de um clone celular anormal (LEE *et al.*, 1998).

1.2.4 Leucemia Aguda Mista E Bifenotípica

Técnicas de dupla fluorescência permitiram a identificação de pelo menos três tipos de heterogeneidade das células leucêmicas: leucemia mista ou de bilinhagem, com duas populações distintas de blastócitos (mielóides e linfóides, ou linfóides T e B), uma população isolada de blastócitos com marcadores das linhagens mielóide e linfóide (expressão bifenotípica), e uma transformação de uma linhagem celular para outra, após o tratamento (YAWATA, 1998).

A expressão da mieloperoxidase, um marcador mielóide, foi demonstrada por meio de técnicas moleculares e por microscopia eletrônica em pacientes com LLA. Também são descritas algumas leucemias cujas células têm as características morfológicas e citoquímicas da LMA, mas expressam os antígenos de linfócito T CD2 ou CD5, ou o antígeno de linfócito B CD19. Analogamente, em até 12% a 23% dos pacientes com leucemia diagnosticada como LLA em seus aspectos morfológicos, ocorre a expressão de antígenos mielóides. O rearranjo do gene para cadeia pesada das imunoglobulinas, um ponto chave das células comprometidas com a diferenciação dos linfócitos B, foi detectado em pacientes com

LLA-T e nos com LMA. Entretanto, em todos esses pacientes o rearranjo do gene para a cadeia pesada é incompleto, e o padrão da linha germinativa dos genes para as cadeias leves é preservado. Rearranjos dos genes para TCR e do gene para a cadeia γ -pesada das imunoglobulinas foram demonstrados em alguns pacientes cujas células leucêmicas tinham um imunofenótipo de linfócito T. O rearranjo do gene para TCR foi também observado em casos de LMA e na LLA de pré-linfócitos B primitivos (LEE *et al.*, 1998).

Várias anormalidades cariotípicas recorrentes foram descritas em casos de leucemia de linhagem mista, como t(9;22), t(4;11) e outras translocações que envolvem translocações 11q23, t(9;11), t(11;19) e 14q32. Tanto a expressão mista quanto bifenotípica da leucemia aguda aparentemente conferem um prognóstico sombrio.

A base biológica para a leucemia bifenotípica é desconhecida. Em alguns pacientes, o transtorno pode originar-se de uma célula-tronco comum a ambas as linhagens, mielóide e linfóide, enquanto que em outros pode representar a expressão aberrante durante a transformação leucêmica dos genes codificadores para os marcadores da outra linhagem celular. Alguns autores sugeriram a existência de uma fase transitória de expressão gênica em progenitores multipotenciais normais, e que essa característica é preservada nas células leucêmicas que são bloqueadas na maturação. Células da leucemia bifenotípica que expressam TdT sofrem diferenciação tanto mielóide quanto linfóide, quando cultivadas com o ácido retinóico (LEE *et al.*, 1998; ABBAS *et al.*, 2000).

O significado dos desvios no fenótipo dos blastos por ocasião da recidiva é também conjectural. A substituição do fenótipo da célula leucêmica original por um cariótipo anormal inteiramente diferente sugere que alguns desvios resultam da indução de uma segunda neoplasia hematopoética. Uma possibilidade alternativa é a seleção de um clone independente, resistente à medicação, que é pequeno demais para que seja detectado na ocasião do diagnóstico (Tabela 3) (LEE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Sistema de Escore para a definição das leucemias bifenotípicas agudas (BAL)*^{EGIL}

Pontos	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem Mielóide
2	CD79 a cit IgM cit CD22	CD3 (CIT/ memb) TCR \forall/\exists TCR (/*)	MPO Lisosima
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD117

Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2002.

* BAL é definida quando o escore for > 2 pontos para a linhagem mielóide e uma das linhagens linfóides

1.3 LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação e acúmulo de linfócitos de aspecto relativamente maduro no sangue, medula óssea, linfonodos, baço, fígado e outros órgãos. Na maioria dos casos, um único clone de linfócitos B passa por transformação maligna, mas uma pequena percentagem dos casos envolve linfócitos T monoclonais. A leucemia linfocítica crônica é a forma mais comum de leucemia na América do Norte e Europa, sendo responsável por quase um terço de todos os casos, mas é extremamente rara no Oriente. Tipicamente a doença ocorre em pacientes com mais de 50 anos de idade, sendo incomum em indivíduos com menos de 30 anos de idade, embora tenham sido relatados casos em crianças. A doença afeta o homem com o dobro da frequência das mulheres (LEE *et al.*, 1998).

Em aproximadamente 50% dos pacientes, são detectadas anormalidades cromossômicas; a mais comum é a trissomia do 12, seja isoladamente ou em combinação com outras anormalidades citogenéticas. Outras anormalidades comuns são 14q+, 13q+ e 11q+. Em sua maioria, essas anormalidades envolvem translocações com cromossomos doadores desconhecidos. As translocações que envolvem o cromossomo 14 tipicamente exibem pontos de quebra na banda q32, o sítio do *locus* do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas. Nesse caso, o doador cromossômico foi identificado como o cromossomo 11 mais comumente, mas outros também foram relatados. Também foram identificadas deleções do

cromossomo 11, com pontos de quebra em 11q21, 11q22, e 11q14. São comuns as anormalidades estruturais do cromossomo 13, do mesmo modo que as deleções do cromossomo 6. As anormalidades cromossômicas identificadas em casos de LLC aparentemente permanecem constantes ao longo da doença. A cariotipagem deve ser incluída na avaliação diagnóstica inicial de pacientes com LLC, porque a complexidade das anormalidades correlaciona-se com a possibilidade da doença progressiva, e mesmo anormalidades simples indicam um prognóstico sombrio (BARRETINA *et al.*, 2003).

Em sua maioria, os estudos sugerem uma expressão normal de proto-oncogenes, mas raros casos de translocações cromossômicas forneceram informações úteis; uma translocação t(11:14)(q13;q32) ocorre na leucemia B pró-linfocítica e, mais raramente, na LLC. Foi detectada uma quebra na região J da cadeia pesada das imunoglobulinas, enquanto o rearranjo no cromossomo 11 envolvia um proto-oncogene putativo denominado *bcl-1*. Uma translocação t(14:18)(q32;q21) é observada comumente em linfomas foliculares e, raramente, na LLC. Este rearranjo justapõe o *locus* da cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossomo 14 a um proto-oncogene putativo denominado *bcl-2* no cromossomo 18. Mais comumente, *bcl-2* parece ser rearranjado sem a translocação t(14:18) e justaposto com os genes 8 e 6 das imunoglobulinas. A translocação t(14:19)(q32;q13.1) ocorre raramente em casos de LLC. A ruptura no cromossomo 14 ocorre dentro de uma das regiões de troca de classe dos éxons da região constante da cadeia pesada ∇ , enquanto que a ruptura no cromossomo 19 ocorre proximalmente a outro proto-oncogene putativo, *bcl-3*.

Assim, em todos os três exemplos dados, partes dos *loci* dos genes das cadeias leves ou pesadas das Igs que contêm elementos reguladores estão justapostos com proto-oncogenes putativos numa configuração “cabeça-a-cabeça” sem a interrupção da unidade de transcrição dos proto-oncogenes. Este arranjo aumentou a expressão de um produto genômico *bcl* aparentemente normal. A similaridade entre estes rearranjos e os subjacentes ao linfoma de Burkitt é notável. É amplamente defendido que esses genes causam leucemia, através da modificação da expressão outros genes celulares, inclusive outros oncogenes. As anormalidades cariotípicas comuns são a trissomia do 12, 14q+ e t(11;14)(q13;q32). Ao nível molecular, o oncogene *bcl-1* foi detectado em células de LLC e localizado no ponto de ruptura da translocação t(11;14)(LEE *et al.*, 1998).

Fatores genéticos foram postulados, como tendo um papel, devido à incidência notavelmente elevada de LLC em algumas famílias. Foi demonstrada uma incidência familiar de até 8,8% em alguns estudos. Também foi relatada a concordância em diversos pares de gêmeos idênticos, mas, em um relato, os rearranjos dos genes das

imunoglobulinas em gêmeos idênticos com LLC eram diferentes, sugerindo um evento pós-zigótico como a causa imediata da doença. Entretanto, o padrão de herança não é nítido, e aparentemente a consangüinidade não desempenha qualquer papel. Quando mais de um membro de determinada família têm LLC ou uma doença linfoproliferativa relacionada, foi demonstrado que alguns indivíduos aparentemente saudáveis apresentavam deficiências de imunoglobulinas e outras anormalidades da função imune, enquanto que outros demonstravam manifestações de auto-imunidade, inclusive colagenoses (BURGER & KIPPS, 2002).

A forma de evolução mais agressiva é a leucemia pró-linfocítica e descreve-se anemia hemolítica auto-imune em cerca de 5 a 10% dos pacientes (LEE *et al.*, 1998).

1.4 LINFOMAS

O linfoma de Hodgkin é dividido em quatro subtipos pela modificação de RYE (1966) da classificação original de LUKES e BUTLER a qual, vem sendo largamente utilizada em muitos países (YAWATA, 1998).

Em contraste, quatro classificações foram desenvolvidas para os linfomas não-Hodgkin. A classificação inicial de RAPPAPORT (1956) foi modificada pela incorporação da imunocitogenética. Com esta abordagem combinada, as classificações de LUKES-COLLINS (1974) e KIEL (1975) foram publicadas. Nestas classificações o padrão de crescimento não foi utilizado como parâmetro, e a principal importância coube principalmente às distinções citogenéticas. A “Working Formulation” (WF:1982), realizada por um grupo de estudo clínico patológico multi-institucional é estreitamente relacionada à classificação de RAPPAPORT, mas muitas das características utilizadas na classificação de LUKES-COLLINS também foram incorporadas. A classificação de WF tem sido criticada por excluir considerações imunofenotípicas, e parece ser inadequada para classificar e discriminar entre os subtipos recentemente reconhecidos, especialmente os linfomas de células T. O problema com a classificação da WF é mais evidente no Japão, onde a maioria dos linfomas têm sua origem em células T, incluindo a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), linfoma de célula T linfadenopatia imunoblástica (LIB)- “like”, e linfoma de zona T. Por esta razão, a classificação (1979) do Grupo de Estudo de Leucemia e Linfoma

(LSG) tem sido largamente utilizada no Japão, refletindo o grupo étnico. Felizmente, as classificações WF e LSG são intercambiáveis em sua maior parte.

Estudos de antígenos específicos com expressão nas células tumorais se tornaram essenciais para o diagnóstico de alguns tipos de linfomas não-Hodgkin, tais como linfoma Ki-1 positivo. Além disso, os assim chamados linfomas T periféricos, tais como ATL e linfoma de célula T LIB- “like” têm se tornado importantes porque estas doenças não são bem abrangidas pela WF (YAWATA, 1998).

1.4.1 Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin é uma doença maligna linfóide que se origina nos linfonodos. Histologicamente esta doença é caracterizada pela presença das células de Hodgkin e células de Reed-Sternberg e pela ausência de linfócitos neoplásicos (OHSHIMA *et al.*, 2002).

Para se estabelecer o diagnóstico de células de Reed-Sternberg (RS) as mesmas devem apresentar dois ou mais lobos nucleares e nucléolos proeminentes, tipo inclusão. Células RS clássicas mostram um núcleo simétrico com imagem em espelho. Os nucléolos das células RS têm uma densidade relativamente uniforme e aparecem de eosinofílicos para anfofílicos na coloração por hematoxilina-eosina (HE). A cromatina nuclear é condensada na membrana nuclear, resultando tipicamente em um halo claro em volta do nucléolo (KUPPERS, 2002).

A doença de Hodgkin é dividida em quatro subtipos de acordo com a modificação de RYE (1966) da classificação original de LUKES e BUTLER: (1) predominância linfocitária- PL; (2) celularidade mista- CM; (3) esclerose nodular- EN; (4) com depleção linfocitária- DL.

No tipo PL, os linfonodos são bastantes infiltrado por linfócitos B maduros e relativamente menos células RS são observadas. O subtipo CM demonstra um infiltrado linfocitário polimórfico, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e numerosas células RS (mais de 5 a 15 por campo em grande aumento). No subtipo EM, infiltrados de células tumorais estão circundados por feixes de colágeno. As células RS parecem encapsuladas por tecidos colagenosos, e retraem seu citoplasma por desidratação e fixação, resultando numa aparência lacunar ou de “céu estrelado”. O subtipo DL, mostra depleção de elementos celulares

normais, especialmente linfócitos, além de necrose e fibrose em graus variados (YAWATA, 1998).

A prevalência de doença de Hodgkin, e seus subtipos tais como EN, é muito menor no Japão do que nos países ocidentais. No Japão, a doença de Hodgkin responde por apenas 10% de todos os casos de linfomas, enquanto que entre outros países, a frequência é maior que 40% (OHSHIMA *et al.*, 2003).

O linfoma de Hodgkin (LH) foi caracterizada pela primeira vez por Thomas Hodgkin em 1832. Esse linfoma pode ocorrer em pessoas de qualquer idade; entretanto, é mais comumente observado em adultos jovens sendo mais comum em homens do que em mulheres. A doença tem sido cuidadosamente estudada, amplamente relatada, e é um exemplo proeminente do sucesso alcançado pela investigação clínica no controle do câncer. Sua importância é enfatizada pelos seguintes aspectos: (1) a cura deve ser o objetivo do tratamento inicial em todos os pacientes, sendo possível em mais de 80% dos indivíduos afetados; (2) esse linfoma ilustra a importância de um cuidadoso estagiamento e avaliação dos aspectos prognósticos, observações que ainda determinam a seleção do tratamento; (3) exemplos de tratamento por terapia combinada frequentemente utilizam a doença de Hodgkin como base; (4) o potencial curativo pela quimioterapia combinada foi demonstrada pela primeira vez nessa enfermidade (LEE *et al.*, 1998).

A doença de Hodgkin pode ser diferenciada de outros linfomas pela presença de grandes células binucleadas com núcleos vesiculares e nucléolos eosinofílicos proeminentes. Essas células, denominadas células de Reed-Sternberg, estão espalhadas irregularmente ao longo de todos os infiltrados de Hodgkin. Embora as células de Reed-Sternberg também possam ser observadas ocasionalmente em linfomas não-Hodgkin e lesões inflamatórias dos linfonodos, estas células permanecem sendo o marcador histológico mais confiável da doença de Hodgkin (TERUYA *et al.*, 2000).

As citocinas produzidas no linfoma de Hodgkin devem explicar a presença e a manutenção de uma resposta imunológica prejudicada. As quimiocinas produzidas pelas células de Reed-Sternberg têm um papel importante no tráfego leucocitário. Essas moléculas contribuem para o influxo de células T helper 2, em detrimento do subtipo T helper 1, suprimindo a resposta imunológica e mantendo um meio favorável à sobrevivência das células tumorais. As células RS expressam também várias moléculas da família de TNF e seus receptores, tais: FAS ligante (CD95L) que pode promover a apoptose em células que expressam o FAS, como os linfócitos T CD8+ e as células *natural killer*.

Várias citocinas e quimiocinas envolvidas, como IL-13, IL-17, IL-10, TGF- β , IL-5, TARC, MDC, IP-10, RANTES, MIG entre outras promovem o desenvolvimento de um meio ambiente onde as células tumorais são capazes de proliferar, escapar da apoptose e sobreviver à resposta anti-tumoral do hospedeiro. A intervenção nesse *cross-talking* de citocinas/quimiocinas e células pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias na terapia do Linfoma de Hodgkin (POPPEMA *et al.*, 1998; POPPEMA & VAN DER BERG, 2000; MAGGIO *et al.*, 2002; OHSHIMA *et al.*, 2002).

A nível celular, o tumor é morfológicamente complexo, havendo linfócitos não malignos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e as características células tumorais de Hodgkin e Reed-Sternberg. Linhagens celulares bem sucedidas *in vitro* foram estabelecidas a partir de vários pacientes. Estas linhagens celulares derivadas da doença de Hodgkin expressam tanto antígenos associados a linfócito T, quanto a linfócitos B. Estas células demonstram a expressão de CD15, CD25 e o antígeno CD30 de ativação associado à doença de Hodgkin. Ocorre a expressão adicional dos antígenos 2A do complexo de histocompatibilidade principal, o receptor de transferrina CD71, e uma série de antígenos de linfócitos T e B (LEE *et al.*, 1998).

O antígeno CD30 foi identificado por anticorpos produzidos a partir da imunização de indivíduos com a linhagem celular L-428, derivada da doença de Hodgkin. Este antígeno é expresso em linfócitos ativados ou transformados (HTLV-1, EBV) bem como em macrófagos e o linfoma Ki-1, sendo útil ao diagnóstico (YAWATA, 1998; KLEINHANS, 2003).

A análise citogenética tem sido difícil, devido à variedade de tipos celulares e à dificuldade de obtenção de mitoses reprodutíveis. Entre as anormalidades mais comumente identificadas, foi observada a aneuploidia com cromossomos triplicados: 1, 2, 5, 12 e 21. Foram detectados rearranjos com translocações e/ou deleções, frequentemente envolvendo os cromossomos 1,2, 11 e 14 (LEE *et al.*, 1998).

Estudos moleculares das linhagens celulares derivadas da doença de Hodgkin demonstram evidência do rearranjo do gene das imunoglobulinas do linfócito B e também do gene para os receptores do linfócito T. O DNA viral proveniente do EBV foi detectado em 20% dos casos de doença de Hodgkin, e está associado mais frequentemente com a doença de Hodgkin relacionada à AIDS (COFFIN *et al.*, 1986; CHOE *et al.*, 1996).

Estudos avaliando a presença de proto-oncogenes no LH revelam um padrão variável. Proto-oncogenes, inclusive *c-myc*, *c-myb*, *n-ras* e outros, foram observados em linhagens celulares derivadas da doença. Foi especulado que a variação e não

reprodutibilidade dos padrões de proto-oncogenes represente variações associadas a diferentes estágios de maturação celular por ocasião da transformação maligna (LEE *et al.*, 1998).

A ativação constitutiva do fator de transcrição *NF kappa B*, pode ser, por exemplo, induzida pela ação viral do EBV sobre as células de Reed Sternberg ou mutações somáticas destrutivas sobre o inibidor de *NF kappa B*, parecem estar envolvidos na patogênese do Linfoma de Hodgkin (KUPPERS, 2002).

