



Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar



Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil



Thomas
Jefferson
University

Jefferson
Medical
College

Thomas Jefferson Medical College

*Estudo do gene CD56 em doentes com Leucemia
Crónica de Células Natural Killer CD56 negativas*

Tese de Mestrado de:

Alexandra Paula Roxo Estevinho

Porto, 2004

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil

Thomas Jefferson Medical College

***Estudo do gene CD56 em doentes com Leucemia
Crónica de Células Natural Killer CD56 negativas***

Tese de Mestrado de:

Alexandra Paula Roxo Estevinho

Porto, 2004

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil

Thomas Jefferson Medical College

Mestrado em Oncologia

*Estudo do gene CD56 em doentes com Leucemia
Crónica de Células Natural Killer CD56 negativas*

*Dissertação apresentada pela licenciada
Alexandra Paula Roxo Estevinho, como
parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre em Oncologia, sob a
orientação do Prof. Doutor José Manuel
Cabeda e a co-orientação da Doutora
Margarida Lima*

Porto, 2004

Agradecimentos

Deixo aqui expressos os meus agradecimentos a todos aqueles que de uma forma ou de outra, comigo colaboraram tornando possível a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Doutor José Manuel Cabeda, pela disponibilidade que sempre me dispensou e pela forma clara, correcta e cordial com que sempre me orientou durante o trabalho laboratorial e na elaboração da tese.

À Doutora Margarida Lima, que tornou possível este trabalho. A ela devo a ideia do projecto aqui apresentado, o material de estudo nele utilizado, os dados clínicos dos doentes, a sua caracterização imunofenotípica, bem como a orientação durante a execução do trabalho e a elaboração da tese. Agradeço ainda a sua disponibilidade e simpatia.

À Dra. Luciana Pinho, pela sua afabilidade, disponibilidade e pelo incentivo e acolhimento que sempre me prestou, contribuindo assim para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Dr. Benvindo Justiça e ao Dr. Pinto Ribeiro, por terem tornado possível a realização deste trabalho.

Ao Dr. José Miguel Oliveira e à Dra. Mónica Pereira, meus colegas e queridos amigos, sem os quais não teria sido possível a conclusão deste trabalho e que muitas horas do seu tempo sacrificaram para me auxiliarem a levar a bom termo a sequenciação.

À Dra. Maria Luís Amorim e à Dra. Cristina Bacelar Correia, pelo encorajamento, companheirismo e carinho que sempre me ofereceram e que nunca esquecerei.

Aos colegas de mestrado, em especial à Dra. Cláudia Baptista e à Dra. Sandra Costa, pelas boas recordações e amizade.

Aos familiares e amigos que me acompanharam durante todo este projecto, em especial aos meus Pais e às minhas amigas Maria João Maciel, Maria Teresa Cunha, Joana Barbosa e Maria Helena Maciel, que apesar de longe consegue estar sempre presente.

Deixo ainda um obrigado a todos os que comigo trabalharam e me auxiliaram neste projecto.

Resumo

Em doentes com Leucemia Crónica de Células Natural Killer, havia sido identificada uma população, que para além de apresentar um fenótipo de activação aberrante nas células Natural Killer, tinha ausência de expressão da molécula “Neural Cell Adhesion Molecule-1” (NCAM-1 ou CD56), na superfície celular das mesmas.

Durante os estudos que identificaram a população de doentes CD56 negativa, resultados seropositivos haviam evidenciado uma associação entre a ocorrência de infecções víricas e o desenvolvimento de Leucemia Crónica de Células Natural Killer. Para confirmar esta associação, investigou-se por técnicas de PCR, a presença de genoma viral, pertencente ao Herpes Simplex-1/2, Human Herpes Vírus-6, Citomegalovirus, Epstein-Barr Vírus e Human T-Cell Lymphotropic Vírus Type-1. Os resultados foram negativos para todos os agentes com a excepção do Human T-Cell Lymphotropic Vírus Type-1, presente num dos doentes estudados. Concluiu-se, assim que se a presença de agentes virais for necessária para a iniciação da expansão clonal, não o será para que esta se mantenha.

Com o objectivo de determinar possíveis alterações clonais no gene CD56 que explicassem a ausência de expressão da NCAM-1 à superfície celular, foi analisado por RT-PCR a expressão do mRNA da isoforma de 140 KDa desta proteína, e foram sequenciadas 17 regiões codificantes do respectivo gene. Nenhum dos doentes estudados para a presença de mRNA da NCAM-1, apresentou resultados que confirmassem a sua síntese, explicando assim a ausência de expressão do CD56 na superfície celular, com fenómenos a nível do gene. A sequenciação de 17 regiões codificantes do gene CD56, permitiu identificar, como marcadores de clonalidade, um novo “Single Nucleotide Polymorphism” (SNP) ainda não descrito na literatura, para três dos doentes envolvidos no estudo, e uma possível translocação entre o cromossoma 5 e o cromossoma 11, para um dos doentes. A natureza do promotor do gene CD56, rico em ilhas CpG e a localização do novo SNP, sugerem que alterações nos padrões de metilação e na estrutura da cromatina poderão estar envolvidos na tumorigénese das células Natural Killer.

Abstract

A population of patients diagnosed with Chronic Natural Killer Cell Leukemia, has been characterized as having an aberrant phenotype and absence of Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1 or CD56) for the Natural Killer cells.

During the studies that had identified the CD56 negative patient population, positive seroactivity results had lead to the association between viral infection and development of Chronic Natural Killer Cell Leukemia. To confirm this association, PCR methods were used for testing the presence of viral genome, from the Herpes Simplex-1/2, Human Herpes Virus-6, Cítomegalovirus, Epstein-Barr Virus and Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1. The results were negative for all viral agents in all patients, with an exception for the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1 that was present in one of the patients. This leads to the conclusion that the presence of viral agents seems to be necessary for the initiation of the expansion, but not for its maintenance.

Aiming to identify possible clonal alterations in the CD56 gene that could explain the absence of NCAM-1 molecule in the cell suffice, the 140 KDa isoform mRNA of this protein, was analysed by RT-PCR, and 17 coding regions of this gene, were sequenciated. None of the patients studied for the NCAM-1 mRNA, had positive results that might confirm it synthesis, explaining this way that the absence of the CD56 molecule in the cell surface, is done to alterations in the gene. The sequencing of the 17 coding regions of the CD56 gene, made possible the identification of two clonal markers: a new single nucleotide polymorphism (SNP), never described before, in three of the patients studied; and a possible translocation involving the chromossomes 5 and 11, in one of the patients studied. The nature of the CD56 promotor, rich in CpG islands and the localization of the new SNP, suggests that the altered patterns of DNA methylation and chromatin structure might be involved in the tumour genesis of Natural Killer cells.

Índice

Abreviaturas _____	VII
Índice de Figuras _____	VIII
Índice de Tabelas _____	IX

Capítulo I - Revisão Bibliográfica

1.1. Linfomas Não Hodgkin _____	2
1.1.1. Definição _____	2
1.1.2. Os Sistemas de Classificação _____	3
1.1.3. Epidemiologia dos Linfoma Não Hodgkin _____	4
1.1.4. Etiologia dos Linfomas Não Hodgkin _____	6
1.1.5. A Importância da Biologia Molecular e da Genética Molecular nos Linfomas Não Hodgkin _____	7
1.1.5.1. Mecanismos de Lesões Genéticas em Linfomas Não Hodgkin _____	9
1.1.5.1.1 Translocações Cromossômicas _____	9
1.1.5.1.2. Delecções _____	11
1.1.5.1.3. Mutações Pontuais _____	11
1.1.5.1.4. Vírus Oncogénicos _____	11
1.2. Neoplasias das Células Natural Killer _____	13
1.2.1. A Célula Natural Killer _____	13
1.2.1.1 A Biologia das Células Natural Killer _____	13
1.2.1.2. Ontogénese e Diferenciação da Células Natural Killer _____	14
1.2.1.3. Funções das Células Natural Killer _____	17
1.2.1.3.1. Reconhecimento pelas Células Natural Killer de Células Infectadas _____	17
1.2.1.3.2. Funções Efectoras das Células Natural Killer _____	19
1.2.1.4. A Relação entre Citocinas e Células Natural Killer _____	20
1.2.2. Doenças Linfoproliferativas das Células Natural Killer _____	21
1.2.2.1. Subtipos de Linfomas de Células Natural Killer _____	21
1.2.2.2. Leucemia Crónica de Células Natural Killer - Large Granular Lymphocytes _____	21
1.2.2.3. Patogénese da Leucemia Crónica de Células Natural Killer - Large Granular Lymphocytes _____	22
1.2.2.4. Tratamento das Neoplasias das Células Natural Killer _____	23

<i>1.2.2.5. Novas Terapias nos Neoplasmas de Células Natural Killer</i>	24
<i>1.3. A Neural Cell Adhesion Molecule-1 (CD56)</i>	25
<i>1.3.1. Função da NCAM-1 (CD56)</i>	25
<i>1.3.2. Distribuição Celular e Tecidual da NCAM-1 (CD56)</i>	26
<i>1.3.3. Estrutura da NCAM-1 (CD56)</i>	27
<i>1.3.4. Mecanismos de Regulação da Actividade da NCAM-1 (CD56)</i>	28
<i>1.3.5. Estrutura do Gene da NCAM-1 (CD56)</i>	29

Capítulo II- Introdução e Objectivo

<i>2.1. Introdução</i>	33
<i>2.2. Objectivo</i>	35

Capítulo III- Material e Métodos

<i>3.1. População de Doentes em Estudo</i>	37
<i>3.2. Colheita e Processamento das Amostras</i>	37
<i>3.3. Diagnóstico Histológico e Imunofenotípico</i>	37
<i>3.4. Extracção de Ácidos Nucleicos das Amostras</i>	38
<i>3.4.1. Extracção de DNA</i>	38
<i>3.4.2. Extracção de RNA</i>	38
<i>3.5. Pesquisa de Genoma Viral nas Amostras</i>	38
<i>3.5.1. Pesquisa do Genoma dos Vírus Herpes Simplex-1/2 (HSV-1/2), Human Herpes-6 (HHV-6) e Citomegalovírus (CMV)</i>	38
<i>3.5.2. Pesquisa do Genoma dos Vírus Epstein-Barr (EBV) e Varicella Zooster (VZV)</i>	39
<i>3.5.3. Pesquisa do Genoma dos Vírus Human T-Cell Lymphotropic (HTLV-I)</i>	39
<i>3.6. Caracterização Genética do Gene CD56 da População de Doentes em Estudo</i>	40
<i>3.6.1. Amplificação dos Exões do Gene CD56 por PCR</i>	40
<i>3.6.2. Sequenciação dos Exões do Gene CD56</i>	41
<i>3.6.3. Estudo da Frequência do SNP (Single Nucleotide Polymorphism) numa População de Dadores de Sangue</i>	42
<i>3.7. Estudo do Transcrito Correspondente à Isoforma de 140 KDa da NCAM-1, na População de Doentes em Estudo</i>	43
<i>3.7.1. Transcrição Reversa do mRNA Extraído</i>	43

3.7.2. Amplificação do Transcrito da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase _____	43
3.7.3. Amplificação do Transcrito da Isoforma 140 KDa NCAM-1 _____	44

Capítulo IV- Resultados

4.1. Pesquisa de Genoma Viral nas Amostras _____	46
4.2. Estudo do Transcrito Correspondente à Isoforma de 140 KDa da NCAM-1 ____	47
4.3. Caracterização Genética do Gene CD56 da População em Estudo _____	48
4.3.1. Amplificação dos Exões do Gene CD56 por PCR _____	48
4.3.2. Análise por Sequenciação dos Exões do Gene CD56 _____	49

Capítulo V - Discussão

Discussão _____	72
-----------------	----

Capítulo VI- Conclusão

Conclusão _____	79
-----------------	----

Bibliografia

Bibliografia _____	81
--------------------	----

Abreviaturas

ATL, Adult T Cell Leukemia/Lymphoma

CMV, Citomegalovirus

DNA, Desoxiribonucleic Acid

EBV, Epstein-Barr Virus

FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer

GPI, Glycosylphosphatidyl Inositol

HHV-6, Human Herpes Virus-6

HHV-8, Human Herpes Virus-8

HSV-1/2, Herpes Simplex-1/2,

HTLV-I, Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1

IL, Interleucina

INF, Interferão

ITAMs, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs

ITIMs, Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs

KIR, Killer Inhibition Receptor

LGL, Large Granular Lymphocyte

LNH, Linfoma Não Hodgkin

MHC, Major Histocompatibility Complex

NCAM-1, Neural Cell Adhesion Molecule-1

NK, Natural Killer

PCR, Polymerase Chain Reaction

PSA, Polisialic Acid

RB, Retinoblastoma

RT-PCR, Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction

RNA, Ribonucleic Acid

SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNP, Single Nucleotide Polymorphism