A suposição de que as células de Hodgkin e Reed Sternberg representam as células malignas nesta doença têm ampla concordância. Os dados aparentemente indicam que estas células são derivadas de células linfóides imaturas em vários estágios de diferenciação antes ou durante o rearranjo dos genes para receptores de linfócitos B e T. Essas células, então, interagem com as funções imunes locais e sistêmicas, resultando no infiltrado polimórfico da doença de Hodgkin (JORDAN *et al.*, 1998).

Os fatores seguintes foram bem documentados, como sendo prognosticamente significativos por ocasião do diagnóstico: (1) estágio clínico da doença- quanto menos abrangente a doença, melhor o prognóstico; (2) tipo histológico- o predomínio linfocitário e a esclerose nodular implicam num prognóstico mais favorável que a celularidade mista, que por sua vez, é um padrão mais favorável que a depleção linfocitária; (3) concentração de células tumorais e ação (carga) tumoral; (4) sintomas sistêmicos- pacientes com sintomas como a febre, sudorese noturna e perda de peso têm um prognóstico pior que os sem estes sintomas; (5) idade- pacientes com mais de 40 anos têm um prognóstico pior que os pacientes mais jovens. Todos estes fatores parecem estar inter-relacionados em parte, mas alguns são claramente variáveis prognósticas independentes (MAGGIO *et al.*, 2002).

1.4.2 Linfomas Não-Hodgkin

O linfoma serve como um modelo para compreender o câncer como uma doença genética. Agentes ambientais e anormalidades genéticas herdadas podem participar na produção das alterações cromossômicas irreversíveis que são subjacentes ao LNH. Admite-se que mutações cromossômicas tais como translocações, deleções ou substituições de pares de bases levam ao LNH através da transformação ou perda de genes críticos que regulam o crescimento e a diferenciação (proto-oncogenes e genes supressores de tumor).

A complexa inter-relação entre os fatores ambientais e os do hospedeiro na patogênese do LNH é mais bem ilustrada no linfoma de Burkitt. Em 1958, Dennis Burkitt descreveu um tumor agressivo de crianças jovens que era caracterizado por freqüente comprometimento das maxilas e abdome. Burkitt, usando cuidadosos levantamentos epidemiológicos, identificou um cinturão de linfoma através da África equatorial que era associado com a temperatura, a precipitação pluviométrica e a elevação.

Subseqüentemente, foi demonstrado que esta distribuição geográfica correlacionava-se com a da malária endêmica. Em 1961, estudos de patologia por O'Connor sugeriram que o tumor era um linfoma; observação confirmada mais tarde pela demonstração de imunoglobulina monotípica nas células tumorais por Klein (LEE *et al.*, 1998).

Em 1964, Epstein, Barr e Achong encontraram partículas virais em linhagens de células derivadas de paciente de Burkitt. Um papel causal direto do vírus foi subseqüentemente desmentido, pela sua infreqüência no linfoma de Burkitt ocorrendo fora da África; no entanto, foi demonstrado que o vírus de Epstein-Barr (EBV) era trófico para as células B e era o agente etiológico da mononucleose infecciosa (BALTIMORE, 1995).

A identificação de uma anormalidade citogenética de 14q+ no linfoma de Burkitt por Manolova e Manolova em 1972 levou à descrição da translocação cromossômica 8;14 por ZECH em 1976. Estudos subseqüentes de genética molecular mostraram que essa translocação justapunha o oncogene *myc* no cromossomo 8 às seqüências reguladoras para as cadeias pesadas de imunoglobulinas no cromossomo 14. Estas observações sugerem que a translocação 8;14 do LNH endêmico de Burkitt origina-se em um estado de proliferação policlonal de células B induzida pelo EBV no contexto da imunodeficiência associada com a malária crônica. O apoio para esta teoria foi derivado do papel do EBV na linfoproliferação em outras condições de imunodeficiência.

Estudos citogenéticos de neoplasias linfóides identificaram translocações não aleatórias que tendem a afetar os *loci* cromossomais dos genes para Ig e RCT e que muitas vezes associam-se com oncogenes. Anormalidades citogenéticas provavelmente estão presentes em associação com todo LNH, e podem ser identificadas em 80 a 90% dos espécimes com as técnicas atuais. As correlações histológicas e clínicas com a citogenética são limitadas, mas em estudos preliminares os investigadores estão identificando uma associação entre o prognóstico e a citogenética (LEVY, 1993).

As duas anormalidades cromossomais mais freqüentemente reconhecidas no LNH nos hemisfério ocidental e suas constatações histológicas associadas são t(8;14)(q24;q32) em linfomas de células B pequenas não clivadas e t(14;18)(q32;21) em

linfomas de células B foliculares. Mais de 70% dos pacientes com LNH de células B têm uma anormalidade estrutural que compromete 14q32, o *locus* do gene para a cadeia pesada de Ig. Anormalidades adicionais no LNH de células B são a trissomia 12, muitas vezes vista em linfoma de pequenos linfócitos, e t(11;14)(q13;32) em linfomas de linfócitos intermediários (FON & TODD, 1986).

A aquisição de novas anormalidades genéticas pode correlacionar-se com transformação histológica; por exemplo, trissomia 7 e del (6q) foram encontradas comumente no LNH, com t(14;18) sofrendo progressão do baixo grau para o grau intermediário de tipo histológico (GALLO *et al.*, 1984).

A maioria dos linfomas de Burkitt envolvem a translocação do proto-oncogene *c-myc* no cromossomo 8; alguns têm translocações variantes que envolvem o cromossomo 8 com *loci* genéticos para cadeia leve no cromossomo 2 ou 22. O oncogene *c-myc* desempenha papel integrante na proliferação celular e pode fornecer uma vantagem de crescimento aos neoplasmas que abrigam a translocação t(8;14), em comparação com as células normais. O linfoma de Burkitt esporádico usualmente subentende um rearranjo do gene *c-myc*, enquanto na forma endêmica o gene usualmente permanece intacto, embora muitas vezes com mutações pontuais. Outras formas histológicas de linfomas, especialmente linfoma difuso de grandes células, ocasionalmente envolvem t(8;14)(q24;q32) (FON & TODD, 1986).

A t(14;18)(q32;q21) é encontrada em 80 a 90% dos linfomas de pequenas células clivadas foliculares e 20 a 30% dos linfomas difusos de grandes células. A t(14;18) justapõe o gene *bcl-2* (de leucemia e linfoma de células B-2) de 18q21 ao gene de cadeia pesada Ig em 14q32. Estudos adicionais indicaram que *bcl-2* codifica uma proteína de 25 quilodáltons (kd) que fica localizada na membrana mitocondrial interna e é capaz de prolongar a sobrevivência celular bloqueando a apoptose. Enquanto as técnicas Southern blot exigem 1 a 10% de células neoplásicas em uma amostra para detectar rearranjos, a reação em cadeia de polimerase pode ser usada para detectar células com uma translocação específica como t(14;18) com menos de 10^{-5} células malignas (FON & TODD, 1986; NANKI & LIPSKY, 2000).

Outra região, *bcl-1*, envolve t(11;14)(q13;q32), que foi identificada em um pequeno número de linfomas de células B pequenas e grandes e que é comumente identificada em linfomas derivados de células do manto folicular, o linfoma de linfócitos intermediários na literatura americana e o linfoma centrocítico na literatura européia.

Embora as neoplasias de células T não tenham sido estudados tão intensamente quanto as neoplasias de células B, translocações não aleatórias semelhantes envolvendo loci de genes para RCT foram identificadas. As primeiras dessas anormalidades foram de pacientes com leucemias linfocíticas agudas e crônicas de células T e envolveram uma translocação dos cromossomos 8 e 14, $t(8;14)(q24;q11)$ e uma inversão subsequente do cromossomo 14, $inv(14)(q11;32)$. Subseqüentemente, anormalidades em 14q11-14 que contém os *loci* para ambos os RCT \forall e *, foram identificados em uma variedade de neoplasias de células T, incluindo linfoma linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (LLA-T), leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e leucemia linfocítica crônica de células T (LLC-T). Similarmente, anormalidades em 7q35 e 7p15, os loci dos genes para os RCT beta e gama, respectivamente, foram identificados em várias neoplasias de células T; no entanto, anormalidades de 1p, cromossomo 6 e trissomia 3 foram identificadas no LNH de células T e não são localizações conhecidas para o RCT. A anormalidade cromossômica em muitos linfomas anaplásicos de grandes células (LAGG) Ki-1+, que são predominantemente de imunofenótipo T, é $t(2;5)(p23;q35)$. Os genes localizados nos pontos de ruptura nas faixas 2p23 e 5q35 são desconhecidos, mas provavelmente desempenham um papel na patogênese do LAGC Ki-1+ (FON & TODD, 1986; YAWATA, 1998).

Embora oncogenes específicos raramente tenham sido identificados nas neoplasias de células T, as seqüências específicas de DNA envolvidas em translocações receberam nomes, como *tcl 1*. Ocasionalmente, um linfoma de células T envolveu o oncogene *myc* em conjunção com o gene RCT * em uma $t(8;14)(q24;q11)$, mais uma vez indicando a importância do gene *myc* na patogênese das neoplasias linfóides. Cinco oncogenes putativos foram associados com malignidades de células T em localizações específicas: *tcl 1* em 14q32, *tcl 2* em 11p13, *tcl 3* em 10q24, *tcl 4* em 2q34, e *tcl 5* em 1p32. Dois genes recentemente identificados, LYL1 e SCL (leucemia de células primordiais, *stem cell leukemia*), o último dos quais é *tcl 5*, estão envolvidos em translocações citogenéticas de neoplasias de células T, e são proteínas ligadoras de DNA com uma estrutura de hélice-alça-hélice semelhante ao gene *c-myc*.

A freqüência de várias neoplasias linfóides é dependente da idade, tem distribuição mundial variável, e é mais comum em homens do que em mulheres, com proporções variando entre 1,5 e 3,5 :1. Embora os linfomas representem aproximadamente 10% de todos os cânceres da infância nos países desenvolvidos, e sejam o terceiro em freqüência relativa atrás das leucemias agudas e tumores cerebrais, eles são mais comuns em

adultos e têm firme aumento em incidência desde a infância até a idade de 80 anos (YAWATA, 1998).

Os vírus linfotrópicos EBV e HTLV-1 possuem papel patogênico predominantemente em neoplasias linfóides de células B e T, respectivamente. Sua descoberta seguiu-se à descrição das características clínicas das duas neoplasias linfóides, a descrição por Burkitt em 1958 do linfoma que leva seu epônimo e o reconhecimento, por Uchiyama e Takatsuki em 1977 da ATL. Seis anos decorreram antes do isolamento do EBV no linfoma de Burkitt por Epstein, Achong e Barr, e 4 anos passaram antes do reconhecimento do HTLV-1 por GALLO e colaboradores nos Estados Unidos e HINUMA e cols. no Japão. Estes vírus foram bem estudados e continuam a fornecer informação a respeito da linfomogênese (BARRE-SINOUSI *et al.*, 1983; GALLO *et al.*, 1984; DENG *et al.*, 1996; DETTIN *et al.*, 2002).

Tal como outros vírus de herpes, o EBV envolve dois tipos de interação com as células hospedeiras: (1) uma infecção produtiva citolítica caracterizada por um alto número de cópias do genoma EBV em um duplex linear e a liberação de partículas virais; e (2) uma infecção não produtiva latente caracterizada por um baixo número de genoma viral circular episomial. O primeiro está envolvido na mononucleose infecciosa e o último na linfoproliferação em hospedeiros imunocomprometidos. O vírus de Epstein Barr é um γ -herpesvírus de DNA de 172 kd; o genoma inteiro foi seqüenciado. Seis antígenos nucleares determinados pelo EBV (EBNA), dois tipos de antígenos iniciais (EA) e uma proteína latente de membrana (LMP) são expressos em linfócitos B proliferando *in vitro* em resposta à infecção EBV. Em linfócitos B humanos, EBNA-2 induz a expressão de CD23, um antígeno de ativação das células B, e LMP causa uma expressão aumentada de moléculas de adesão do linfócito B; ambos são expressos nas doenças linfoproliferativas de células B após transplante (HILL, 1999).

No linfoma de Burkitt, no entanto, EBNA-2 e LMP estão regulados para baixo. Teoricamente, há um *continuum* de linfoproliferação do EBV, i.e., regulação para cima de EBNA-2 e LMP inicialmente, seguida por regulação para baixo uma vez que o oncogene *c-myc* seja ativado e a monoclonalidade esteja estabelecida.

O vírus de leucemia de células T humana (ATL), o HTLV-1, é um retrovírus tipo C que contém RNA que infecta uma célula T madura, usualmente CD3+ e CD4+. Após a entrada do vírion na célula T, genomas do RNA viral são usados por transcriptases reversas para formar um progenoma viral de DNA. O genoma viral contém as regiões genômicas estruturais *gag* (antígenos do cerne viral), *pol* (polimerase ou transcriptase

reversa) e *env* (padrão do envoltório de superfície) e é flanqueado em cada extremidade por longas seqüências repetidas terminais (LTR) que contêm elementos de controle transcricional. Os genes *tax* (transativador) e *rex* (regulador da expressão) do HTLV-1 controlam a expressão genética viral, seja regulando diretamente a transcrição do RNA, ou aumentando pós-transcricionalmente a proporção de mRNA não encaixado codificando *tax* e *rex*. O produto de *tax* do HTLV-1 aumenta a expressão de receptor à interleucina 2 (IL-2) e a produção de IL-2, o que leva ao crescimento desregulado da célula. Inicialmente, a linfoproliferação T é policlonal e controlada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, com infecção assintomática durante muitos anos; no entanto, eventos não identificados finalmente conduzem a uma expansão oligoclonal ou monoclonal de células T e às manifestações clínicas da ATL. A infecção pelo HTLV-1 induz a produção de anticorpos para várias proteínas do cerne viral, mais notavelmente p24 e p19, os quais podem ser usados como marcadores sorológicos na infecção (LEE *et al.*, 1998).

A utilização de anticorpos monoclonais anti-CXCR4 em células de LNH, *in vitro*, demonstrou ainda outros efeitos, como: aumento da apoptose, diminuição da proliferação celular e inibição da formação de pseudópodes. Portanto, a utilização de antagonistas do receptor CXCR4 também representa uma perspectiva em novas terapias que combatam este tipo de câncer (BERTOLINI, *et al.*, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a presença de polimorfismo genético da quimiocina SDF-1 humana e a expressão do RNA mensageiro do seu receptor CXCR4 em pacientes com leucemia e linfoma.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Analisar o polimorfismo da quimiocina SDF-1 em pacientes com: Leucemias Linfóide agudas e crônicas e Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin.
- b) Avaliar a expressão de RNA mensageiro para o receptor de quimiocina CXCR4 em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

As amostras de sangue de pacientes comprovadamente diagnosticados para as seguintes doenças: Leucemia linfóide (aguda e crônica); Linfoma de Hodgkin e Linfoma não Hodgkin foram colhidas com a aprovação do comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina e, autorização do termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes são provenientes do Hospital de Câncer de Londrina e seus diagnósticos seguiram os protocolos utilizados pelo hospital, baseando-se em colorações citológicas, métodos histológicos, imuno-histoquímica e imunofenotipagem.

3.2 AMOSTRA BIOLÓGICA

Foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante, e com anticoagulante EDTA (10g/dL). Realizou-se punção venosa (veia cefálica ou basílica) ou arterial (radial, braquial), utilizando-se agulhas 25 x 7 mm e/ou 25 x 8 mm e seringas descartáveis.

Esse estudo envolveu 62 pacientes diagnosticados com Linfoma, sendo 18 pacientes diagnosticados com de Linfoma de Hodgkin e 44 pacientes com Linfoma não Hodgkin. Foram colhidas também, amostras de sangue de 42 pacientes diagnosticados com Leucemias Linfóides; sendo 31 diagnosticados com Leucemia Linfóide aguda e 11 diagnosticados com Leucemia Linfóide Crônica.

3.3 MÉTODOS CITOQUÍMICOS

3.3.1 Coloração de Pas

O procedimento técnico para o PAS (Técnica de Mc Manus, 1946 modificada), (HAYHOE & FLEMANS, 1995) é descrito a seguir: Primeiramente preparou-se as soluções a serem utilizadas. O reativo de Schiff é composto por 1,0 g de Fucsina (MERCK), 200 mL de água deionizada, 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado - 35 a 39% (MERCK), 2,0 g de Bissulfito de Potássio- $K_2S_2O_5$ (MERCK). Aqueceu-se os 200 mL de água deionizada até ebulição, e simultaneamente adicionou-se a Fucsina. Após dissolução da Fucsina, resfriou-se à 50°C. Adicionou-se 1,0 mL de HCL concentrado, agitou-se, e logo após acrescentou-se o $K_2S_2O_5$. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz por 24 horas. Depois desse prazo de 24 horas, foi adicionado à solução 0,5 g de carvão ativado. Procedeu-se a filtração, obtendo-se um filtrado incolor e transparente.

Preparou-se também as soluções de ácido periódico (MERCK) à 1%, verde de malaquita (MERCK) à 0,1% e solução sulfurosa no momento da utilização. Para o preparo da solução sulfurosa utilizou-se: 200 mL de água deionizada, 1g de $K_2S_2O_5$ e 10mL de HCL 1N.

Após o preparo da solução das soluções supracitadas realizou-se a coloração. Os esfregaços sangüíneos de medula foram submetidos à fixação com formol a 35% durante 10 minutos e depois lavados com álcool 70% por 30 segundos. Cobriu-se os esfregaços durante 10 minutos com a solução de ácido periódico à 1%. As lâminas foram lavadas com água destilada. Após a secagem do material cobriu-se os esfregaços com solução de Schiff por 50 minutos, em seguida colocou-se o material imerso em solução sulfurosa. Foram dados 3 banhos de 2 minutos cada e os esfregaços foram lavados em água destilada por 1 minuto. Contracorou-se as lâminas com verde de malaquita 0,1% durante 2 minutos. O material foi lavado com água destilada e seco, estando pronto para análise.

3.3.2 Coloração de Peroxidase

O procedimento técnico para a coloração de Peroxidase (Técnica de Graham-Knoll modificada), (HAYHOE & FLEMANS, 1995), é descrito a seguir: Fixou-se os esfregaços em 9 partes de etanol absoluto p.a. (MERCK) e 1 parte de formol 35%. As lâminas foram cobertas com esta solução por 30 segundos. O material foi lavado com água deionizada e seco. Para o preparo da solução de peroxidase utilizou-se 250 :L de ortotoluidina (MERCK) dissolvido em 6 mL de etanol p.a (MERCK). Adicionou-se 4 ml de água destilada e 20 :L de peróxido de hidrogênio. O material foi coberto com esta solução por 7 minutos e 30 segundos (cronometrados). As lâminas foram lavadas com água destilada e contracoradas pelo método de MayGrünwald Giemsa.

3.4 COLORAÇÃO DE MAYGRÜN WALD GIEMSA

Para realizar a contracoloração da técnica de Peroxidase utilizou-se a coloração de MayGrünwald Giemsa, o qual é composto de dois corantes separados, o corante de MayGrünwald e o corante de Giemsa. O corante de MayGrünwald é composto pela eosina azul de metileno e o corante de Giemsa pela eosina azur azul de metileno. O azur de metileno é derivado do azul de metileno. O MayGrünwald é um corante que tem afinidade por citoplasma, corando tanto estruturas básicas como ácidas. O Giemsa promove a coloração tanto do citoplasma como do núcleo, mas sua melhor propriedade é a coloração de estruturas ácidas e básicas da cromatina. O procedimento realizado é descrito a seguir: Cobriu-se as lâminas com o MayGrünwald por 4 minutos, em seguida, adicionou-se sobre os esfregaços água destilada tamponada (pH 6,8 a 7,2) por 1 minuto. O corante de Giemsa foi preparado para uso, na proporção de uma gota do corante para cada 1 mL de água. Após o tempo de um minuto, desprezou-se a solução MayGrünwald e cobriu-se o material com corante de Giemsa por 15 minutos. Após este tempo as lâminas foram lavadas em água corrente de modo abundante.

3.5 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA EOSINA

Para a realização da coloração de Hematoxilina e Eosina foram preparadas diversas soluções. Para o preparo de Hematoxilina de Harris, utilizou-se 100 mL de álcool 95% e 10g de hematoxilina (MERCK), 2 litros de água destilada, 200 g de sulfato de alumínio amoniacal (SIGMA) e 5g de óxido amarelo de mercúrio (SYNTH).

Após a obtenção das biópsias, o material foi colocado no aparelho AUTOTECHNICON, marca OMA, o qual realizou diferentes processos químicos, através de um sistema de rodízio, desde a fixação do material a ser analisado com formol 10% até a inclusão com parafina líquida, a fim de preparar os materiais para o corte ao micrótomo.

As lâminas foram colocadas em água amoniacal e mais três lavagens com água corrente foram realizadas. O material foi submetido ao álcool 95% e depois submerso em eosina por 2 minutos. Passado o tempo correspondente, o material passou por mais uma bateria de álcool para retirar o excesso de eosina e então adicionado xilol para a remoção do álcool das lâminas. Com o auxílio de uma pinça foram colocadas lamínulas sobre os cortes histológicos juntamente com resina que fez a aderência da lamínula à lâmina.

3.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA QUIMIOCINA SDF-1

3.6.1 Obtenção do Dna

O DNA genômico foi isolado dos leucócitos do sangue periférico (PBMC). De cada indivíduo foi colhido cerca de 4 mL de sangue com anticoagulante (EDTA) e mantidos a 4°C até o momento do processamento.

A técnica utilizada para a extração do DNA origina uma molécula de alto peso molecular e consiste basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (MILLER *et al.*, 1988) com algumas modificações.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm, por 15 min. Aspirou-se o plasma deixando uma camada remanescente acima das células brancas.

Homogeneizou-se o sangue, transferindo-o para os tubos Falcon de 15 mL. Adicionou-se solução de lise de hemácias (solução A: 0,32 M de sacarose; 10 mM de tris-HCL; 5 mM de MgCL₂ e 1% de Triton X-100) para um volume final de 15 mL. As amostras foram mantidas no gelo por 30 min. Foi realizada a centrifugação a 2500 rpm e temperatura ambiente por 15 min. Separou-se o sobrenadante que foi descartado. Adicionou-se ao *pellet* a solução de lise de hemácias, completando o volume para 15 mL, mantendo-se amostras no gelo por 30 min. Novamente centrifugou-se a 2500 rpm, à temperatura ambiente por 15 min. Aspirou-se totalmente o sobrenadante, eliminando o excesso das paredes do tubo com papel absorvente. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1,5 mL da solução de lise de leucócitos (solução B: 10 mM de Tris- HCL, pH- 7,5; 5 mM de NaCL; 2 mM de EDTA, pH 8,0). Adicionou-se 0,05 mL de SDS (dodecil sulfato de sódio), colocando-se as amostras em banho maria a 37°C durante 3 horas. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de NaCl 6M sob agitação vigorosa. Foi realizada a centrifugação à 2500 rpm e temperatura ambiente por 15 min.

O sobrenadante foi separado, adicionou-se proporcionalmente 2 volumes de etanol 100% a 4°C, para precipitar o DNA. Removeu-se o DNA usando uma pipeta *Pasteur*. O DNA foi seco em temperatura ambiente, ressuspendido em H₂O mili-Q e quantificado em espectrofotometria a 260 nm. A concentração de DNA foi ajustada para 0,1 :g/:L, e o DNA foi armazenado à – 20°C.

3.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Pcr) Para Sdf-1

Os *primers* para SDF utilizados para a amplificação do DNA foram sintetizados de acordo com a seqüência GenBank L36033, e foram direcionados para amplificar a extremidade 3'(3'UTR) do genoma: *primer* SDF (3'UTR-F) sense- seqüência 5' CAGTCAACCTGGGCAAAGCC 3'- e *primer* SDF (3'UTR-R2) antisense- seqüência 5' CCTGAGAGTCCTTTTGCGGG 3'.

```

721 cccatggtca gcctagggg ggagagccac caagagggac gcttgggggt gccaggacca
781 gtcaacctgg gcaaagccta gtgaaggctt ctctgttg gatgggatgg tggagggcca
841 catgggagc tcacccctt ctcatccac atgggagccg ggtctgcctc ttctgggagg
901 gcagcagggc taccctgagc tgaggcagca gtgtgaggcc agggcagagt gagaccagc
961 cctcatcccg agcacctcca catctccac gttctgctca tcattctctg tctcatcat
1021 catcatgtgt gtccacgact gtctcatgg cccgcaaaa ggactctcag gaccaaagct

```

O DNA genômico à concentração de 100 ng DNA foi analisado por PCR, utilizando-se o termociclador *PCR Sprint ThermoHybaid* da *Biosystems*.

A condição da reação de amplificação foi realizada de acordo com o quadro a seguir:

SOLUÇÕES	VOLUME
10 x PCR Buffer (1,5 mM) *	2,5 :L
MgCL ₂ (50mM) *	0,75 :L
DNTP (1,25 mM) **	2,0 :L
Primer 1 SDF 1 – sense (2,5 mM) *	1,5 :L
Primer 2 SDF 2- antisense (2,5 mM) *	1,5 :L
H ₂ O milli Q	11,75 :L
Taq polymerase (1,25 U/ reação) *	2,5 :L
DNA sample (0,1 :g/:L)	2,5 :L
TOTAL	25,0 :L

* INVITROGEN *life technologies*- Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA.

Os ciclos no termociclador “PCR Sprint- Thermoybaid” consistiram de temperatura inicial de desnaturação, 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94°C, para desnaturação, um minuto a 60°C, temperatura de *annealing*, e um minuto a 72°C para extensão das fitas, com extensão final de 10 minutos a 72°C, demonstrado abaixo:

TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
94°C	5 min	1
94°C	1 min	35
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
10°C	FOREVER	

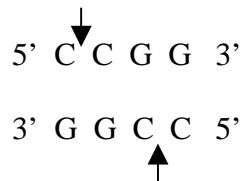
O produto do PCR de 293 pares de bases foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% (4 g de agarose e 200 mL de TAE) e visualizado por fluorescência UV em presença de brometo de etídio. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo.

3.6.3 Tratamento do Produto de Pcr com A Enzima de Restrição *Msp* I

O produto do PCR foi submetido ao tratamento enzimático em presença da enzima de restrição *Msp* I (Gibco, BRL, Maryland, USA) durante 3 horas a 37°C em banho maria, como descrito no esquema abaixo:

REAGENTES	VOLUME
NE Buffer 1x	9,5 :L
<i>Msp</i> I	0,5 :L
Produto de PCR	10,0 :L
TOTAL	20,0 :L

Esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:



Nos pacientes em que a mutação está presente ocorre a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 801, contada a partir do códon de iniciação (WINKLER, e cols., 1998), eliminando desta forma o sítio de restrição da enzima *Msp* I.

Os resultados foram então analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta; compreendendo um produto de 100 e 193 pares de bases no caso de um alelo SDF-1 *wild-type* e um produto com 293 pares de bases no caso de um alelo SDF1-3'A, caracterizando-se dessa forma os três possíveis resultados: 3'A/3'A, wt/wt e 3'A/wt.

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNAM DO RECEPTOR CXCR4

3.7.1 Obtenção de Leucócitos para Rna

Foram coletados 8 ml de sangue total com anticoagulante (EDTA) de pacientes com Leucemia Linfoblástica. A amostra de sangue foi centrifugada a 2.500 rpm por 15min. A camada de leucócitos da interfase foi coletada. As hemácias foram lisadas em solução de lise A (solução A: 0,32 M de sacarose; 10 mM de tris-HCL pH-7,5; 5 mM de MgCL₂ 1% de Triton X-100) para volume final de 15mL. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm a temperatura ambiente, por 15 min. O sobrenadante foi descartado.

O RNA foi extraído a partir do sedimento de leucócitos utilizando-se reagente TRIzol-LS (*Invitrogen*, U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.2 Síntese do DNA Complementar (Dnac)

A reação de transcriptase reversa foi realizada com 8µl de RNA e com 50 pmoles de *primer* oligo dT seguindo as condições do *GeneAmp RNA PCR* (*Perkin Elmer Part number* N808-0017), para um ciclo de 45°C durante 30 minutos e 93°C durante 2 minutos. Todas as reações de síntese de DNac e PCR foram realizadas em termociclador (*Thermocycler - PCR Sprint ThermoHybaid* da *Biosystems*).

3.7.3 Condições da Reação em Cadeia da Polimerase - β Actina

Os *primers* utilizados para a amplificação foram obtidos de acordo com o *GenBank* (*Accession number: BC01486*), *primer sense*: 5' GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC 3' e *antisense* 5' CT GGG TCA TCT TCT C 3'.

GenBank ACCESSION: BC01486 - RNAm

61 gccgccagct caccatggat gatgatatcg ccg**cgctcgt cgtcgacaac ggctc**ggca
 121 tgtgcaaggc cggcttcgcg ggcgacgatg cccccgggc cgtctcccc tccatcgtgg
 181 ggcgccccag gcaccagggc gtgatggtgg gcatgggtca gaaggattcc tatgtgggcg
 241 acgaggcca gagcaagaga ggcacacctca ccctgaagta cccatcgag cacggcatcg
 301 tcaccaactg ggacgacatg gagaaaatct ggcaccacac cttctacaat gagctgctg
 361 tggctcccga ggagcaccac gtgctgctga ccgaggcccc cctgaacccc aaggccaacc
 421 gc**gagaagat gaccag**atc atgtttgaga cttcaacac cccagccatg tacgttgcta

GenBank ACCESSION: M10277 - DNA

1021 cggcgcgccg gaagtggcca gggcgggggc gacttcggct cacagcgcgc cggctattc
 1081 tcgagctca ccatggatga tgatatgcc gc**cgctcgtc tgcacaacgg ctcc**ggcatg
 1141 tgcaaggccg gcttcgaggc cgacgatgcc ccccgggccg tctccccctc catcgtggg
 1201 cgccccaggc accaggtagg ggagctggct ggggtgggca gccccgggag cgggaggag
 1261 gcaagggcgc tttctctgca caggagcctc ccggtttccg ggggtgggctg cgcccgtgt
 1321 cagggttct tgcctttcc ttcccagggc gtgatggtgg gcatgggtca gaaggattcc
 1381 tatgtgggcg acgaggcca gagcaagaga ggcacacctca ccctgaagta cccatcgag
 1441 cacggcatcg tcaccaactg ggacgacatg gagaaaatct ggcaccacac cttctacaat
 1501 gagctgctg tggctcccga ggagcaccac gtgctgctga ccgaggcccc cctgaacccc
 1561 aaggccaacc gc**gagaagat gaccag**gtg agtggccgc tacctcttct ggtggccgc
 1621 tcctcctc ctggcctccc ggagctgccc ctttctcac tggttctc tctgcccgtt

Realizou-se a reação de PCR no termociclador *PCR (Sprint Hybaid)* utilizando-se: 20 mM de Tris HCL pH 8.4, 50 mM de KCL, 1,5 mM de MgCL₂, 200 µM de dNTP e 1.25 unidades de *Taq polimerase*. Inicialmente a desnaturação foi constituída por um ciclo de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto respectivamente a 94°C por 1 minuto, a 55°C por 30 segundos e a 72°C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O fragmento amplificado de β actina possui 353 pares de bases, e foi analisado por eletroforese em gel de acrilamida a 9% e visualizado por coloração de prata.

3.7.4 Condições da Reação em Cadeia da Polimerase- Cxcr4

Os *primers* utilizados para a amplificação de uma região do gene do receptor do CXCR4 foram: CXCR4m1 *sense* 5' TCT ACT CCA TCA TCT TCT TTA 3' e CXCR4 m2 *antisense* 5' ACG TTG GCA AAG ATG AAG GTC 3', acessados no *GenBank* com a numeração AF025375, indicado abaixo:

1 atggagggga tcagtatata cacttcagat aactacaccg aggaaatggg ctgaggggac
 61 tatgactcca tgaaggaacc ctgtttccgt gaagaaaatg ctaatttcaa taaaatcttc
 121 ctgcccacca **tctactccat catcttctta** actggcattg tgggcaatgg attggtcatc
 181 ctggtcatgg gttaccagaa gaaactgaga agcatgacgg acaagtacag gctgcacctg
 241 tcagtggccg acctcctctt tgcctacacg cttcccttct gggcagttga tgccgtggca
 301 aactggfact ttgggaactt cctatgcaag gcagtccatg tcatctacac agtcaacctc
 361 tacagcagtg tcctcatcct ggccttcacg agtctggacc gctacctggc catcgccac
 421 gccaccaaca gtcagaggcc aaggaagctg ttggctgaaa aggtgggtcta tggggcgtc
 481 tggatccctg ccctctgct gactattccc **gacttcatct ttgccaacgt** cagtgaggca

Realizou-se a reação de PCR no termociclador *PCR (Sprint Hybaid)* nas seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 1 ciclo de 51°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e finalmente 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto obtido do PCR em um volume de 10 :L foi misturado com 3µl de *buffer* (total volume, 13µl) e 0,02% de xileno cianol. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 10% por 1,5 h a 100 V. Após a eletroforese, a banda equivalente a 400 pb foi detectada com uma técnica de visualização consistindo em um método de fixação por prata. (OTO *et al.*, 1993).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes ($p < 0,05$) pelo programa MICROCAL ORIGIN. Os dados moleculares foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDADE E SEXO

Os dados referentes à distribuição de idade e sexo entre as neoplasias estudadas está representada na Tabela 4, demonstrando compatibilidade quando comparados com dados obtidos da literatura (LEE *et al.*, 1998). Os perfis etários das doenças são diferentes; a LLA têm um pico nos primeiros anos e a LLC na idade avançada. Entretanto, a superposição é de tal ordem que a idade não é um critério imprescindível em qualquer paciente considerado.

Dos 31 pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda, 20 pertencem ao sexo masculino e 11 ao sexo feminino. Referente ainda a essa população, 8 pacientes situam-se na faixa etária de 6 a 10 anos, 12 na faixa de 11 a 20 anos, 3 na faixa de 21 a 30 anos e 8 pacientes acima de 30 anos. Em relação aos pacientes portadores de Leucemia Linfóide Crônica, 8 pacientes pertencem ao sexo masculino e 3 ao sexo feminino, sendo que, 1 paciente situa-se na faixa etária entre 11 e 20 anos e os demais na faixa superior a 30 anos.

Entre os 44 pacientes portadores de Linfoma não Hodgkin, 23 pertencem ao sexo masculino e 21 ao sexo feminino. Dentre esses, 1 paciente situa-se na faixa etária que vai de 6 a 10 anos, 4 na faixa de 11 a 20 anos, 5 pacientes na faixa de 21 a 30 anos e 34 pacientes na faixa superior a 30 anos.

Já nos pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin (18), 13 pertencem ao sexo masculino e 5 ao sexo feminino. Situados na faixa de 6 a 10 anos e 11 a 20 anos, temos 2 pacientes respectivamente, e na faixa de 21 e 30 anos e superior a 30 anos temos 7 pacientes, respectivamente em cada faixa.

Tabela 4 – Distribuição de idade e sexo entre as neoplasias estudadas

DOENÇAS		LLA n = 31	LLC n = 11	LNH n = 44	LH n = 18
Idade (anos)	6 – 10	8	0	1	2
	11 – 20	12	1	4	2
	21 – 30	3	0	5	7
	> 30	8	10	34	7
Sexo	p <0,05				
	Masculino	20	8	23	13
	Feminino	11	3	21	5

4.2 LEUCEMIAS LINFÓIDES

Os pacientes atendidos no Hospital do Câncer de Londrina, após anamnese, e indicação clínica, são submetidos à punção de medula óssea. Após a punção de medula que pode ser realizada na região da crista ilíaca, ou osso esterno, são confeccionados entre 5 a 10 esfregaços sangüíneos que são submetidos a colorações de MayGrünwald Giemsa. O diagnóstico apresentado foi realizado, mediante a porcentagem de blastos na medula óssea do paciente, o aspecto morfológico das células da medula óssea e por fim, o resultado da coloração por citoquímica. Eventualmente, algumas amostras foram submetidas à técnica de Imunofenotipagem. A Figura 2 mostra o aspecto da medula óssea de um paciente envolvido neste estudo, com leucemia linfóide aguda, apresentando 24,0% de blastos compatíveis com LLA. A porcentagem de blastos foi indicativa para a realização dos testes citoquímicos, além das evidências clínicas apresentadas pelo paciente.