SCF, Stem Cell Factor

TCR, T-Cell Receptor

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Modelo representativo da diferenciação das células T e NK no timo. _____	16
<i>Figura 2.</i> Representação da molécula NCAM-1, expressa na superfície das NK. _____	27
<i>Figura 3.</i> Esquema representativo da correspondência entre cada um dos domínios da molécula NCAM-1 e os exões do gene CD56 que o codificam. _____	29
<i>Figura 4.</i> Curvas de amplificação dos PCR em tempo real para a pesquisa de genoma viral nas amostras em estudo. _____	46
<i>Figura 5.</i> Amplificação do transcrito da glicose-6-fosfato desidrogenase, a partir do cDNA dos doentes em estudo. _____	47
<i>Figura 6.</i> Amplificação do transcrito da isoforma 140 KDa a partir dos doentes em estudo. _____	47
<i>Figura 7.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 1 do gene CD56. _____	50
<i>Figura 8.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 2 do gene CD56. _____	51
<i>Figura 9.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 3 do gene CD56. _____	52
<i>Figura 10.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 4 do gene CD56. _____	53
<i>Figura 11.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 5 do gene CD56. _____	54
<i>Figura 12.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 6 do gene CD56. _____	55
<i>Figura 13.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 7 do gene CD56. _____	56
<i>Figura 14.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 8 do gene CD56. _____	57
<i>Figura 15.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 9 do gene CD56. _____	58
<i>Figura 16.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 10 do gene CD56. _____	59
<i>Figura 17.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 11 do gene CD56. _____	60
<i>Figura 18.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 12 do gene CD56. _____	61
<i>Figura 19.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 13 do gene CD56. _____	62
<i>Figura 20.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 14 do gene CD56. _____	63
<i>Figura 21.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 15 do gene CD56. _____	64
<i>Figura 22.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 16 do gene CD56. _____	65
<i>Figura 23.</i> Resultados da amplificação e sequenciação do exão 18 do gene CD56. _____	66
<i>Figura 24.</i> Resultados da sequenciação do exão 13 do gene CD56, para as amostras 32, 33 e 34. _____	67
<i>Figura 25.</i> Detecção do polimorfismo presente no nucleótido 273865, das amostras 32, 33 e 34, por análise de melting no sistema de PCR em tempo real Light Cycler. _____	68
<i>Figura 26.</i> Alinhamento das sequências obtidas para o dador e o doente 32. _____	69
<i>Figura 27.</i> Imagem do resultado obtido para o blast da sequência com o primer do exão 18, para a amostra 32. _____	70

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1.</i> Translocações cromossômicas nos Linfomas Não Hodgkin. _____	10
<i>Tabela 2.</i> Localização genômica dos 18 exões da NCAM-1, no gene CD56 (contig NT_035088.1). _____	31
<i>Tabela 3.</i> Sequência dos primers forward e reverse e temperaturas de hibridização, usados na amplificação de cada um dos exões do gene CD56. _____	41
<i>Tabela 4.</i> Resultados obtidos, após o estudo por PCR e sequenciação dos exões do gene CD56. _____	49

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1.1. Linfomas Não Hodgkin

1.1.1. Definição

As células normais do ser humano crescem, dividem-se e morrem de uma forma ordenada. Nos primeiros anos de vida as células normais dividem-se com uma frequência elevada, mas ao atingir a idade adulta a frequência de divisão decresce e a maioria das células apenas se divide para substituir células que morrem ou para regenerar tecidos alvo de ferimento. No entanto, por vezes, o material genético de uma célula normal é danificado, levando a transformações no normal desenvolvimento da célula, que se podem traduzir na desregulação da divisão celular e/ou aumento da longevidade da célula. As células que sofrem esta transformação designam-se por células cancerígenas e desenvolvem um cancro no órgão de que fazem parte (Alberts et al, 1998a).

Os linfócitos são células do sistema imunológico, que participam na defesa do organismo contra agentes infecciosos e células tumorais. Estas células são produzidas nos tecidos linfáticos e como constituintes da linfa e sangue, circulam nos vasos linfáticos e sanguíneos, através de todo o corpo (Alberts et al, 1998b). Quando estas células se transformam em células cancerígenas (linfócitos malignos), que não controlam a divisão e se multiplicam descontroladamente, originam um tipo de cancro que tem o nome de linfoma ou leucemia. O linfoma atinge os órgãos e tecidos que constituem o sistema linfático e que incluem os nódulos linfáticos, timo, baço, amígdalas e adenóides, medula óssea e os tecidos do trato gastro-intestinal (Alberts et al, 1989a).

O termo linfoma abrange mais de quarenta tipos de cancros, que podem ser classificados em diferentes grupos, conforme as suas características. Dois grandes grupos generalistas podem ser considerados quando falamos de linfomas; linfomas que pertencem ao grupo dos Linfomas de Hodgkin e linfomas que pertencem ao grupo dos Linfomas Não Hodgkin (LNH). O grupo do linfoma de Hodgkin engloba todos os linfomas que têm origem nos nódulos do sistema linfático, enquanto que o grupo dos LNH engloba os linfomas que têm origem em qualquer um dos órgãos do sistema linfático (Harris et al, 1994 e Harris et al, 1999).

Nas últimas décadas do século XX, a tecnologia, em áreas como a imunologia e a genética molecular, permitiu realizar várias descobertas no campo da patogénese dos

Linfomas Não Hodgkin (LNH). No presente, sabemos que os LNH surgem quando um linfócito B (célula B), um linfócito T (célula T) ou uma célula Natural Killer (NK) sofre uma transformação maligna, dando início a um processo de multiplicação descontrolado que produz cópias idênticas entre si, formando um clone maligno nos tecidos linfáticos que, na ausência de tratamento pode espalhar-se a todo o organismo (De Vita et al, 2001).