A Figura 3 evidencia o aspecto morfológico típico de uma leucemia linfóide. O paciente apresentou uma contagem de 91,6% de linfoblastos compatível com LLA-L3 ou linfoma de Burkitt com infiltração medular.

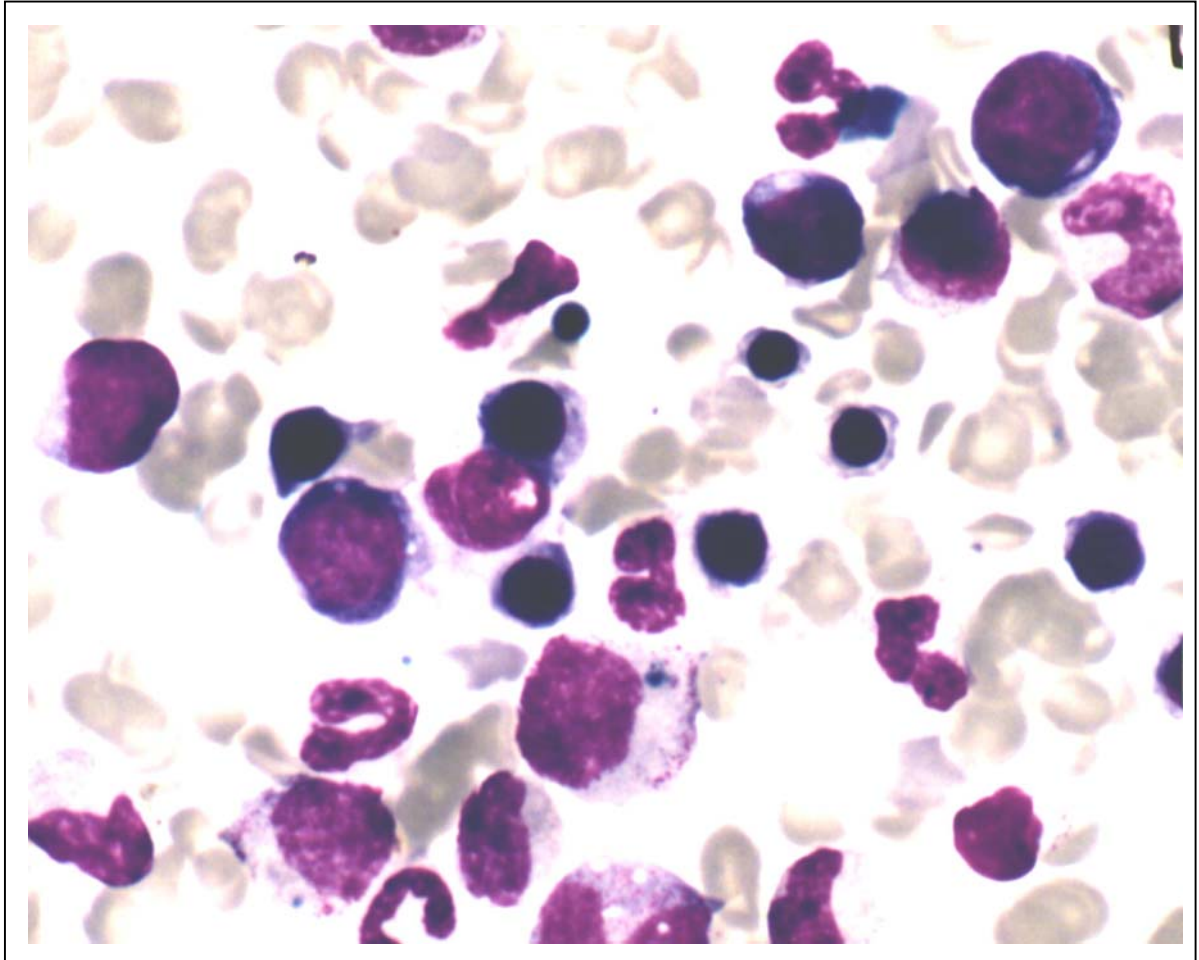


Figura 2 – Leucemia Linfóide Aguda. Medula óssea hipercelular apresentando 24,0% de blastos.

Esfregaço em lâmina, de sangue de medula óssea de paciente com LLA.

Coloração: MayGrünwald Giemsa. Aumento: 200 x.

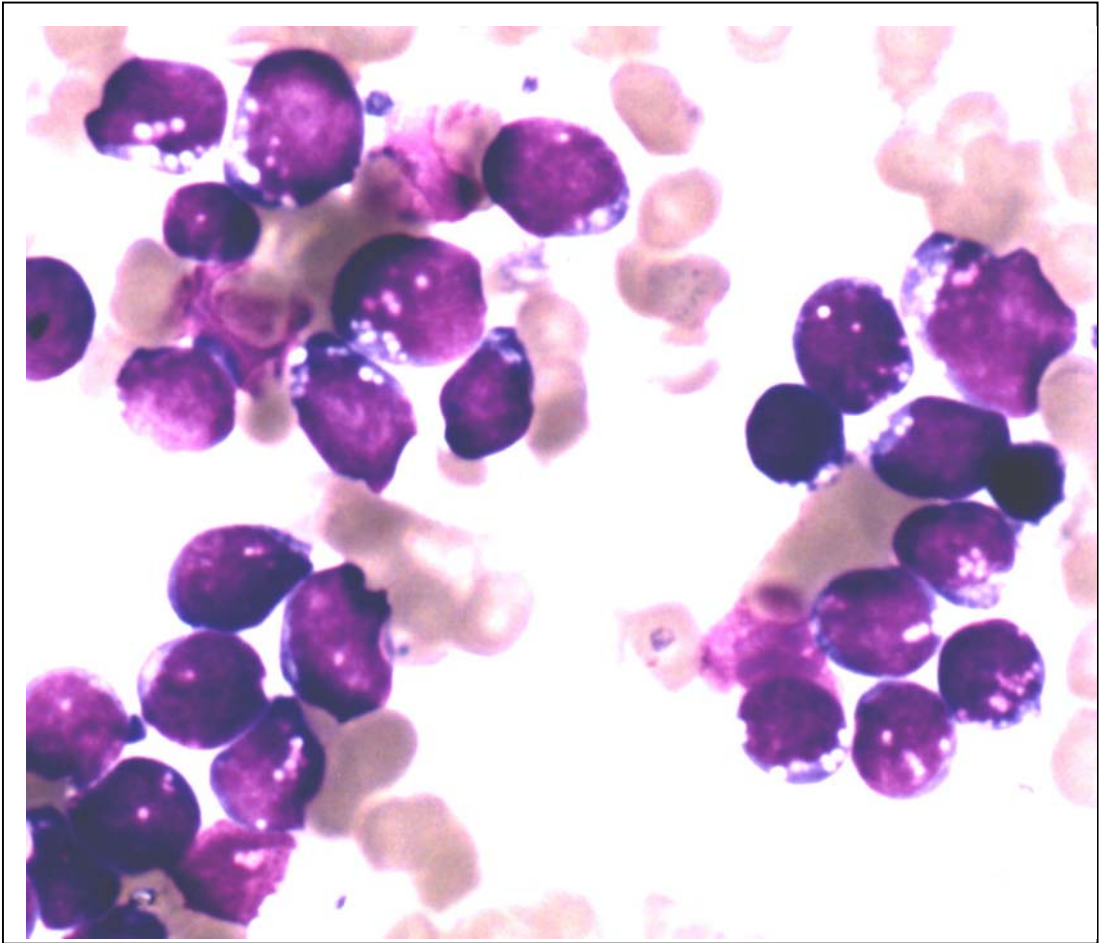


Figura 3 – Leucemia Linfóide Aguda subtipo L3. Medula óssea hipercelular com 91,6% de linfoblastos tipo L3, compatível com LLA-L3 ou linfoma de Burkitt com infiltração medular. Esfregaço sangüíneo de medula óssea de paciente LLA-L3. Coloração: MayGrünwald Giemsa. Aumento: 200 x.

Independente da apresentação clínica do paciente, e da morfologia celular a nível de medula, após analisada com a coloração de MayGrünwald Giemsa, as lâminas de esfregaço sangüíneo foram submetidas a dois testes citoquímicos: PAS e Peroxidase.

Corantes citoquímicos são úteis na diferenciação entre LLAs e LMAs. O ácido periódico de Schiff (PAS), a peroxidase ou o SUDAN BLACK B e os corantes de esterases são usados na avaliação diagnóstica inicial. Na LMA sem maturação (M0), a célula predominante não é diferenciada pela microscopia óptica e pelas reações citoquímicas. A linhagem mielóide é estabelecida pela demonstração por microscopia eletrônica, de grânulos positivos para a peroxidase ou pela detecção de pelo menos, um antígeno mielóide específico para a linhagem. A diferenciação linfóide deverá ser excluída pela imunofenotipagem.

A reação de mieloperoxidase é fortemente positiva em células da série granulocítica e fracamente positiva em monócitos. A mieloperoxidase, a enzima detectada pelo corante, localiza-se nos grânulos azurofílicos das células nas séries neutrofílica e monocítica e nos grânulos específicos dos eosinófilos. A reação também pode ser positiva em mieloblastos indiferenciados não possuidores de grânulos azurofílicos (M1). Linfócitos e precursores eritróides são negativos para a peroxidase.

O corante PAS reage principalmente com o glicogênio celular. Os linfoblastos da LLA freqüentemente demonstram uma evidente coloração pelo PAS na forma de anéis concêntricos de grânulos grosseiros ou “blocos maciços”. A Figura 4 mostra a reação positiva para a coloração de PAS em esfregaço medular do paciente inicialmente analisado (Figura 2) em 61% dos linfoblastos.

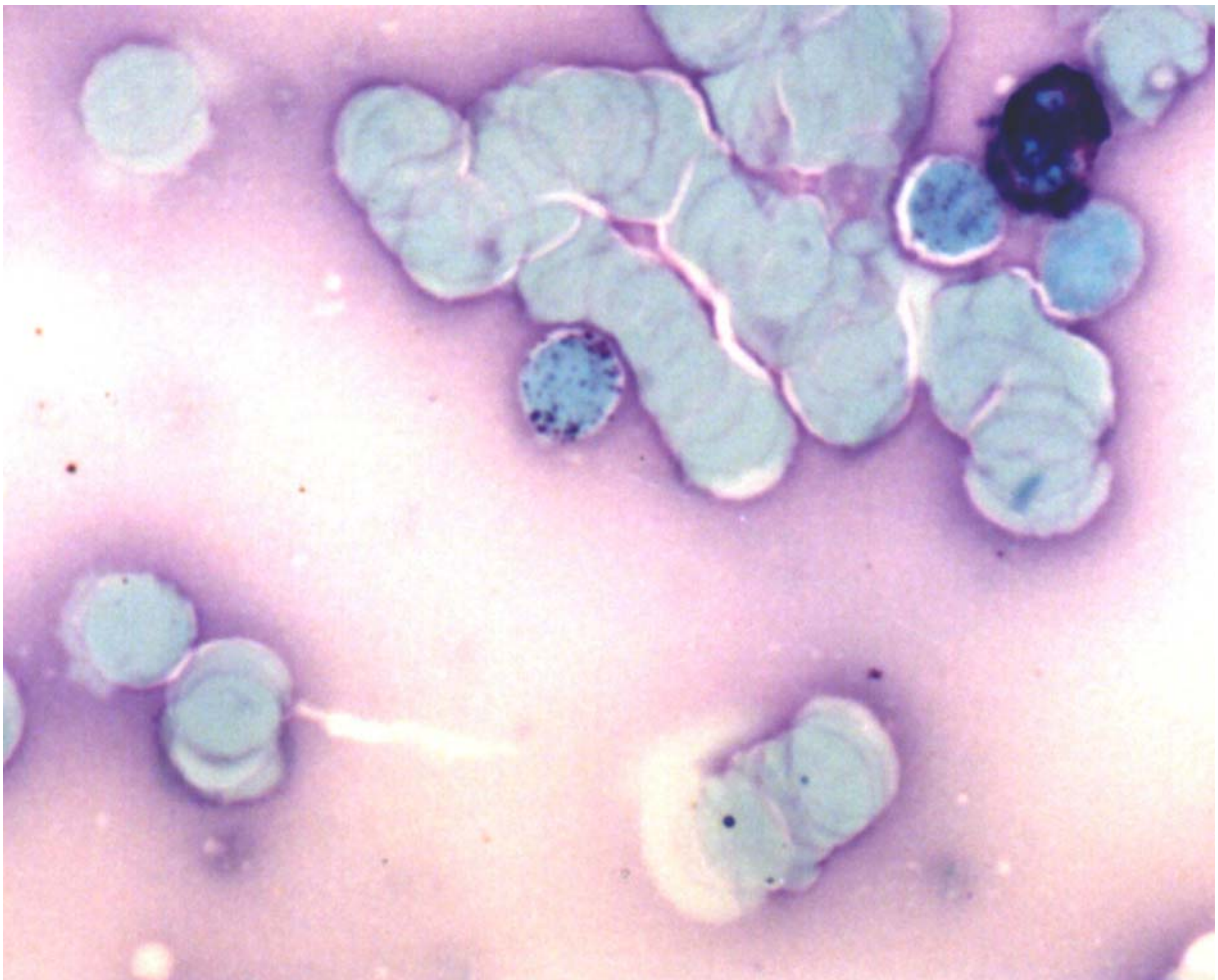


Figura 4 – Método citoquímico de PAS. Medula óssea apresentando 61% de positividade para a coloração de PAS. Esfregaço de sangue de medula óssea de paciente com LLA apresentando 24,0 % de blastos . Aumento: 200 x.

A demonstração da atividade da mieloperoxidase em no mínimo 3% de blastos que sejam inequivocamente leucêmicos estabelece um diagnóstico de LMA, sendo portanto, um teste diferencial entre as Leucemias Linfóides Agudas e as Leucemias Mielóides Agudas. A figura 5 demonstra a positividade da peroxidase em 91,0% das células blásticas de um paciente acometido com LMA.

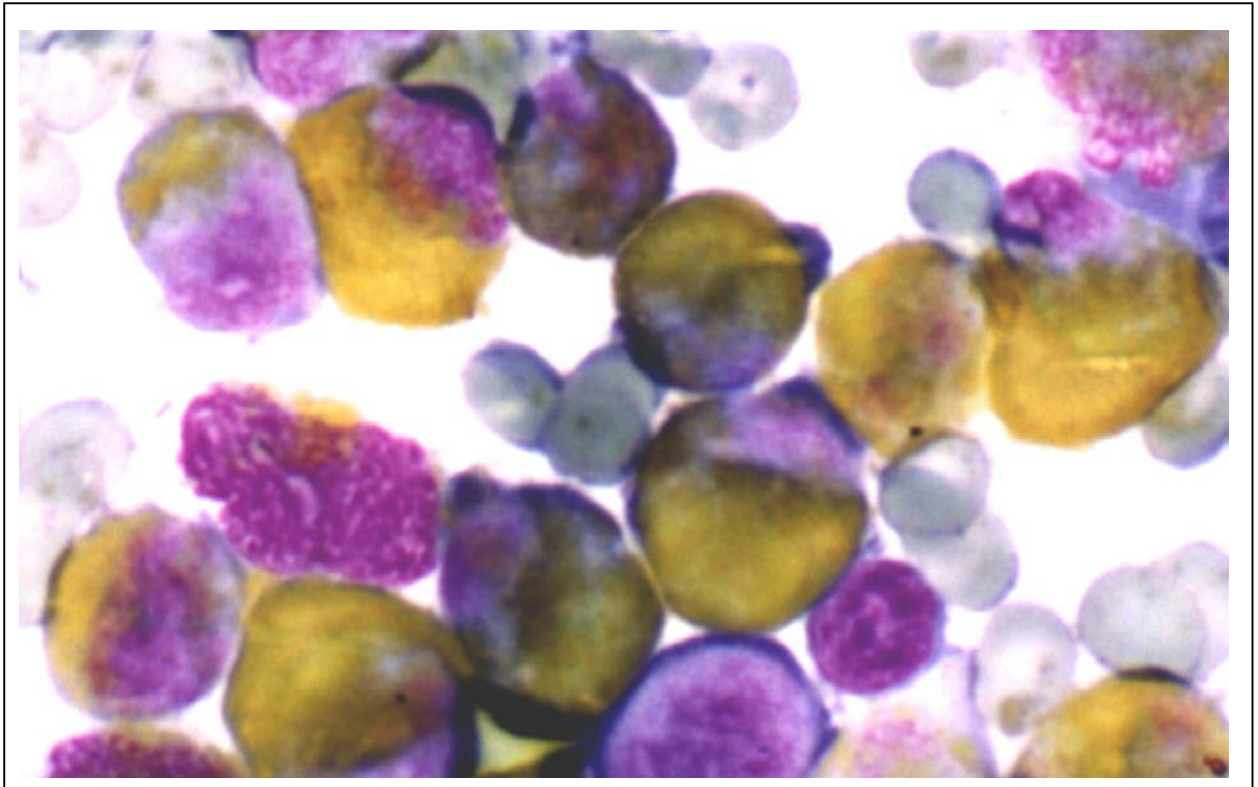


Figura 5 – Método citoquímico de Peroxidase. Medula óssea apresentando positividade em 96,0% dos blastos para a coloração de Peroxidase. Esfregaço sangüíneo de medula óssea de paciente portador de LMA. Aumento: 200x.

O diagnóstico das leucemias linfóides crônicas foi realizado mediante critérios clínicos envolvendo idade, infiltração medular com predomínio de população linfocítica e também, pelo predomínio de linfócitos maduros em sangue periférico; observando-se um espectro variável na contagem celular absoluta. Para esse subtipo de leucemia não foi realizado o exame de Imunofenotipagem, que poderia contribuir com dados prognósticos da doença. A Figura 6 demonstra a medula óssea de um paciente envolvido neste estudo, portador de LLC, a qual apresentou-se normocelular, mas infiltrada com 92,8% de linfócitos maduros.