1.1.2. Os Sistemas de Classificação

Dentro da classe dos LNH, os linfomas podem agrupar-se em várias subclasses, dependendo de um conjunto de características que lhes são comuns. Os sistemas de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Revised European-American Lymphoma (REAL) dividem os LNH (segundo a origem da célula maligna) em linfomas B, quando a célula transformada é o linfócito B, linfoma T ou NK quando as células transformadas são o linfócito T ou a célula NK e linfoma de células precursoras quando a célula transformada é linfoblástica ou tímica (Harris et al, 1994 e Harris et al, 1999).

Perante estes sistemas de classificação, conhecer a histogénese de um linfoma é fundamental para determinar em que grupo de LNH deve ser incluído. Mas nem sempre a classificação foi realizada segundo os critérios agora vigentes; até aos anos 80, sistemas como o Working Formulation eram usados para a classificação das neoplasias. Nestes sistemas de classificação as características morfológicas do tecido neoplásico e os dados clínicos constituíam praticamente a única informação disponível para a identificação das neoplasias. Esta situação acarretava alguns problemas, como por exemplo, não permitir a distinção entre uma proliferação reactiva e uma proliferação neoplásica, ou permitir o agrupamento numa mesma sub-classe de doenças biologicamente distintas. Assim durante muitos anos as neoplasias das células NK foram descritas como pertencentes ao grupo de LNH de grau intermédio, sem serem reconhecidas como diferentes das neoplasias das células T, devido às suas semelhanças morfológicas e funcionais (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

A partir dos anos 80, a expansão de áreas como a citogenética, a citometria de fluxo e a biologia molecular permitiram o acesso a um conjunto de informações que

hoje são indispensáveis para a avaliação das neoplasias hematológicas. A identificação das neoplasias, hoje em dia, é feita tendo em conta os dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genotípicos (Arber, 2000).

A análise citogenética e a caracterização molecular dos cariótipos de muitas células malignas, de diferentes tipos de LNH permitiu identificar uma série de genes que se encontram alterados nestas células. As alterações nestes genes foram inicialmente apontadas como causa para a transformação maligna dos linfócitos, hipótese depois confirmada, por serem capazes de induzir tumores em modelos animais transgênicos (De Vita et al, 2001). Para além da identificação das anomalias genéticas que contribuem para a transformação neoplásica, a caracterização molecular mostrou também que as alterações genéticas identificadas estavam selectivamente associadas a um determinado tipo de LNH. Esta descoberta teve uma grande importância para o diagnóstico diferencial e para o melhoramento do sistema de classificação de linfomas (Arber, 2000 e Greer et al, 2001).

1.1.3. Epidemiologia dos Linfomas Não Hodgkin

Na Europa estima-se que em cada ano, um número de pessoas compreendido entre os 7000 e os 7500 venham a desenvolver LNH, e que aproximadamente 3450 venham a falecer devido a esta neoplasia (<http://www.lymphoma.org/site.htm>). Segundo os dados da International Agency for Research in Cancer (IARC), datados de 1997, a taxa de incidência do LNH na Europa (padronizada a idade e população da União Europeia) é de 15,4/100.000 e a taxa de prevalência aos 5 anos, de 43,7/100.000. Em Portugal, segundo esta mesma base de dados, a taxa de prevalência aos 5 anos (padronizada a idade e a população da União Europeia) é ligeiramente inferior à europeia (40,4/100.000). As taxas de maior incidência registam-se nos Estados Unidos da América, Europa e Austrália, sendo as taxas mais baixas pertencentes aos países asiáticos (Rabkin et al, 1993 e Seow et al, 1996).

O LNH é mais frequente nos indivíduos do sexo masculino do que nos do sexo feminino. Na Europa a taxa de incidência (padronizada para a idade e população padrão da União Europeia) do LNH nos homens é de 9,5/100.000, enquanto que nas mulheres é de 5,9/100.000 (<http://www-dep.iarc.fr/ener1/eun.htm>). No entanto existem locais

anatômicos, como por exemplo a tiróide, em que a taxa de incidência do LNH pode ser mais elevada nas mulheres (Greiner et al, 1995).

O LNH é pouco comum nas crianças, surge normalmente em pessoas de meia idade ou de idade avançada, sendo os 57 anos a idade apontada como a média nestas neoplasias (<http://www.lymphoma.org/site.htm>). A incidência dos LNH aumenta com a idade e atinge valores máximos aos 80 anos. Para doentes com idades superiores aos 65 anos, as taxas de incidência triplicam de valor (Hartge et al, 1994). Assim sendo, é de esperar que, à medida que a população envelhecida aumenta, as taxas de incidência aumentem também. Na Europa registou-se durante os anos de 1985 a 1992 um aumento da taxa de 4,8% por ano (Cartwright et al, 1999), sendo nos dias de hoje, o risco de um indivíduo vir a desenvolver um LNH de 2,8% (Ries et al, 1999).

O aumento do registo de casos de LNH abrange todos os tipos histológicos de LNH (Greiner et al, 1995 e Ries et al, 1999). Mas os linfomas mais agressivos registaram um maior aumento dentro do grupo dos LNH (Rabkin et al, 1993 e Ries et al, 1999). A incidência dos linfomas extranodais aumentou muito, quando comparada com os linfomas nodais (Hartge et al, 1994; Rabkin et al, 1993 e Ries et al, 1999). Dentro do grupo dos LNH, as neoplasias das células NK são as mais raras, representando menos de 15% dos LNH no Ocidente (Chan, 1992).

A distribuição geográfica dos subtipos histológicos do LNH não é homogênea ao longo do globo. O Linfoma de Burkitt, por exemplo, é muito frequente em crianças da África Equatorial (Ziegler, 1981), o linfoma gástrico tem grande incidência no nordeste da Itália (Doglioni et al, 1992), o Linfoma de Células T/NK Nasal é muito comum na China, a Leucemia Indolente NK - Large Granular Lymphocyte (LGL) regista maiores taxas de incidência na Europa e EUA do que em outras regiões, alguns linfomas intestinais surgem com elevada frequência no Médio Oriente e a Leucemia/Linfoma de Células T é muito comum no sudoeste japonês (Anderson et al, 1998).

A mortalidade dos LNH também tem registado um aumento gradual nos últimos anos, embora este seja mais lento do que aquele que se verificou para a incidência (Ries et al, 1999). A taxa de mortalidade na Europa é mais elevada para os indivíduos do sexo masculino (4,01/100.000) do que para os do sexo feminino (2,5/100.000). A mortalidade dos LNH é aproximadamente 20% mais elevada nas áreas urbanas do que nos meios rurais e também mais elevada nos países mais desenvolvidos (Rabkin et al, 1993).

As causas responsáveis pelo grande crescimento da incidência dos LNH não são ainda consensuais. Alguns investigadores apontam as novas técnicas de imunologia e biologia molecular, que permitem melhoramentos nos sistemas de classificação, como sendo responsáveis pelo aparecimento de casos de doentes com LNH a quem anteriormente tinha sido diagnosticada uma outra doença (Rabkin et al, 1993). As novas técnicas de diagnóstico, menos evasivas, que permitem um aumento das tentativas de diagnóstico são também apontadas como responsáveis pelo aumento de incidência dos LNH. Também o envelhecimento da população, como já foi referido, e factores como a SIDA, são considerados como causas do aumento da incidência dos LNH. No entanto, os factores mencionados, contribuem numa modesta extensão para o aumento dos casos de LNH e por isso muitos investigadores sugerem juntar a estes a exposição a um agente ambiental nocivo (Dinsen et al, 1999).

1.1.4. Etiologia dos Linfomas Não Hodgkin

As causas que podiam levar ao desenvolvimento de um LNH, são para a maioria dos diferentes tipos histológicos de LNH desconhecidas. Alguns tipos de LNH supõe-se que surjam devido a uma susceptibilidade genética familiar. Existem relatos de casos em que familiares ou parentes de indivíduos com LNH ou outras doenças hematológicas mostram um maior risco para o LNH (Lynch et al, 1992). No entanto, há que ter em atenção nestes casos que o aumento de risco pode também ser o resultado da exposição comum aos mesmos agentes ambientais (Siebert et al, 1997). Os agentes infecciosos de origem vírica também surgem muitas vezes associados aos LNH e por isso são também considerados como possíveis causas do desenvolvimento do linfoma. O vírus Epstein-Barr (EBV) surge em 95% dos casos de Linfoma de Burkitt endémico (zur Hausen, 1991) e este vírus parece alterar o gene do c-myc, gene este que é associado ao linfoma referido (Shiramisu et al, 1991). Nos Linfomas de Células NK Nasal o vírus HBV surge entre 80 a 100% dos casos e nos Linfomas de Células NK Tipo Nasal entre 15 a 45% dos casos (Sasaki et al, 2000). O vírus EBV pode também contribuir para o desenvolvimento de outros tipos de LNH visto que ele contribui para a instabilidade do material genético. O virus Human T-Cell Leukemia Vírus Type I (HTLV-1) também se encontra associado a um tipo particular de linfoma, o “Adult T Cell Leukemia/Lymphoma” (ATL) e pode induzir o linfoma através de uma proteína

codificada no seu genoma, que é um potente activador da transcrição (Wano et al, 1988). Um outro vírus associado ao LNH é o human herpesvírus-8 (HHV-8). Este vírus aparece associado com o EBV em linfomas de efusão primária. Não se sabe qual o mecanismo que utiliza para transformar as células, mas já foi proposto que ele será necessário para que o EBV consiga transformar as células dos doentes com o tipo de linfoma referido (Nador et al, 1996). O HCV é mais um vírus associado com o aparecimento de LNH. O HCV surge em linfomas como o Linfoma Monocitoide de Células B e embora não lhe sejam atribuídas características oncogénicas, a estimulação permanente dos linfócitos, por parte do RNA do HCV pode provocar a proliferação clonal (Dammacco et al, 1998). Por último, registe-se também o agente bacteriano *Helicobacter pylori*, como agente infeccioso associado com o LNH. Tal como no caso do HCV, o *H. pylori* vai produzir uma estimulação permanente de clones de células B, como resposta à infecção crónica por ele criada (Zucca et al, 1998).

Existem determinadas ocupações onde o risco de LNH foi identificado como sendo elevado (Scherr et al, 1992). Estas ocupações incluem os agricultores e os trabalhadores florestais, que frequentemente lidam com agentes químicos e estão expostos a agentes infecciosos. Os solventes orgânicos e as altas concentrações de nitratos na água também foram associados a um aumento de risco do LNH (Scherr et al, 1992). A dieta é um outro factor que tem peso como factor de risco. Estudos provaram que uma dieta rica em gorduras e com elevado consumo de carne, aumenta para o dobro o risco de LNH (De Stefani et al, 1998). O consumo de drogas e o tabaco também estão associados a um aumento de risco de LNH bem como o facto de um indivíduo já ter sido sujeito a tratamento de Linfoma de Hodgkin (Nelson et al, 1997).

1.1.5. A Importância da Biologia e da Genética Molecular nos Linfomas Não Hodgkin

Do ponto de vista clínico, as lesões genéticas dos LNH, representam marcadores moleculares da doença que servem quatro propósitos: (1) ajudam o diagnóstico morfológico; (2) são indicadores do diagnóstico em alguns casos; (3) permitem a avaliação da doença residual mínima, usando tecnologia altamente específica e muito sensível; (4) fornecem alvos para a terapia molecular.

No que diz respeito ao diagnóstico, o uso das lesões genéticas como marcador de subclasses de LNH é justificado pela associação selectiva que existe entre uma determinada lesão genética e uma categoria específica de LNH (Harris et al, 1994 e Harris et al, 1999). O crescimento do conhecimento da patologia molecular do linfoma, irá progressivamente delimitar o caminho para a classificação destas doenças. Idealmente, grupos de linfomas geneticamente distintos devem ser considerados como doenças distintas, que requerem diferentes opções terapêuticas (Greer et al, 2001).

A relevância das lesões genéticas para o prognóstico do linfoma é ainda um campo da investigação que se encontra em crescimento e que pode resultar no melhoramento significativo da terapêutica estratificada dos linfomas. Embora várias alterações genéticas tenham sido propostas como importantes no prognóstico de categorias específicas de linfomas, a aplicação de novas tecnologias de DNA (Deoxiribonucleic Acid), nomeadamente os microarrays, poderão rapidamente expandir os marcadores disponíveis para estudos de prognóstico. Por exemplo a aplicação de microarrays de DNA na “Difuse Large Cell Leukemia” permitiu o reconhecimento de diferentes variantes da doença, com diferentes respostas à terapia e taxa de sobrevivência (Arber, 2000).