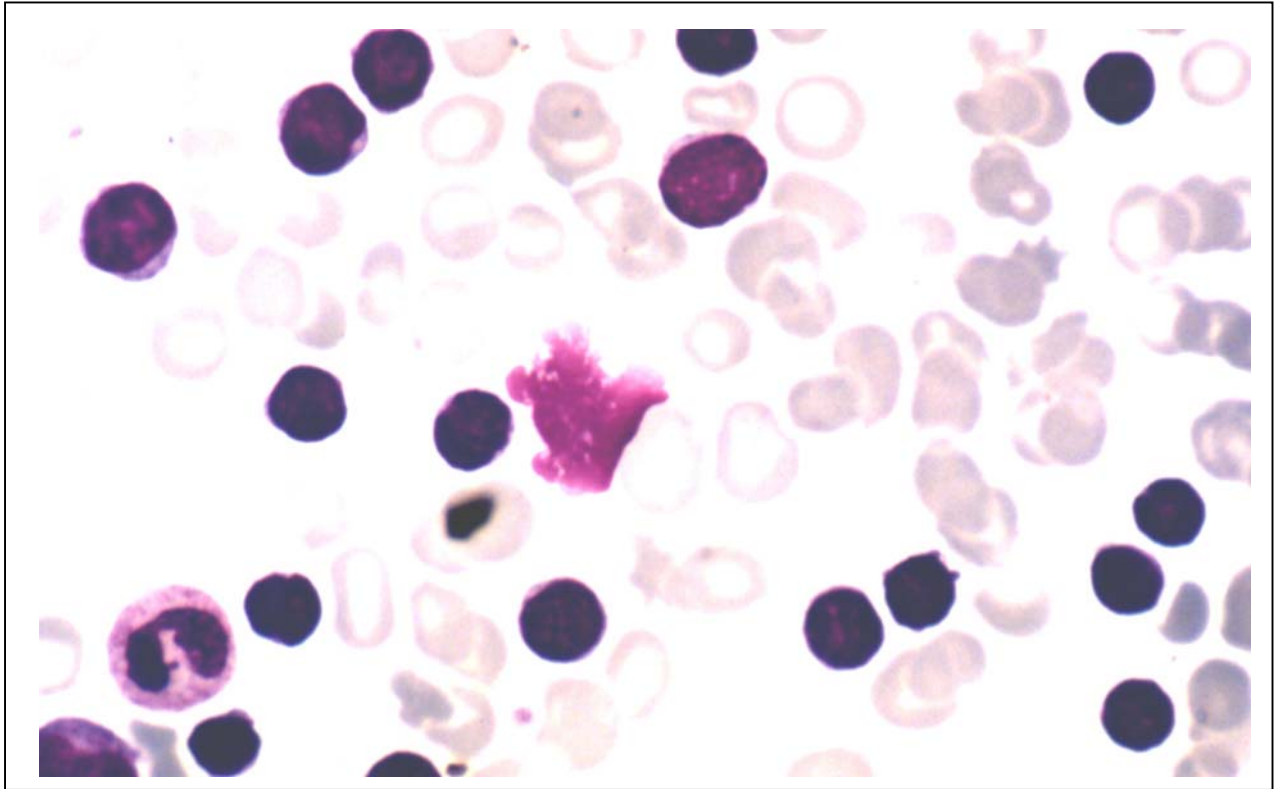


Figura 6 – Leucemia Linfóide Crônica. Medula óssea normocelular apresentando 92,8% de linfócitos maduros. Esfregaço sangüíneo de medula óssea de paciente com LLC. Coloração: MayGrünwald Giemsa. Aumento: 200 x.

4.3 LINFOMAS

O diagnóstico dos linfomas de Hodgkin e não Hodgkin foi realizado mediante critérios envolvendo: exame clínico, exames de ultrassonografia, raio-X, biópsias, imunohistoquímica, exames histopatológicos submetidos a coloração de Hematoxilina–Eosina e estadiamento. A Figura 7 mostra um corte histológico de linfoma de Hodgkin tipo celularidade mista. O diagnóstico foi realizado através de biópsia de gânglio cervical proveniente de paciente envolvido no estudo, e técnicas histológicas, descrito em Materiais e Métodos. A Figura 8 mostra corte histológico de um linfoma não Hodgkin difuso de grandes células, também obtido através de biópsia de nódulo cervical de um paciente participante e submetido às técnicas de análise adequadas.

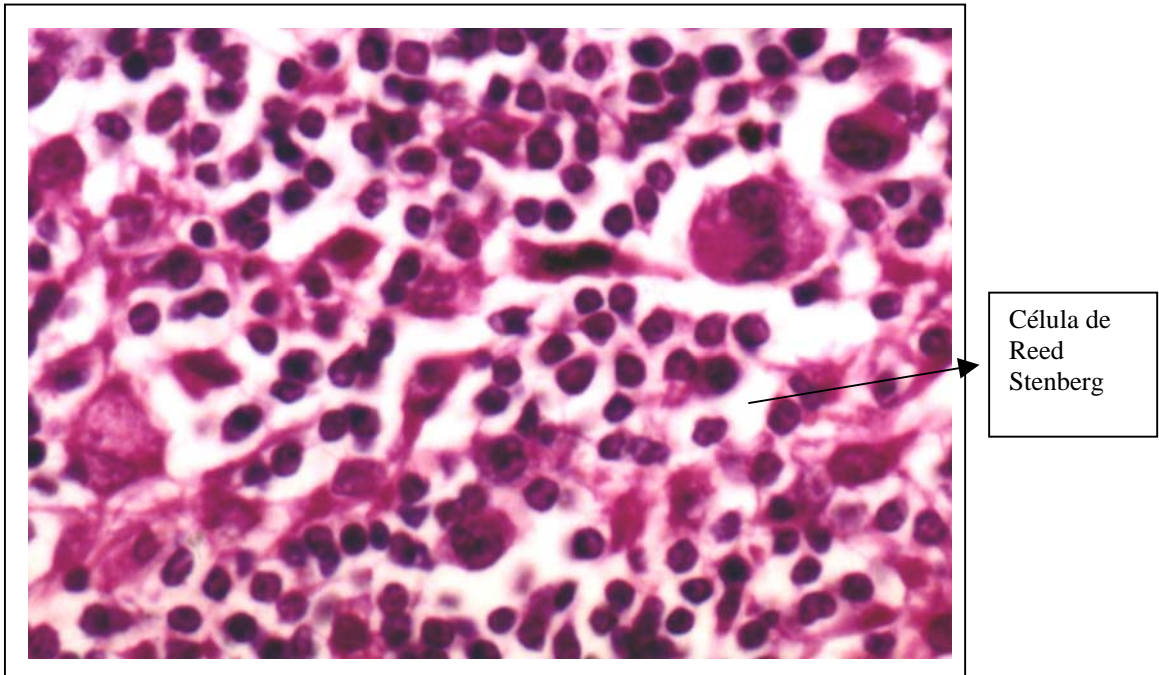


Figura 7 – Linfoma de Hodgkin tipo celularidade mista.
Coloração: Hematoxilina Eosina. Aumento:125 x.

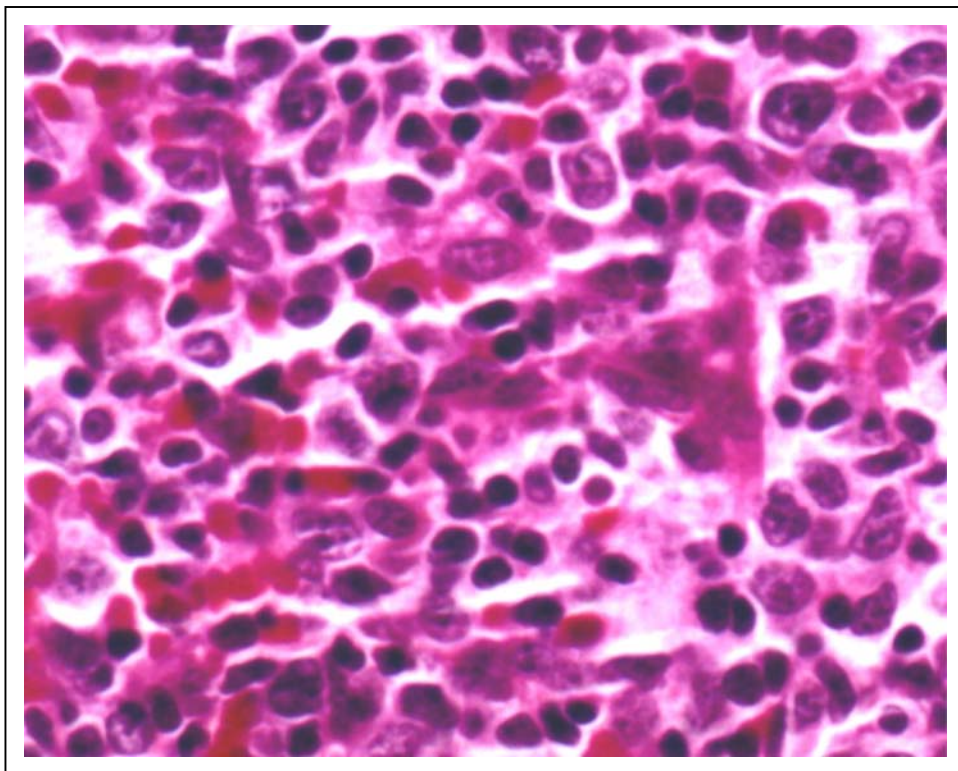


Figura 8- Linfoma não Hodgkin difuso de grandes células.
Coloração: Hematoxilina Eosina. Aumento: 125 x.

4.4 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO DNA

Com a finalidade de se realizar a análise genotípica para a quimiocina SDF-1, amostras de sangue foram coletadas de pacientes com diagnóstico clínico, citoquímico e histopatológico para as seguintes doenças: leucemias linfóides agudas e crônicas e linfomas de Hodgkin e não Hodgkin.

O DNA das amostras foi extraído de leucócitos e a integridade das preparações obtidas foi analisada em gel de agarose 1% (m/v), o qual apresentou um perfil eletroforético típico de uma amostra íntegra, como mostra a Figura 9.

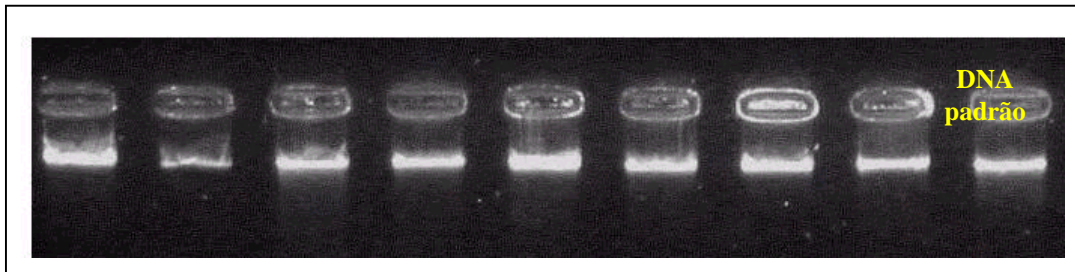


Figura 9 – Integridade do DNA. DNA obtido de leucócitos, como descrito em materiais e métodos, visualizado em gel de agarose 1% em presença de brometo de etídio. Foi aplicado 5 :L de DNA em solução de xileno cianol

A Figura 9 mostra um perfil comum a todas as amostras, as quais apresentaram bandas únicas com concentração compatível em relação ao padrão de DNA (100ng/ μ l); demonstrando que não houve degradação das amostras de DNA durante sua extração e que as mesmas se apresentavam íntegras.

4.5 AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE SDF-1

A partir das amostras de DNA dos pacientes com as neoplasias descritas, realizou-se PCR para o fragmento SDF utilizando-se *primers* específicos como descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 10, o resultado da amplificação pode ser visualizado em gel

de agarose a 2% (m/v) contendo brometo de etídio, onde se observa a presença de banda na altura de 300 pb, o qual é correspondente à amplificação do SDF-1 (293 pb).

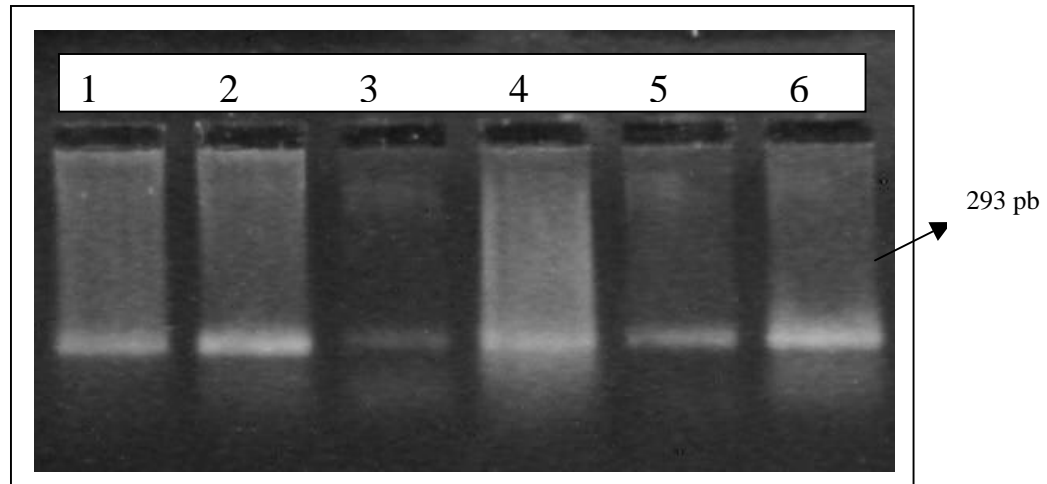


Figura 10 – Amplificação do fragmento de 293 pb do SDF. Gel de agarose 2% (m/v) mostrando PCR do SDF (293 pb). Coluna 6: Controle positivo - marcador de SDF (293 pb); Colunas 1 a 5, PCR realizado a partir de leucócitos de pacientes com as neoplasias estudadas. Foram aplicados 5 :1 de produto de PCR em solução de xileno cianol.

Todas as amostras apresentaram uma banda na altura de 293 pb, indicando que houve a amplificação do fragmento de SDF1 desejado; e também que não houve contaminação na fase do PCR tão pouco durante a aplicação das amostras no gel para a realização da eletroforese, a qual foi realizada a 80V durante 45 minutos. O gel foi visualizado em luz ultra-violeta em presença de brometo de etídio.

A quimiocina SDF1, também chamada de CXCL12, (*GenBank*: L 36033), apresenta um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não codificadora (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito; como este polimorfismo elimina o sítio de restrição da enzima *Msp* I, realizou-se digestão enzimática (*RFLP-assay*), determinando-se, desta forma o genótipo SDF1 para indivíduos portadores das neoplasias em estudo.

4.6 TRATAMENTO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *MSP I*

O produto do PCR foi submetido ao tratamento enzimático em presença da enzima de restrição *Msp I* como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. A Figura 11 mostra os produtos de digestão enzimática caracterizando os genótipos encontrados na população em estudo:

- **wt/wt** representa o genótipo na ausência de mutação, e apresenta duas bandas eletroforéticas, uma com 100 pb e outra com 193 pb.
- **wt/3'A** representa o genótipo em heterozigose, contendo três bandas eletroforéticas: 293 pb, 193 pb e 100 pb.
- **3'A/3'A** representa o genótipo em homozigose para a mutação, com uma única banda de 293 pb.

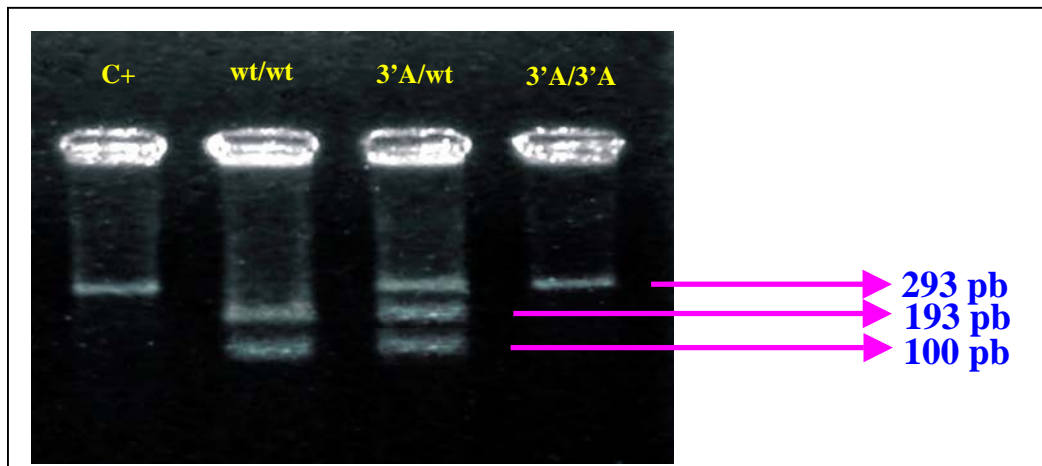


Figura 11 – Digestão enzimática do fragmento SDF-1. Gel de Agarose 3% (m/v) mostrando o produto da digestão enzimática do SDF1. Variantes do gene SDF1 foram obtidas após amplificação do DNA genômico utilizando-se primers específicos, como já descrito e observado anteriormente. O produto de PCR foi submetido à digestão enzimática, como descrito em Materiais e Métodos.

4.7 ANÁLISE GENOTÍPICA DO SDF-1

Através da técnica de PCR – reação em cadeia da polimerase e a utilização da enzima de restrição *Msp* I, foi possível realizar a genotipagem da quimiocina SDF-1 das doenças estudadas: leucemias linfóides e linfomas. Estes dados são demonstrados na tabela 5. As análises demonstram que 38,8% (24/62) dos pacientes portadores de linfoma possuem o genótipo heterozigótico 3'A/wt em contraste com 26,1% (11/42) dos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide.