As lesões genéticas são também os marcadores mais específicos e sensíveis para a avaliação da doença residual mínima por reacção da polimerase em cadeia (PCR). A sensibilidade do PCR é muitas vezes superior à das técnicas de diagnóstico standard e permite a detecção de uma célula tumoral em 10^6 células normais. Até à data, a maioria dos estudos de doença residual foram centrados no Linfoma Folicular e demonstraram que há uma taxa de sobrevivência maior nos casos em que o PCR é negativo, por oposição aos casos que apresentam PCR positivo no estudo da doença residual mínima (Corradini et al, 1999).

Finalmente, o estudo da patogénese molecular pode fornecer alvos moleculares para estratégias terapêuticas, cujo objectivo será reverter as lesões genéticas responsáveis pelo desenvolvimento do tumor. Tal terapia deverá ser, por definição, altamente específica para as células tumorais e evitar os principais efeitos secundários, que encontramos na terapia anti-neoplásica clássica.

1.1.5.1. Mecanismos de Lesões Genéticas em Linfomas Não Hodgkin

A transformação de um linfócito normal numa célula cancerígena ocorre segundo um processo de etapas múltiplas. Durante este processo os linfócitos pertencentes a um determinado clone, vão acumulando, ao longo de gerações, lesões genéticas em protooncogenes e/ou genes de supressão tumoral que se traduzem na desregulação da divisão celular e/ou inibição da apoptose. As lesões genéticas que ocorrem nas células e os mecanismos que a elas conduzem são muito variados, mas determinadas neoplasias apresentam frequentemente determinados tipos de lesões e mecanismos, que acabam por se tornar característicos dentro de um dado grupo.

As análises citogenéticas e de biologia molecular de vários casos de linfomas mostram que na generalidade o genoma das células transformadas apresenta um número reduzido de lesões (Mitelman et al, 1997 e Gamberi et al, 1997), todas do mesmo tipo e que são comuns dentro de uma classe de LNH (Offit et al, 1991). A nível cromossómico a lesão genética mais comum é a translocação cromossómica, enquanto que a nível molecular as deleções, duplicações e as mutações pontuais de nucleótidos são as mais comuns. Para além destes mecanismos, as lesões genéticas nos LNH também podem resultar da introdução de genes virais no genoma do hospedeiro (Romana et al, 1999).

1.1.5.1.1. Translocações Cromossómicas

As translocações cromossómicas são anomalias genéticas muito frequentes nos linfomas. Estas anomalias resultam da troca recíproca de material genético entre dois cromossomas específicos, frequentemente associados a um subtipo de linfoma e têm como consequência a transformação de protooncogenes em oncogenes. Esta transformação pode ocorrer por desregulação protooncogénica ou por formação de genes quimera. No primeiro caso, um dos cromossomas “cede” uma sequência reguladora da expressão genética, que é justaposta à zona codificante do protooncogene do outro cromossoma, resultando na expressão do protooncogene (desregulação heterotípica) ou num aumento da expressão do protooncogene, caso este já fosse normalmente expresso na célula (desregulação homotípica). No segundo caso, a formação de um gene quimera leva ao aparecimento de uma nova proteína com actividade diferente da desempenhada por qualquer das duas proteínas codificadas pelos genes que se fundiram (Alberts et al, 1989a).

A clonagem de loci genéticos envolvidos nas translocações mais frequentemente associadas aos LNH permitiu a identificação de um número de protooncogenes

envolvidos, na formação de linfomas. A maioria destes protooncogenes codificam moléculas pertencentes à família dos factores de transcrição ou a proteínas reguladoras da apoptose e dos mecanismos de tradução de sinal, enquanto que as regiões reguladoras, que habitualmente são justapostas aos protooncogenes, foram identificadas como pertencentes a genes de receptores de antigénios, que são usualmente expressos em níveis muito altos nos linfócitos (De Vita et al, 2001).

O mecanismo que leva à translocação nos linfócitos ainda não é conhecido, enquanto uns sugerem que esta ocorra durante o rearranjo do receptor das células T (TCR) ou das cadeias das imunoglobulinas, nas células T e B, respectivamente, outros sugerem que falhas no mecanismo de reparação de DNA estão na origem das translocações (Gillert et al, 1999).

Tabela 1. Translocações cromossómicas dos Linfomas Não Hodgkin (adaptado de De Vita).

<i>Tipo Histológico de Linfoma Não Hodgkin</i>	<i>Translocação</i>	<i>Protooncogene envolvido</i>	<i>Mecanismo de Activação do Protooncogene</i>	<i>Função do Protooncogene</i>
<i>Linfoma Linfoplasmocitoide</i>	<i>t(9;14)(p13;q32)</i>	<i>PAX-5</i>	<i>Desregulação transcricional</i>	<i>Factor de transcrição regulador da proliferação e diferenciação das células B</i>
<i>Linfoma Folicular</i>	<i>t(14;18)(q32;q21); t(2;18)(p11;q21); t(18;22)(q21;q11)</i>	<i>BCL-2</i>	<i>Desregulação da transcrição</i>	<i>Regula negativamente a apoptose</i>
<i>Linfoma de origem nos tecidos linfóides-associadas à mucosa (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)</i>	<i>t(11;18)(p22;q32)</i>	<i>API-2/MLT</i>	<i>Proteína de fusão</i>	<i>Regula negativamente a apoptose</i>
	<i>t(1;14)(p22;q32)</i>	<i>BCL-10</i>	<i>Desregulação transcricional do domínio de recruta da</i>	<i>Regula a apoptose</i>
<i>Linfoma de Células do Manto</i>	<i>t(11;14)(q13;q32)</i>	<i>BCL-1/cyclin D1</i>	<i>Desregulação transcricional</i>	<i>Regula a fase inicial do ciclo celular</i>
<i>Linfoma B Difuso de Grandes Células</i>	<i>der(3)(27)</i>	<i>BCL-6</i>	<i>Desregulação transcricional</i>	<i>Repressor da transcrição envolvido no formação e função dos centros germinais</i>
<i>Linfoma de Burkitt</i>	<i>t(8;14)(q24;q32); t(2;8)(p11;q24); t(8;22)(q24;q11)</i>	<i>c-MYC</i>	<i>Desregulação transcricional</i>	<i>Factor de transcrição que regula a proliferação, a diferenciação e a apoptose</i>
<i>Linfoma T Anaplásico de Grandes Células (T-cell anaplastic large cell lymphoma)</i>	<i>t(2;5)(p23;q35)</i>	<i>NPM/ALK</i>	<i>Proteína de fusão</i>	<i>A ALK é uma tirosina cinase</i>