Tabela 5 – Frequência alélica do SDF1- 3'A em pacientes com Leucemia e Linfoma

	SDF-RFLP wt/wt *	SDF-RFLP 3'A/ wt *	SDF-RFLP 3'A/ 3'A*	Frequência do alelo 3'A
Linfoma n= 62	35 (56,4%)	24 (38,8%)	3 (4,8%)	0,27
Leucemia Linfóide n= 42	31 (73,8%)	11 (26,1%)	0 (0%)	0,13

* 3'A/wt e 3'A/3'A representam genótipos heterozigóticos e homozigóticos para a mutação genética da quimiocina SDF-1. wt/wt representa o gene *wild-type*

4.8 PORTADORES DO ALELO 3'A

Em relação aos portadores da mutação 3'A os resultados obtidos indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 12), baseado no teste de Qui-quadrado. Os genótipos das amostras avaliadas obedeceram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

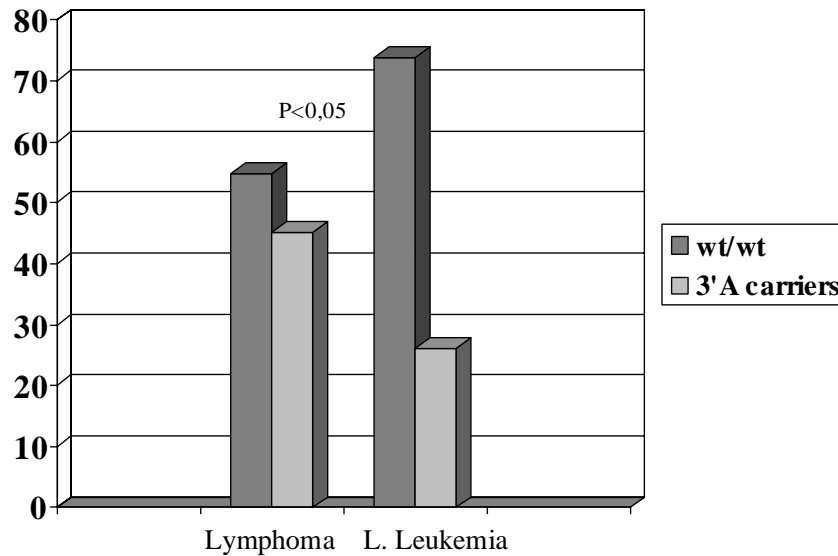


Figura 12 – Portadores do alelo SDF1-3'A em pacientes com linfoma e leucemia linfóide.

A genotipagem de SDF1 foi realizada a pós extração de DNA proveniente de células do sangue periférico.

A técnica utilizada foi PCR, capaz de detectar a mutação G→A na região terminal do gene SDF-1 3'. Agrupou-se os indivíduos homocigóticos (raros) portadores do genótipo 3'A/ 3'A com os indivíduos heterocigóticos em um grupo designado como portadores.

A genotipagem do SDF1 foi realizada a partir de células do sangue periférico pela técnica de PCR-RFLP, a qual detectou a mutação G→A na região 3'-UTR do gene de SDF-1. Esse genótipo 3'A em homocigose foi classificado juntamente com o grupo de heterocigotos referidos como portadores de 3'A.

A leucemia linfóide aguda, doença que abrange cerca de 75% a 80% das leucemias agudas, demonstra um defeito na linhagem celular afetada, presença aumentada de células imaturas em sangue periférico e incompetência para exercer o papel imunológico ao qual estão destinadas.

A leucemia linfóide crônica, representa uma doença que acomete mais freqüentemente adultos, e suas principais características são: falha nos mecanismos apoptóticos e acúmulo progressivo de células funcionalmente incompetentes com sobrevivência longa.

O linfoma não Hodgkin é composto por uma variedade de processos malignos acometendo as linhagens linfóides, que por sua vez apresentam variáveis biológicas e histológicas. Sua etiologia ainda é passível de investigações. A maioria dos casos de linfoma

não Hodgkin inicia-se nos linfonodos, mas casos extranodais representam cerca de 20% a 30% de todos os casos (WEISENBURGER, 1994; GROVES, 2000).

O Linfoma de Hodgkin é uma doença de patogênese ainda discutível. As células malignas de Hodgkin e Reed-Sternberg derivam do centro germinativo de células B, e menos frequentemente de células T. A marca característica do linfoma de Hodgkin é a presença das células de Reed-Sternberg, as quais compreendem menos que 1% do infiltrado celular nos tecidos com linfoma (WEISS *et al.*, 1999).

O SDF-1 inicialmente identificado como fator derivado do estroma da medula óssea, e também um fator estimulatório de células pré-B, é também muito eficiente na quimioatração de linfócitos e tem importante papel na linfopoese de células B e *homing* de células hematopoéticas como as “stem cells” à medula óssea (NAGASAWA, 1996; BLEUL, 1996 b; LAPIDOT & KOLLET, 2002).

A variante genética da quimiocina SDF-1, a qual apresenta uma mutação (transição do aminoácido G→A na região 3’UTR) deve ter uma importante função regulatória devido ao possível aumento na produção de SDF (WINKLER, 1998). Sabe-se que o RNA mensageiro para SDF-1 é abundantemente expresso em células de estroma isoladas de pacientes com linfoma (ARAI, 2000). Neste contexto, os pacientes portadores do genótipo 3’A podem ser mais susceptíveis a apresentarem proliferação de células neoplásicas em seus linfonodos, uma vez que, a mutação pode estar associada a um aumento na produção de SDF-1. Já os pacientes com LLA, portadores do gene 3’A podem apresentar a permanência de suas células blásticas a nível de medula óssea com decréscimo nas contagens dessas células a nível de sangue periférico, como também decréscimo de outras populações celulares viáveis a nível de medula óssea.

As regiões 3’UTR de RNA mensageiro para muitos genes têm sido identificadas como regiões regulatórias importantes do transcrito de RNA por si só, bem como do produto originado (THEKKUMKARA & LINAS, 2003) Na maioria dos casos, os mecanismos de controle translacionais resultam da interação da ligação proteína-RNA com as regiões 5’ ou 3’UTR. Um exemplo é a proteína quinase PKR, ativada por regiões 3’UTR do RNA, a qual pode gerar diversos efeitos, inclusive anti-tumorais (DAVIS & WATSON, 1996; BEN-ASOULI *et al.*, 2002; NUSSBAUM *et al.*, 2002; OSMAN *et al.*, 1999). Em diversas análises com organismos vertebrados, demonstrou-se que a região 3’-UTR é mais longa que sua análoga 5’-UTR, indicando um significativo potencial regulatório. Além disso, a própria variação na extensão da região 3’-UTR tem aumentado durante os processos evolutivos, sugerindo um papel maior na complexidade das espécies (MAZUMBER *et al.*, 2003).

A maturação normal de linfócitos B e sua proliferação são processos regulados pelas quimiocinas, portanto, polimorfismos genéticos das quimiocinas e seus receptores pode alterar o curso da resposta imunológica, ou mesmo alterar o curso de algumas infecções como o observado durante a infecção do vírus HIV. Na síndrome da imunodeficiência adquirida, os genótipos variantes SDF1-3'A foram associados com o aumento de risco para o desenvolvimento de linfomas não Hodgkin em heterozigotos, e o risco foi potencializado (4 vezes) em indivíduos homozigóticos (RABKIN,1999).

Sabendo que o SDF-1 é uma chave importante no comportamento de células leucêmicas pré-B, é possível que, inibindo sua participação, obtenha-se resultados terapêuticos nos pacientes acometidos com LLA- leucemia linfoblástica aguda pré-B. JUAREZ *et al.*, (2003) examinaram a habilidade de inibidores do SDF-1 em modular as respostas das células pré-B ao SDF-1, incluindo quimiotaxia, migração e sobrevivência na medula óssea. Os inibidores derivados da polifemusina II- T140, TC140012, T134 e o biciclâm AMD3100 inibiram a quimiotaxia das células leucêmicas, proliferação dependente do estroma e inclusive aumentaram os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos vincristina e dexametasona. Portanto, devido a habilidade desses agentes inibidores de SDF-1 em modular essas importantes atividades biológicas das células leucêmicas, investigações futuras merecem ser realizadas (JUAREZ *et al.*, 2003).

O RNA mensageiro para SDF-1 é expresso em vários tecidos, e esta quimiocina é identificada como um quimioatraente para linfócitos. O SDF-1 induz a polimerização de actina em linfócitos, um processo que é pré-requisito para motilidade. Demonstrou-se também que a ativação do complexo TCR mediado pela fosforilação da proteína quinase C (PKC) está envolvida na regulação da expressão do receptor CXCR4. Logo a quimiocina SDF-1 é inclusive capaz de regular a ativação das células T (PEACOCK *et al.*, 1999).

Sabe-se que a interação do SDF-1 com o receptor CXCR4 está implicado na migração das células CD34+. DUNUSSI-JOANNOPOULOS e colaboradores (2002), demonstraram que o SDF-1 beta humano associado a linhagens celulares tumorais de melanoma e leucemia C1498 murinos; promoveu respostas anti-tumorais eficazes. A imunohistoquímica demonstrou uma infiltração de células T ao meio de células tumorais contendo SDF-1, além da rejeição das células cancerígenas pelos camundongos. A exploração dessa potencialidade do SDF-1 em promover respostas anti-tumorais também representa novas possibilidades de intervenções terapêuticas (DUNUSSI-JOANNOPOULOS *et al.*, 2002).

O SDF-1 aumenta substancialmente a migração de células centro-foliculares do linfoma B, mas não a migração de células purificadas do centro germinativo. Portanto, esta distinção representa a diferença na sobrevivência entre esses dois fenótipos, além de que, o SDF-1 produzido no centro folicular pode ser determinante na disseminação das células tumorais (CORCIONE *et al.*, 2000).

A porcentagem de portadores do gene 3'A teve variação estatisticamente significativa entre os pacientes diagnosticados com linfoma (45,16%) em relação aos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide (26,19%). Essa variação genética deve representar uma função regulatória importante pelo possível aumento de SDF-1 pelo estroma dos linfonodos. Este trabalho sugere que este polimorfismo pode ser um determinante diferencial nos pacientes acometidos com linfomas e leucemias.

Têm-se identificado um número cada vez maior de moléculas quimioatraentes participantes no processo de migração de células linfoblásticas malignas *in vitro* (MOHLE *et al.*, 1998; BURGER *et al.*, 1999). Por exemplo, tanto as células da LLC como as da LLA expressam receptores CXCR4 e são quimioatraídas pela quimiocina SDF-1 (MOHLE *et al.*, 1999, 2000; NISHII *et al.*, 1999; BURGER *et al.*, 1999; BRADSTOCK *et al.*, 2000). O CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma B, bem como em blastos de linhagem mielóide (MOHLE *et al.*, 1998).

4.9 SDF-LLA

A fim de se avaliar a importância na expressão de CXCR4 no tráfego e desenvolvimento de células leucêmicas, analisou-se a expressão do RNA mensageiro para o receptor CXCR4 em 10 pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda, os quais também tiveram a quimiocina SDF-1 genotipada (Figura 13).

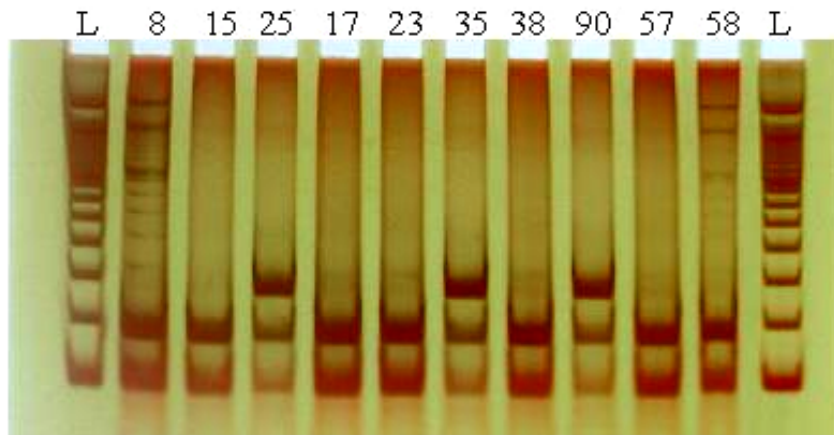


Figura 13 – Genotipagem de SDF em 10 pacientes por RT-PCR seguido da análise por RFLP *Msp* I. Sete pacientes avaliados (números 8, 15, 17, 23, 38, 57, 58) demonstraram genótipo wt/wt, enquanto 3 pacientes (números 25, 35 e 90), demonstraram ser portadores do genótipo 3'A. A linha designada por L é um marcador de 100 pb. (*Promega, Madison, WI*).

4.10 Análise da Integridade do Rna - \exists Actina

O RNA foi extraído das células de sangue periférico de pacientes portadores de LLA como descrito em Materiais e Métodos e depois transcrito em DNAc. A fim de determinar a integridade das amostras de RNA, utilizou-se *primers* compostos por oligonucleotídeos específicos de \exists actina e uma seqüência de 353 pb foi amplificada pela técnica de PCR. Em cada amostra de RNA dos pacientes com LLA foi observado a presença da banda esperada, indicando que esses RNAs estavam íntegros, sendo então possível a realização de sua amplificação (Figura 14).

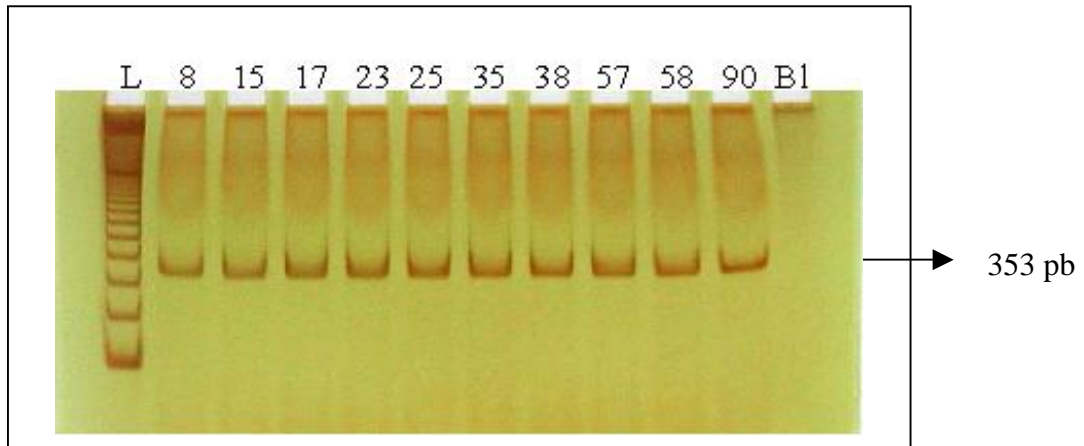


Figura 14 – Integridade das amostras de RNA obtidos das células de sangue periférico de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda. Através da técnica de RT-PCR, realizou-se a amplificação de uma banda de 353 pb, específica para \exists actina. Somente a seqüência esperada foi observada em gel de acrilamida, indicando a integridade das amostras de RNA e ausência de contaminação por DNA genômico. A linha marcada por L representa o marcador (*Promega, Madison, WI*) de 100 pb. A linha designada por B1 representa o controle negativo.

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNAM- CXCR4

Foi demonstrado que as células blásticas da leucemia linfoblástica aguda (LLA) migram à medula óssea com a participação das beta 1 integrinas- VLA-4 e VL-5, além da participação do SDF-1 e seu receptor CXCR4. As conseqüências da regulação para baixo do receptor CXCR4 no comportamento das células leucêmicas em camundongos NOD/SCID foram avaliadas e incluem a reduzida (metade) capacidade de repopulação celular à medula comparado às células que não sofreram tratamento com anticorpos monoclonais anti-CXCR4 nem inibição da proteína G com toxina *pertussis*. O SDF-1 e o CXCR4 estão envolvidos inclusive na regulação da função das beta-1 integrinas sendo importantes na localização das células pré-B a nível de medula *in vivo*.(SHEN *et al.*, 2001; KOLLET *et al.*, 2002).

Quando utilizou-se *primers* específicos para o receptor CXCR4, foi detectada uma banda única de 400 pb correspondente ao RNA, obtido das amostras celulares de sangue periférico de 6 pacientes (Figura 15), os quais sofreram recidiva e foram submetidos à quimioterapia por mais de 3 anos. Além disso, detectou-se o genótipo wt/wt para o SDF-1 nestes mesmos pacientes (Figura 13). Em contraste, o RNA mensageiro específico para CXCR4 não foi encontrado nas células de 4 pacientes (Figura 15), os quais já

haviam terminado a quimioterapia. Desses últimos pacientes, observou-se que um era portador do genótipo wt/wt e três eram heterozigotos para o gene SDF1-3'A (Figura13).

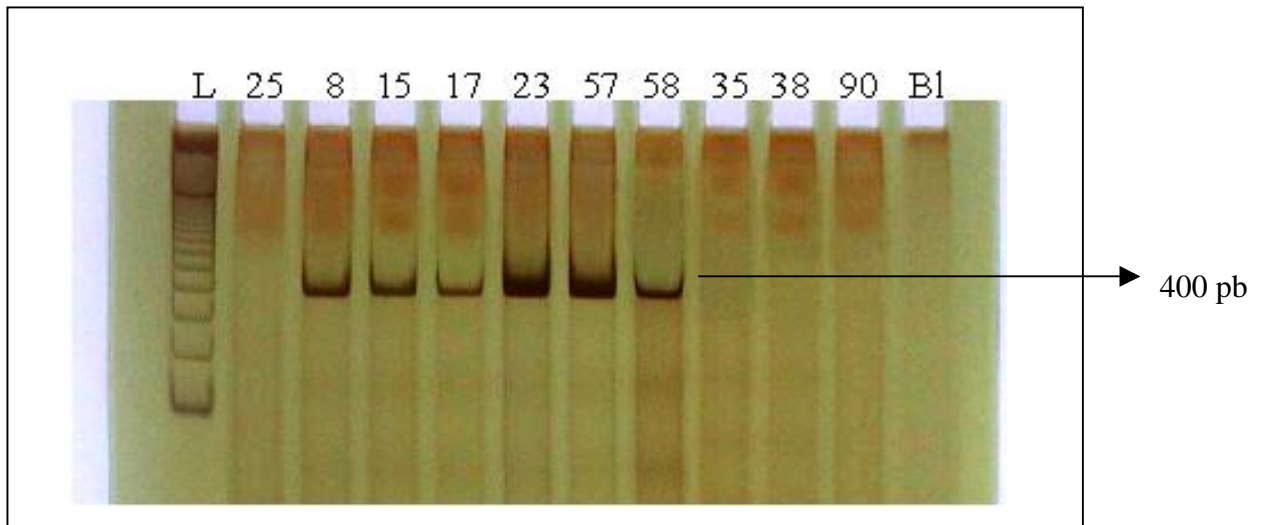


Figura 15 – Expressão do RNA mensageiro para o receptor de quimiocinas CXCR4 em amostras de sangue de pacientes portadores de Leucemia Linfóide. Realizou-se a amplificação de 400 pb por RT-PCR relativo a seqüência específica do CXCR4. Seis pacientes, números 8, 15, 17, 23, 57, e 58, apresentaram positividade, e 4 pacientes, números 25, 35, 38, e 90, apresentaram negatividade para a expressão de CXCR4. A linha marcada por L, representa o marcador de 100 pb.

A região 3'-UTR de muitos RNA mensageiros tem sido identificada como uma região importante na regulação da transcrição gênica e dos produtos transcritos obtidos (THEKKUMKARA & LINAS, 2003; MAZUMDER *et al.*, 2003). O alelo variante para a quimiocina SDF-1 deve possuir uma função regulatória importante, incluindo o aumento na produção de SDF (WINKLER, 1998; GAZITT & LIU, 2001), o que pode refletir na migração das células blásticas, prevenindo ou retardando esse mecanismo. A quimiocina SDF-1 é constitutivamente produzida pelas células do estroma de medula óssea (BLEUL *et al.*, 1996 b; AIUTI *et al.*, 1997), o que pode contribuir para a infiltração de blastos na medula. Não se sabe, no entanto, se outros sítios de infiltração leucêmica também possuem maior expressão e produção desta quimiocina quando comparados por determinados sítios não invadidos por estas células.

As células endoteliais da medula óssea humana produzem e liberam pequenas quantidades de SDF-1 e expressam o receptor CXCR4 somente *in vivo* (YUN & JO, 2003). O SDF-1 é uma quimiocina chave na regulação do comportamento das células pré-B

normais e leucêmicas. É possível que a interferência neste processo aplicado em casos de LLA pré-B possa ter implicações terapêuticas. (MULLER *et al.*, 2002; PELED *et al.*, 2002; PETIT *et al.*, 2002; JUAREZ *et al.*, 2003).

A patogênese da leucemia linfocítica crônica B têm sido relacionada a um aumento na expressão do receptor de quimiocina CXCR4 e também a um aumento funcional da resposta ao seu ligante SDF-1 (CXCL12) (BARRETINA *et al.*, 2003). Sabendo-se que, a elevada expressão de CXCR4 prediz infiltração extramedular da LLA em crianças, sugeriu-se que o CXCR4 e seu ligante tem um papel crucial na invasão extramedular (CRAZZOLARA *et al.*, 2001). Estas formas clínicas extramedulares são importantes para o entendimento da biologia desta modalidade de câncer, e também para o desenvolvimento de novos parâmetros prognósticos. A análise do RNA mensageiro para CXCR4 em células do sangue periférico de pacientes com LLA juntamente com a genotipagem de SDF podem representar novos marcadores adjuvantes para o seguimento da terapia.

Uma expressão elevada do receptor CXCR4 bem como sua atividade funcional aumentada, tem sido descritos na linhagem de leucemia LLC-B (BURGER *et al.*, 1999, MÖHLE *et al.*, 1999), bem como na linhagem de LLA-B, sugerindo que o CXCR4 tem um papel importante na patogênese de malignidades que acometem células B em diferentes estados maturativos.

O SDF-1 foi inicialmente identificado como um fator estimulante de crescimento de células pré-B (PBCSF) (NAGASAWA *et al.*, 1994), compatível com o fato de que, durante a diferenciação das células B, o CXCR4 é expresso em células precursoras e pode estar envolvido no tráfego dessas células (D'APUZZO *et al.*, 1997). Outro dado relevante é que camundongos deficientes para a produção de SDF-1 e expressão de CXCR4 demonstram linfopose deficiente sugerindo um papel central para o SDF-1/CXCR4 na diferenciação de células B (NAGASAWA *et al.*, 1996; CORCIONE *et al.*, 2000). Em adição aos efeitos migratórios, o SDF-1 também deve atuar como fator de crescimento em diversas doenças malignas que acometem a linhagem B. O aumento na expressão de CXCR4 tem sido relacionado com a infiltração na medula óssea de várias desordens linfoproliferativas. (MÖHLE *et al.*, 1999), o que também pode ocorrer na leucemia linfoblástica aguda. O receptor CXCR4 é expresso de forma variável nas células leucêmicas e o SDF é constitutivamente produzido por células fibroblásticas do estroma, sugerindo que o SDF-1 deve contribuir para o tropismo não randômico de células malignas, dependendo do nível de expressão do receptor CXCR4.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

As análises demonstraram que 38,8% (24/62) dos pacientes portadores de linfoma possuem o genótipo heterozigótico 3'A/wt em contraste com 26,1% (11/42) dos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide. A porcentagem de portadores do gene 3'A da quimiocina SDF-1 teve variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os pacientes diagnosticados com linfoma (45,16%) em relação aos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide (26,19%). Essa variação genética deve representar uma função regulatória importante pelo possível aumento de SDF-1 pelo estroma dos linfonodos. Este trabalho sugere que este polimorfismo pode ser um determinante diferencial nos pacientes acometidos com linfomas e leucemias.

Quando utilizou-se *primers* específicos para o DNAC do receptor CXCR4, foi detectada uma banda única de 400 pb correspondente ao DNAC obtido a partir do RNA de leucócitos de sangue periférico de 6 pacientes, os quais sofreram recidiva e foram submetidos à quimioterapia por mais de 3 anos. Além disso, detectou-se o genótipo wt/wt para o SDF-1 nestes mesmos pacientes. Em contraste, o RNA mensageiro específico para CXCR4 não foi encontrado nas células de 4 pacientes, os quais já haviam terminado a quimioterapia. Desses últimos pacientes, observou-se que um era portador do genótipo wt/wt e três eram heterozigotos para o gene SDF1-3'A.

A análise da expressão do RNAm do receptor CXCR4 em células de sangue periférico de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda juntamente com a genotipagem de SDF-1, podem representar novos marcadores para avaliar a eficácia do tratamento desses pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A K.; LICHTMAN, A H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 3ª.edição, Rio de Janeiro. Editora Revinter, 2000.

AIUTI, A.; WEBB, I.J.; BLEUL, C.; SPRINGER, T.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, p.111-120, 1997.

ALKHATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M., BERGER, E.A. CCR5: a RANTES, MIP-1 (α), MIP-1 (β) receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic ZHIV-1. *Science*, v. 272, p.1955-1958, 1996.

ARAI, J.; YASUKAWA, M.; YAKUSHIJIN, Y.; MIYAZAKI, T.; FUJITA, S.; Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *European Journal of Haematology*, v. 64, p.323-332, 2000.

ARVANITAKIS, L., GERAS-RAAKA, E., VARMA, A., GERSHENGORN, M.C., CESARMAN, E.. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*, v. 385, p.347-350, 1997.

AUST, G.; STEINERT, M.; KIESSILING, S.; KAMPRAD, M.; SIMCHEN, C. Reduced Expression of Stromal-Derived Factor 1 in Autonomous Thyroid Adenomas and Its Regulation in Thyroid-Derived Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86 (7), p.3368-3376, 2001.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology*, v. 55, p. 97-179, 1994.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 675-705, 1997.

BALTER, M. Chemokine mutation slows progression in pathogenesis by a SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, v.118, p. 681-688, 1998.

BALTIMORE, D. Lessons from people with nonprogressive HIV infection. *New England Journal of Medicine*, v.98, p. 332:359, 1995.

BARRE-SINOUSI, C.; CHENSUE, V. Isolation of a T- lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, p.868, 1983.

BARRETINA J.; JUNCA J.; LLANO A.; GUTIERREZ A.; FLORES A.; BLANCO J.; CLOTET B.; ESTE, J.A. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Annals of Hematology*, v. 82, p.500-505, 2003.

BATHIA, S. Epidemiology and etiology. In: PUI, C.H. *Childhood leukemias, 1 ed.* Cambridge University Press., cap 3, p. 38-52, 1999.

BAZAN, J.F., BACON, K.B., HARDIMAN, G., WANG, W., SOO, K., ROSSI, D., GREAVES, D.R., ZLOTNIK, A., SCHALL, T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C. *Nature*, v.385, p.640-644, 1997.

BEN-ASOULI, Y.; BANAI, Y.; PEL-OR, Y.; SHIR, A .; KAEMPFER, R. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell*, v. 108(2), p. 221-32, 2002.

BENBOUBKER, L.; WATIER, H.; CARION, A.; GEORGET, M.T.; DESBOIS, I.; COLOMBAT, P.; BARDOS, P.; BINET, C.; DOMENECH, J. Association between the SDF1-3'A allele and high levels of CD349+) progenitor cells mobilized into peripheral blood in humans. *British Journal of Haematology*, v. 113, p. 247-50, 2001.

BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the immunological Characterization of Leukemia (EGIL). *Leukemia*, v. 9, p. 1783-1786, 1995.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, MARIE-THÈRESE; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukemia. French-American-British Cooperative Group. *British Journal of Haematology*, v, 33, p.451-458, 1976.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, MARIE-THÈRESE; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukaemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, v.103, p.620-625, 1985a.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, MARIE-THÈRESE; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Criteria for the diagnosis for acute leukemia of megakaryocyte lineage. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, v. 103, p.460-462, 1985b.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, MARIE-THÈRESE; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). *British Journal of Haematology*, v.78, p. 325-329, 1991.

BERTOLONI, F.; DELL'AGNOLLA, C.; MANCUSO, P.; RABASCIO, C.; BURLINI, A.; MONESTIR, S.; GOBBI, A.; PRUNERI, G.; MARTINELLI, G. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Research.*, v. 62, p. 3106-3112, 2002.

BIONDI, A.; CIMINO, G.; PIETERS, R.; PUI, CHING-HON. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*, v.96, 2000.

BLEUL, C.C.; FARZAN, M.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; CLARK-LEWIS, I.; SODROSKI, J.; SPRINGER, T.A. (a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for lestr/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, v. 382, p. 829-832, 1996.

BLEUL, C.C.; FUHLBRIGGE, R.C.; CASANOVAS, J.M.; AIUTI, A.; SPRINGER, T. A. (b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of Experimental Medicine*, n. 184, p.1101-1109, 1996 b.

BLEUL, C.C.; WU, L.; HOXIE, J.A.; SPRINGER, T.A.; MACKAY, C.R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differently expressed and regulated on human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n. 94, p. 1925-1930, 1997.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, v. 86, p. 1649-1660, 1995.

BRADSTOCK, K.F.; MAKRYNIKOLA, V.; BIANCHI, A.; SHEN, W.; HEWSON, J.; GOTTLIEB, D.J. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia*, v. 14, p. 882-888, 2000.

BURGER, J. A.; BURGER, M. & KIPPS, T.J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXC4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, v. 94, p. 3658-3667, 1999.

BURGER J.A.; KIPPS T.J. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia and Lymphoma*, v. 43, p.461-466, 2002.

BURI, C.; KORNER, M.; SCHARLI, P.; CEFAL, D.; UGUCCIONI, M.; MUELLER, C.; LAISSUE, J. A.; MAZZUCHEL, L. CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. *Blood*, v.96, p.1543-1548, 2001.

BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, v. 67, p. 1033-1036, 1991.

CHENSUE, STEPHEN W. Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, p. 821-835, 2001.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C., SODROSKI, J. The (beta)-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, v.85, p.1135-1148, 1996.

CHOLLET-MARTIN, S., MONTRAVERS, P., GIBERT, C., ELBIM, C., DESMONTS, J.M., FAGON, J.Y., GOUGEROT-POCIDALO, M.A. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infection and Immunology*, v. 61, p. 4553-4559, 1993.

CLARK-LEWIS, I., SCHUMACHER, C., BAGGIOLINI, M., MOSER, B. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *The Journal of biological chemistry*, v. 266, p. 23128-23134, 1991.

COFFIN, J.; Human immunodeficiency viruses. *Science*, v. 232, p. 697, 1986.

COLLINS, P. D.; GODDARD, S.; WILLIAMS, A.; MORLAND, C.; QIN, S.; GLADUE, R.; HUBSCHER, S.; ADAMS, D.H. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infection and Immunology*, v. 61, p.4553-4559, 1993.

COLVIN, B. L.; THOMSON, A. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation*, v.74, p.149-155, 2002.

CORCIONE, A.; OTTONELLO, L.; TORTOLINA, G.; FACCHETTI, P.; AIROLDI, I.; GUGLIELMINO, R.; DADATI, P.; TRUINI, M.; SOZZANI, S.; DALLEGRI, F. & PISTOIA, V. Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, p. 628–635, 2000.

CRAZZOLARA R.; KRECZY A.; MANN G, HEITGER A.; EIBL, G.; FINK F. M.; MOHLE R.; MEISTER, B. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*, v.119, p.579, 2002.

DAVIS, S.; WATSON, J. C. In vitro activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3' untranslated regions of human alpha-tropomyosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93(1), p.508-513, 1996.

D'APUZZO, M.; ROLINK, A.; LOETSCHER, M.; HOXIE, J.A.; CLARK-LEWIS, I.; MELCHERS, F.; BAGGIOLINI, M. & MOSER, B. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European Journal of Immunology*, v. 27, p. 1788-1793, 1997.

DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DIMARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R., LANDAU, N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381:661-666, 1996.

DETTIN, M.; SCARINCI, C.; PASQUATO, A.; DI BELLO, C. Synthetic peptides for study of human immunodeficiency virus infection. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, v. 102-103, p. 41-47, 2002.

DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; ZUBEREK, K.; RUNYON, K.; HAWLEY, R.G.; WONG, A.; ERICKSON, J.; HERRMANN, S.; LEONARD, J.P. Efficacious immunomodulatory activity of the chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1): local secretion of SDF-1 at the tumor site serves as T-cell chemoattractant and mediates T-cell-dependent antitumor responses. *Blood*, v. 100, p.1551-1558, 2002.

FON, K. A.; TODD R. F. Immunologic classification on leukemia and lymphomas. *Blood*, v. 68, p.1-31, 1986.

GALLO, R. C. GODDARD, S.; WILLIAMS, A.; MORLAND, C.; QIN, S.; GLADUE, R.; HUBSCHER, S.; ADAMS, D.H. Frequent detection in a isolation of cytophatic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. *Science*, v.224, p. 500, 1984.

GARCIA-ZEPEDA, E.A., ROTHENBERG, M.E., OWNBEY, R.T., CELESTIN, J., LEDER, P., LUSTER, A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cell and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Medicine*, v.4, p.4459-4456, 1996.

GAZITT, Y.; LIU, Q. Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non- Hodgkin's lymphoma patients. *Stem Cells*, p.37-45, 2001.

GODDARD, S.; WILLIAMS, A.; MORLAND, C.; QIN, S.; GLADUE, R.; HUBSCHER, S.; ADAMS, D.H. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation*, v. 72, p. 1957-1967, 2001.

GONG, J. H.; CLARK-LEWIS, I. Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂- terminal residues. *Journal of Experimental Medicine*, v. 181, p. 631-640, 1995.

GONZALO, J.A., LLOYD, C.M., KREMER, L., FINGER, E., MARTINEZ, E.A., SIEGELMAN M.H., CYBULSKY, M., RAMOS, J.C.G. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation: the role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *The Journal of clinical investigation*, v.98, p.2332-2345, 1996.

GORDON, M.Y. Extracellular matrix of the bone marrow microenvironment. *British Journal of Haematology*, v. 70, p.1-4, 1988.

GOTOH, A.; RITCHIE, A.; TAKAHIRA, H.; & BROXMEYER, H.E. Trombopoietin and erythropoietin activate inside-out signal of integrin and enhance adhesion to immobilized fibronectin in human growth-factor-dependent hematopoietic cells. *Annals of Hematology*, v. 75, p. 207-213, 1997.

GOTTLIEB, A.B., LUSTER, A.D., POSNETT, D.N., CARTER, D.M. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *Journal of Experimental Medicine*, 168:941-948, 1988.

GRAHAM, G.J., WRIGHT, E.G., HEWICK, R., WOLPE, S.D., WILKIE, N.M., DONALDSON, D., LORIMORE, S., PRAGNELL, I.B. Identification and characterization of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*, v. 344, p.442-444, 1990.

GRAVES, M. Speculation on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2:120-25, 1986.

GRIMM, M. C.; DOE, W. F. Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1(α), MIP-1(β), and (gamma) interferon-inducible protein by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 2, p. 88-96, 1996.

GROVES, F.D.; LINET, M.S.; TRAVIS L.B.; DEVESA, S.S. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *Journal of the National Cancer Institute*, v.92, p.1240–1251, 2000.

HALL, J.M.; KORACH, K. S. Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF-1), a Novel Target of Estrogen Receptor Action Mediates the Mitogenic Effects of Estradiols in Ovarian and Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 2003.

HARRIS, N.J.; JAFFE, E.S. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting- Airlie House Virginia. *Journal of Clinical Pathology*, v. 17, p.3835-49, 1999.

HASEGAWA, H. Increased chemokine receptor expression and the infiltration of lymphoid organs. *Leukemia and Lymphoma*, v. 42 (6), p.1221-1228, 2001.

HAYOE, F.G.J.; FLEMANS, R.J. *Atlas colorido de Citologia Hematológico*. 3ª edição, Editora Artes Médicas, 1995.

HILL, ADRIAN V. S. Genetics and genomics of infectious disease susceptibility. *British Medical Bulletin. Impact of Genomics on Healthcare*, n.55, p. 401-413, 1999.

HORUK, R., CHITNIS, C.E., DARBONNE, W.C., COLBY, T.J., RYBICKI, A., HADLEY, T.J., MILLER, L. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, v. 261, p.1182-1184, 1993.

JORDAN, PATRICK; ABBAL, CLAIRE; NORA, KELLY; HORI, TOSHIYUKI; UCHIYAMA, TAKASHI; VENDRELL, JEAN- PIERRE; BOUSQUET, JEAN; TAYLOR, NAOMI; PÈNE, JERÔME; YSSEL, HANS. Cutting Edge :IL-4 Induces Functional Cell-Surface Expression of CXCR4 on Human T Cells. *The Journal of Immunology*, p. 4153-4157, 1998.