1.1.5.1.2. Delecções

Os LNH estão associados a delecções cromossómicas específicas, sugerindo a perda de genes de supressão tumoral ainda não conhecidos. A mais frequente destas delecções envolve o braço longo do cromossoma 6 (6q) (Mitelman et al, 1997). As observações de delecções no cromossoma 6, são a única anomalia citogenética em alguns casos de LNH (Mitelman et al, 1997) e estão associados a um mau prognóstico, indicando fortemente um papel patogénico para estas anomalias. Delecções no cromossoma 13 (13q14) são as mais frequentes lesões nas Leucemias Linfocíticas Crónicas de Células B. Estudos de mapeamento mostraram o envolvimento do gene de supressão tumoral RB1, localizado nesta zona do cromossoma 13 e sugerem a presença de um gene de supressão tumoral distinto na mesma região (Gaidano et al, 1991 e Cuneo et al, 1999). As delecções e mutações no gene de supressão tumoral p53, que são apontadas como as mais comuns alterações genéticas no cancro humano (Hollstein et al, 1991) são restritas a um pequeno subgrupo de LNH que incluem o último estágio do linfoma folicular (Gaidano et al, 1991 e Lo Coco et al, 1993).

1.1.5.1.3. Mutações Pontuais

As mutações pontuais podem alterar a sequência codificante dos protooncogenes, tal como sucede no caso do c-Myc e do BCL-2, alterando desta forma as funções das proteínas por eles codificadas (Tanaka et al, 1992 e Bhatia et al, 1993). As mutações pontuais podem também intervir a nível da regulação da expressão do protooncogene, se ela alterar a sequência reguladora deste. Nos casos dos genes c-myc e bcl-6, as mutações pontuais que afectam as sequências reguladoras dos genes, alteram a sua afinidade de ligação com os factores que regulam a expressão genética (Cesarman et al, 1987 e Migliazza et al, 1995). Mutações que activam oncogenes ainda desconhecidos podem ser um evento frequente nos LNH e a pesquisa destes, nos dias de hoje, é alvo de muitos estudos.

1.1.5.1.4. Vírus Oncogénicos

A infecção de células tumorais por vírus oncogénicos deve ser considerada como um mecanismo de lesão genética, uma vez que os vírus introduzem genes estranhos no genoma das células infectadas. Três vírus distintos estão associados com a patogénese

dos LNH: o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus Human Herpesvírus-8 (HHV-8) e o vírus Human T-Cell Leukemia Vírus Type I (HTLV-I).

O vírus EBV foi inicialmente identificado em casos de Linfoma de Burkitt endémico, em África e mais tarde foi também detectada a sua presença em formas de Linfomas de Burkitt esporádicas, associadas a síndrome da imunodeficiência adquirida (Ballerini et al, 1993). Durante a infecção do linfócito, pelo EBV o genoma do vírus é transportado para o núcleo onde existe predominantemente como uma molécula extracromossomática circular (o epissoma) (Kieffe et al, 1989). A formação destas moléculas é mediada por terminais coesivos que estão representados em número variável no genoma vírico. Devido à heterogeneidade destes terminais, o seu número num epissoma recém formado pode ser muito variável, mas é característico desse episoma e pode por isso funcionar como uma marca que é constante num clone que teve origem numa determinada célula infectada (Raab-Traub et al, 1986).

O HTLV-1 é um membro do grupo lentivírus, que pode imortalizar células T *in vitro* e que pode causar linfomas T (Ferreira et al, 1997). Ao contrário de outros retrovírus, o genoma do HTLV-1 não codifica um oncogene viral, o provírus parece integrar-se ao acaso no genoma do hospedeiro e é a produção de uma proteína viral trans-reguladora (HTLV-1 tax) que parece ser a responsável pela protogénese. Esta proteína aumenta a expressão de todos os produtos dos genes virais e activa a transcrição de certos genes do hospedeiro, entre os quais a interleucina-2 (IL-2) e a cadeia α do receptor da IL-2 (CD 25), o c-sis, c-fos e o factor estimulador de colónias granulócito-macrófago (Cross et al, 1987 e Wano et al, 1988). O papel central destes genes na activação e crescimento da célula T e as evidências experimentais sustentam a ideia que a activação destes genes por intermédio da Tax é um mecanismo importante na transformação neoplásica das células T (Arima et al, 1997). A Tax foi também apontada como mediadora de lesões no DNA, que resultaram na inactivação do checkpoint p53, ou na repressão das funções de reparação de DNA (Uittenbogaard et al, 1995 e Jeang et al, 1990).

1.2. Neoplasias das Células Natural Killer

A classificação das neoplasias NK, tal como é descrita nos sistemas OMS e REAL, é baseada em princípios estabelecidos por Lukes e Collins, nos Estados Unidos da América e por Lennert na Europa, nos anos 70 (Lymphoma Study Group, 1991). Os princípios vigentes no sistema Working Formulation (WF) formulado nos anos 80 não reconheciam os linfomas NK. Por este motivo, muitas doenças que têm biologia diferente, estavam agrupadas na mesma subclasse. A semelhança das células NK com as células T a nível funcional e morfológico dificultava a identificação das neoplasias das células NK como entidades diferentes.

Nas duas últimas décadas a caracterização imunofenotípica e genotípica das células NK, a determinação da sua ontogénese e a associação de um considerável número de dados clínicos e morfológicos, permitiu diferenciar as neoplasias das células NK das neoplasias das células T. Estas caracterizam-se por um fenotipo $CD56^+$, $CD3^-$ e geralmente $CD16^+$; não expressam receptores da imunoglobulina ou TCR, nem realizam o rearranjo dos genes que codificam as cadeias destas moléculas; expressam as proteínas citotóxicas TIA-1, granzyma B e perforina (excepto no caso das neoplasias das células imaturas) e têm presentes no seu citoplasma grânulos azurofilos (excepto no caso das neoplasias das células imaturas).