JUAREZ, J.; BRADSTOCK, K.F.; GOTTLIEB, D.J.; BENDALL, L.J. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia*, v. 17, p.1294-1300, 2003.

KELNER, G.S., KENNEDY, J., BACON, K.B., KLEYENSTEUBER, S., LARGAESPADA, D.A., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., BAZAN, J.F., MOORE, K.W., SCHALL, T.J. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, v. 266, p.1395-399, 1994.

KERST, J.M.; SANDERS, J.B.; STAPER-CORTENBACH, I.C.; DOORAKKERS, M.C.; HOOIBEINK, B.; van OERS, R.H.J.; von DEM BORNE, A.E.G.K.R.; & van der SCHOOT, C.E. Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34⁺ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood*, v. 81, p.344-351, 1993.

KLEIN, S.; JONES, D. B.; TESCH, H. In vitro differentiation of a Hodgkin's disease derived cell line. *Hematological Oncology*, v.10 (3-4), p.195-205, 1992.

KLEINHANS, M.; TUN-KYI, A.; GILLIET, M.; KADIN, M. E.; DUMMER, R.; BURG, G.; NESTLE, F. O.; Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, v.101 (4), p. 1487-93, 2003.

KOCH, A.E., POLVERINE, P.J., KUNKEL, S.L., HARLOW, L.A., DIPIETRO, L.A., ELNER, V.M., ELNER, S.G., STRIETER, R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, v. 258, p.1798-1801, 1992.

KOLLET, O.; PETIT, I.; KAHN, J.; SAMIRA, S.; DAR, A. ; PELED, A. ; DEUTSCH, V.; GUNETTI, M.; PIACIBELLO, W.; NAGLER, A.; LAPIDOT, T. Human CD34(+)CXCR4(-) sorted harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood*, v.100(8), p. 2778-86, 2002.

KUPPERS, R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Advances in Cancer Research*, v.84, p.277-312, 2002.

LAHRTZ, F., PIALI, L., NADAL, D., PFISTER, H.W., SPANAUS, K.S., BAGGIOLINI, M., FONTANA, A. Chemokines in viral meningitis: chemotactic cerebrospinal fluid factors include MCP-1 and IP-10 for monocytes and activate T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, v. 27, p.2484-2489, 1997.

LAPHAM, C. K. Evidence of cell-surface association between fusion and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science*, v. 274, p. 602-605, 1996.

LAPIDOT T, KOLLET O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*, v.16, p.1992-2003, 2002. .

LAUDANNA, C.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*, v. 271, p. 981-983, 1996.

LEE, G.R; BITHHELL, THOMAS C.; FOERSTER, JOHN; ATHENS, JOHN W.; LUKENS, JOHN N. *Wintrobe Hematologia Clínica*. 1ª edição brasileira. São Paulo: Manole, 1998, p. 2169-2201.

LEE, Y.; GOTOH, A.; KWON, H. J.; YOU, M.; KOHLI, L.; MANTEL, C.; COOPER, S.; HANGOC, G.; MIYAZAWA, K.; OHYASHIKI, K.; BROXMEYER, H.E. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood*, v. 99 (12), p. 4307-17, 2002.

LEGDEUR, M.C.; BEELEN, R.H.; SCHUURHUIS, G.J.; BROEKHOVEN, M.G.; VAN DE LOOSDRECHT, A.A.; TEKSTRA, J.; LANGENHUIJSEN, M.M. & OSSENKOPPELE, G.J. A functional study on the migration of human monocytes to human leukemic cell lines and the role of monocyte chemoattractant protein-1. *Leukemia*, v.11, p. 1904–1908, 1997.

LEGLER, D.F., LOETSCHER, M., BAGGIOLINI, M. & MOSER, B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for lestr/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, v.382, p. 833-835, 1996.

LEVY, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency infection. *Microbiology Reviews*, v. 57, p. 183-289, 1993.

LODI, P. J., GARRETT, D.S., KUSZEWSKI, J., TSANG, M.L., WEATHERBEE, J.A., LEONARD, W.J., GRONENBORN, A.M., CLORE, G.M. High-resolution solution structure of the beta chemokine MIP-1 (beta) by multidimensional NMR. *Science*, v. 263, p.1762-1767, 1994.

LOETSCHER, M.; GEISER, T.; O'REILLY, T.; ZWAHLEN, R.; BAGGIOLINI, M. & MOSER, B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 232-237, 1994.

LOETSCHER, M., GERBER, B., LOETSCHER, P., JONES, S.A., PIALI, L., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M., MOSER, B. Chemokine receptor specific for IP-10 and mig: structure, function, and expression in activated T- lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v.184, p. 963-969, 1996 a.

LOETSCHER, P., SEITZ, M., BAGGIOLINI, M., MOSER, B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 569-577, 1996 b.

LUSTER, A. D.; LEDER, P. IP-10, a C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, v. 178, p. 1057-1065, 1993.

LUSTER, A. D.; GRENBORG, S. M.; LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, v. 182, p. 219-231, 1995.

LUSTER, A. D.; ROTHENBERG, M. E. Role of the chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of leukocyte biology*, v. 62, p. 620-633, 1997.

LUSTER, A.D. Mechanisms of Disease: Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*, v. 338, p.436-445,1998.

MACLEAN, J. A.; OWNBEY, R.; LUSTER, A. D. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen-induced pulmonary eosinophilia. *Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 1461-1469, 1996.

MAGGIO, E.; VAN DER BERG, A.; DIEPSTRA, A.; KLIUVER, J.; VISSER, L.; POPPEMA, S. Chemokines, cytokines and their receptor in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Annals of Oncology*, 13 Suppl 1:52-6, 2002.

MARGOLAIN, J.F.; POPLACK, DG. In: PIZZO, A.P.; POPLACK, D.G. *Principles and Practices of Pediatric Oncology. Acute lymphoblastic leukemia*, 3rd.edition, Philadelphia J.B. LIPPINCOTT COMPANY, cap 17: 409-62, 1997.

MARTINEZ-MAZA, O.; BREEN, E.C.; B-cell activation and lymphoma in patients with HIV. *Current Opinion in Oncology*, v.14, p.528-532. 2002.

MAZUMDER, B.; SESHADRI, V.; FOX, P.L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochemical Sciences*, v.28, p. 91-98, 2003.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.S.; A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, v. 16, p.1215-1219, 1988.

MÖHLE, R.; BAUTZ, F.; RAFII, S.; MOORE, M.A.S.; BRUGGER, W. & KANZ, L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, v. 91, p. 4523-4530, 1998.

MÖHLE, R.; FAILENSCHMID, C.; BAUTZ, F. & KANZ, L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1. *Leukemia*, v. 13, p. 1954–1959, 1999.

MÖHLE, R.; SCHITTENHELM, M.; FAILENSCHMID, C.; BAUTZ, F.; KRATZ-ALBERS, K.; SERVE, H.; BRUGGER, W. & KANZ, L. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 110, p.563–572, 2000.

MULLER A.; HOMEY B.; SOTO H. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410:50-56, 2001.

MULLER, G.; HOPKEN, U. E.; STEIN, H.; LIPP, M.; Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72 (1), p.1-8, 2002.

MURDOCH, CRAIG; FINN, ADAM. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, v. 95, number 10, 2000.

MURPHY, P. M. The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors. *Immunology*, v. 12, p. 593-633,1994.

MURPHY, M. P. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *New England Journal of Medicine*, v. 345, number 11, 2001.

NAGASAWA, T.; KIKUTANI, H. & KISHIMOTO, T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p.2305-2309, 1994.

NAGASAWA, T.; HIROTA, S.; TACHIBANA, K.; TAKAKURA, N.; NISHIKAWA, S.; KITAMURA, Y.; YOSHIDA, N.; KIKUTANI, H. & KISHIMOTO, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myeloopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, v. 382, p. 635-638, 1996.

NANKI, T.; LIPSKY, P.E.; Cutting Edge: Stromal Cell-Derived Factor-1 is a Costimulator for CD4+ T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, p.5011-5014, 2000.

NISHII, K., KATAYAMA, N., MIWA, H., SHIKAMI, M., MASUYA, M., SHIKU, H. & KITA, K. Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *British Journal of Haematology*, v. 105, p. 701–710, 1999.

NUSSBAUM, J. M.; GUNNERY, S.; MATHEWS, M.B. The 3'-unstranleted regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic Acid Research*, v.30(5), p.1205-12, 2002.

OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSIA, C.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J.M.; CLARK-LEWIS, I. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, v. 382, p. 833-835, 1996.

OHSHIMA, K.; TUTIYA, T.; YAMAGUCHI, T.; SUZUKI, K.; SUZUMIYA, J.; KAWASAKI, C.; HARAOKA, S.; KIKUCHI, M. Infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes around Hodgkin and Reed-Sternberg (H & RS) cells in Hodgkin disease: Relation with expression of CXCR4 and CC chemokines on H & RS cells. *The Journal of the National Cancer Institute*, v. 98, p. 567-72, 2002.

OHSHIMA, K.; KARUBE, K.; HAMASAKI, M.; SUEFUJI, H.; TUTIYA, T.; YAMAGUCHI, T.; SUZUMIYA, J.; KIKUCHI, M. Imbalances of chemokines, chemokine receptors and cytokines in Hodgkin lymphoma: classical Hodgkin lymphoma vs. Hodgkin-like ATLL. *The Journal of the National Cancer Institute*, v.106 (5), p. 706-12, 2003.

OLIVEIRA, R.A.G.; FARAH, C.A.; POLI-NETO, A. Classificação das Leucemias Agudas: da Morfologia à Biologia Molecular. *Newslab*, edição 55, 2002.

OSMAN, F.; JARROUS, N.; BEM-ASOULI, Y.; KAEMPFER, R. A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Gene Development*, v. 13(24), p.3280-3293, 1999.

OTO, M.; MIYAKE, S. & YUASA Y. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Annals of Biochemistry*, v. 213, p.19-22, 1993.

PEACOCK, JAMES; JAMES W.; JIRIK, FRANK R. TCR Activation Inhibits Chemotaxis Toward Stromal Cell-Derived Factor-1: Evidence for Reciprocal Regulation Between CXCR4 and the TCR. *The Journal of Immunology*, p:215 –223, 1999.

PELED A.; HARDAN I.; TRAKHTENBROT, L.; GUR, E.; MAGID, M.; DARASH-YAHANA, M.; COHEN, N.; GRABVSKY, V.; FRANITZA, S.; KOLLET, O.; LIDER, O., ALON, R.; RECHAVI, G.; LAPIDOT. Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells*, p.259-266, 2002.

PETIT, I.; SZYPER-KRAVITZ, M.; NAGLER, A.; LAHAV, M.; PELED, A.; HABLER, L.; PONOMARYOV, T.; TAICHMAN, R. S.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; FUJII, N.; SANDBANL, Z. D.; LAPIDOT, T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*, v. 3 (8), p.787, 2002.
PREMACK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Medicine*, v. 2, p. 1174-1178, 1996.

POPPEMA, S.; POTTERS, M.; VISSER, L.; VAN DER BERG, A. M. Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology*, v.9, Suppl 5; 521-4, 1998.

POPPEMA, S.; VAN DER BERG, A. Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Seminars in Cancer Biology*, v. 10, p.345-50, 2000.

PUI, C.H.; BEHM, F.G.; CRIST, W.M. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 82 (2), p.343-362, 1993.

PUI, C.H. Childhood leukemias. *New England Journal of Medicine*, v. 332 (24): p. 1618-1630, 1995.

PUI, C.H.; CRIST, W.M. *Acute lymphoblastic leukemia*. . In:PUI, C.H. Childhood leukemias. 1 ed. Cambridge University Press. Cap 14, p.288-312, 1999.

RABKIN, C.S.; YANG, Q.; GOEDERT, J.J.; NGUYEN, G.; MITSUYA, H.; SEI S. Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*, v. 93, p.1838-1842, 1999.

ROSSI D, ZLOTNIK A. The Biology of chemokines and their receptors. *Annual review immunology*, v. 18, p. 217-42, 2000.

ROT, A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunology Today*, v. 13, p. 291-294, 1992.

ROTHERBERG, M. E.; JIRIK, P. Target disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen- induced tissue eosinophilia. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, p. 785-790, 1997.

ROWAN, R.M. Immunophenotyping in diagnosis of acute leukaemias. *Journal of Clinical Pathology*, v. 47, p. 777-781, 1994.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper cells. *Science*, v. 277, p. 2005-2007, 1997.

SANDER, D.P.; ROSS, J.A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Seminars in Oncology*, v. 24 (1): p.3-16, 1997.

SARAFI, M.N., GARCIA-ZEPEDA, E.A., MACLEAN, J.A., SHARO, I.F., LUSTER, A.D.. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, p. 99-109, 1997.

SAWYERS, C.L. Molecular genetics of acute leukaemia. *Lancet*, v. 349, p. 196-200, 1997.

SCHROPPEL, B. The impact of Polymorphisms in Chemokine and Chemokine Receptors on Outcomes in Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*, v. 2 (7), p. 640-645, August, 2002.

SCKIDO, N., MUKAIDA, N., HARADA, A., NAKANISHI, I., WATANABE, Y., MATSUSHIMA, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*, v. 365, p. 654-657, 1993.

SHARPE, R.J., BYERS, H.R., SCOTT, C.F., BAUER, S.I., MAIONE, T.E. Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor-4. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, p.848-853, 1990.

SHEN W.; BENDALL L.J.; GOTTLIEB D.J.; BRADSTOCK K.F. The chemokines receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vivo adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Experimental Hematology*, p.1439-47, 2001.

SHIROZU M, NAKANO T, INAZAWA J, TASHIRO K, TADA H, SHINOHARA T ET AL. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, v.28, p. 495-500, 1995.

SIVEKE, J. T.; HAMANN, A.; Cutting Edge: T Helper 1 and T Helper 2 Cells Respond Differentially to Chemokines. *The Journal of Immunology*, p.551-554, 1998.

SPRINGER, T. A. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. *Cell*, v. 76, p. 301-314, 1994.

STASI, R. Contribution of immunophenotypic and genotypic analysis to the diagnosis of acute leukemias. *Annals of Hematology*, v.71, p.13-27, 1995.

STEINERT, AUST, G.; KIESSLING, M.; KAMPRAD, M.; SIMCHEN, C. Reduced expression of Stromal-Derived Factor 1 in Autonomous Thyroid Adenomas and Its Regulation in Thyroid-Derived Cells. *The Journal do Endocrinology & Metabolism.*, v. 86 (7), p. 3368-3376, 2001.

STRIETER, R.M. POLVERINE, P.J., ARENBERG, D.A. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 57, p. 752-762, 1995.

SWEENEY, E. A.; PAPAYANNOPOULOU, T. Increasing in Circulating SDF-1 after Treatment with Sulfated Glycans: The Role of SDF-1 in Mobilization. *Blood*, v. 938, p.48-53, 2001.

TANAKA, Y., ADAMS, D.H., HUBSCHER, S., HIRANO, H., SIEBENLIST, U., SHAW, S.. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 (beta). *Nature*, v. 361, p. 79-82, 1993.

TANAKA, Y.; MINE, S.; FIGDOR, C.G.; WAKE, A .; HIRANO, H.; TSUKADA, J.; ASO, M.; FUJII, K.; SAITO, K.; VAN KOOYK, Y.; ETO, S. Constitutive chemokine production results in activation of leukocyte function-associated antigen-1 on adult T-cell leukemia cells. *Blood*, v. 15: 91(10), p. 3909-19, 1998.

TERUYA-FELDSTEIN, J.; TOSATO, G.; JAFFE, E.S. The role of chemokines in Hodgkin's disease. *Leukemia and Lymphoma*, v. 38 (3-4), p.363-71, 2000.

THANDLA, S.; APLAN, P.D. Molecular biology of acute lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*, v. 24(1), p.45-56, 1997.

THEKKUMKARA TJ, LINAS SL. Evidence for involvement of 3'-untranslated region in determining angiotensin II receptor coupling specificity to G-protein. *The Journal of Biochemistry*, v. 370, p.631-639, 2003.

VICARI A.P.; CAUX, C.; Chemokines in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, p.143-154, 2002.

WADA, T., TOMOSUGI, N., NAITO, T., YOKOYAMA H., KOBAYASHI, K., HARADA, A., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 180, p. 1135-1140, 1994.

WALZ, A., DEWALD, B., VON TSCHARNER, V., BAGGIOLINI, M.. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, v. 170, p. 1745-1750, 1989.

WEBER, M., UGUCCIONI, M., BAGGIOLINI, M., CLARK-LEWIS, I. DAHINDEN, C.A.. Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *Journal of Experimental Medicine*, v. 183, p. 681-685, 1996.

WEISENBURGER, D. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic. *Annals of Oncology*, v.5(suppl), p. 19-24, 1994.

WEISS, L.M.; CHAN, J. K.C.; MACLENNAN, K.; AND WARNKE, R.A. Pathology of classical Hodgkin's disease. In *Hodgkin's disease*. P.M. Mauch, J.O. Armitage, V. Diehl, R.T. Hoppe, L.M. Weiss, editors. Lippencott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA 1-120,1999.

WINKLER C., MODI, W., SMITH, M.W., NELSON, G.W., WU, X., CARRINGTON, M., DEAN, M., HONJO, T., TASHIRO, K., YABE, D., BUCHBINDER, S., VITTINGHOFF, E., GOEDERT, J.J., O'BRIEN, T.R., JACOBSON, L.P., DETELS, R., DONFIELD, S., WILLOUGHBY, A., GOMPERTS, E., VLAHOV, D., PHAIR, J., O'BRIEN, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, v.118, p. 681-688, 1998.

WOLPE, S.D., DAVATELIS, G., SHERRY, B., BEUTLER, B., HESSE, D.G., NGUYEN, H.T., MOLDAWER, L.L., NATHAN, C.F., LOWRY, S.F., CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *Journal of Experimental Medicine*, v. 167, p. 570-581, 1988.

YAWATA, Y. *Atlas de Doenças Hematológicas*. São Paulo, Editora Manole, 1998.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S. *et al.* Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, p. 9233-9237, 1987.

YUN, H.J.; JO, D.Y. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *Journal of Korean Medicine Sciences*, v. 18, p.679-685, 2003.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, v.12, p.121-127, 2000.