Embora se tenham identificado e caracterizado algumas das neoplasias que pertencem ao grupo das neoplasias com origem em células NK, como é o caso dos Linfomas de Células NK Nasal/Tipo Nasal, existem outras, como a Leucemia Indolente de Células NK-LGL, que ainda têm muitas lacunas por preencher no que diz respeito à sua caracterização.

1.2.1. A Célula Natural Killer

1.2.1.1. A Biologia das Células Natural Killer

Como já foi referido, sabe-se que as células NK derivam de precursores da medula óssea e têm a aparência de linfócitos grandes, ligeiramente maiores do que a maioria dos linfócitos B e T normais, com numerosos grânulos citoplasmáticos sendo por isso, também conhecidos como linfócitos granulares grandes (LGL). Têm um citoplasma pálido e abundante, contendo grânulos azurófilos. As células NK normalmente expressam um ou mais antígenos associados às NK, mas algumas

populações de células NK não expressam estes antígenos e têm que ser identificadas por estudos funcionais. O subgrupo de células citotóxicas T que expressam antígenos das células NK, são designados por “NK-like T-cells”. As células NK surgem no sangue periférico e no baço, numa pequena percentagem (5 a 20% das células mononucleares) e são raras em outros órgãos linfóides (Alberts et al, 1989b). As células NK distinguem-se imunologicamente das células B e T por não apresentarem nem receptores de antígeno de células T nem de imunoglobulina de superfície das células B. Geneticamente verifica-se que, tão pouco ocorre rearranjo dos genes destas moléculas nas células NK. As células NK são ainda caracterizadas por certos antígenos que lhes estão associados: CD16, CD56 e CD57 que também podem ser expressos em algumas células T. As células NK expressam ainda alguns antígenos associados às células T: CD2, CD28, CD8, não expressam CD3 de superfície, mas expressam CD3 citoplasmático (Spits et al, 1995).

1.2.1.2. Ontogénese e Diferenciação das Células Natural Killer

A linha celular linfóide divide-se em três grupos de células: os linfócitos B, os linfócitos T e as células NK. Como em todas as células hematopoiéticas, a linhagem linfóide provém de células estaminais pluripotentes, funcionalmente definidas não só pela sua capacidade de originar as células sanguíneas, mas também pela sua auto-renovação. Um modelo para a diferenciação linfóide propõe que quando as células estaminais iniciam a diferenciação em células linfóides, vão passando por uma série de estados de diferenciação como células progenitoras. As células progenitoras mais primitivas têm a capacidade de originar qualquer tipo de células da linhagem linfóide, mas gradualmente estas células, inicialmente pluripotentes, vão perdendo (embora não em absoluto) o potencial de diferenciação em toda a gama da linhagem linfóide e comprometendo-se com apenas uma única (Ogawa et al, 1993).

Presentemente não existem marcadores imunológicos de superfície que permitam distinguir as células progenitoras T das células progenitoras NK. Estes dois grupos de células linfóides parecem ter origem num progenitor comum. Células que expressam o antígeno CD3 no citoplasma (cyCD3) e/ou o antígeno CD7 estão presentes na medula óssea (Tjonnfjord et al, 1993) e são geralmente consideradas representantes dos progenitores de células T. Esta ideia baseia-se no facto de os antígenos CD2, cyCD3 e CD7 serem todos co-expressos nas células T diferenciadas.

No entanto, estes antigénios também são expressos nas células NK fetais (Phillips et al, 1992 e Hori et al, 1992) e nas células progenitoras NK CD34⁺ do timo fetal, indicando que estes antigénios não são específicos para as células T primordiais (Chabannon et al, 1992 e Bárcena et al, 1993).

Inicialmente a ideia de que as células T e NK estavam relacionadas provinha das características comuns apresentadas por ambas a nível fenotípico e funcional. Mais tarde evidências recolhidas de vários trabalhos (Sánchez et al, 1993; Miller et al, 1992 e Bárcena et al, 1994), sugerem que as células T e NK estão mais relacionadas entre si do que com as células B. As linhagens das células T e NK parecem ter um maior número de células progenitoras em comum, até uma fase mais tardia do seu desenvolvimento, do que as células B.

A medula óssea é apontada como sendo o principal local de diferenciação das células NK (Miller et al, 1992 e Lotzova et al, 1993). As células NK, no homem, podem ter origem em duas populações de células progenitoras da medula óssea. As duas populações de células progenitoras distinguem-se pela presença ou ausência do antigénio de membrana CD34, sendo ambas muito heterogéneas na expressão dos antigénios CD7 e HLA-DR. Os progenitores CD34⁺ CD7⁻ serão provavelmente menos diferenciados que os CD34⁺ CD7⁺.

Durante os vários estádios de diferenciação das células progenitoras, e tal como acontece em outras linhagens, a perda da multipotencialidade é acompanhada pela diminuição da expressão de CD34. A perda do CD34 ocorre quando as células se comprometem com a linhagem NK e iniciam a expressão de antigénios de membrana só presentes nas células NK diferenciadas que circulam no sangue periférico (Lotzova et al, 1993).

O estágio de diferenciação que antecede o compromisso das células precursoras para com a linhagem NK é constituído por uma população de precursores bipotenciais T/NK, caracterizando-se fenotipicamente por expressarem na sua superfície os antigénios CD34, CD33, CD7, CD2[±], CD5[±], CD13, CD38, CD45RA e no citoplasma o CD3ε (figura 1). A nível funcional estas células caracterizam-se por serem capazes de originar células NK e células T, mas não células B (Lanier et al, 1992).

O precursor bipotencial T/NK é a última célula precursora comum entre as linhagens T e NK. O estágio seguinte da diferenciação é composto por clones de progenitores comprometidos com a linhagem NK, que se caracterizam pelo fenótipo

CD34⁻, CD33⁻, CD5⁻, CD7⁺ e CD2⁺ (figura 1). Estas células ainda não têm os antígenos de superfície CD16 e CD56 e não têm propriedades citotóxicas.

Durante a última fase da diferenciação das células NK, o precursor não citotóxico adquire os antígenos CD16 e CD56 e converte-se numa célula citotóxica (figura 1). O antígeno de superfície CD16 nem sempre está presente nas células NK diferenciadas. A relação evolutiva entre as células NK CD16⁺ e as células NK CD16⁻ ainda não é conhecida, supõe-se que possam representar diferentes estados de diferenciação ou diferentes grupos funcionais de células NK já diferenciadas (Phillips et al, 1992 e Lanier et al, 1986).

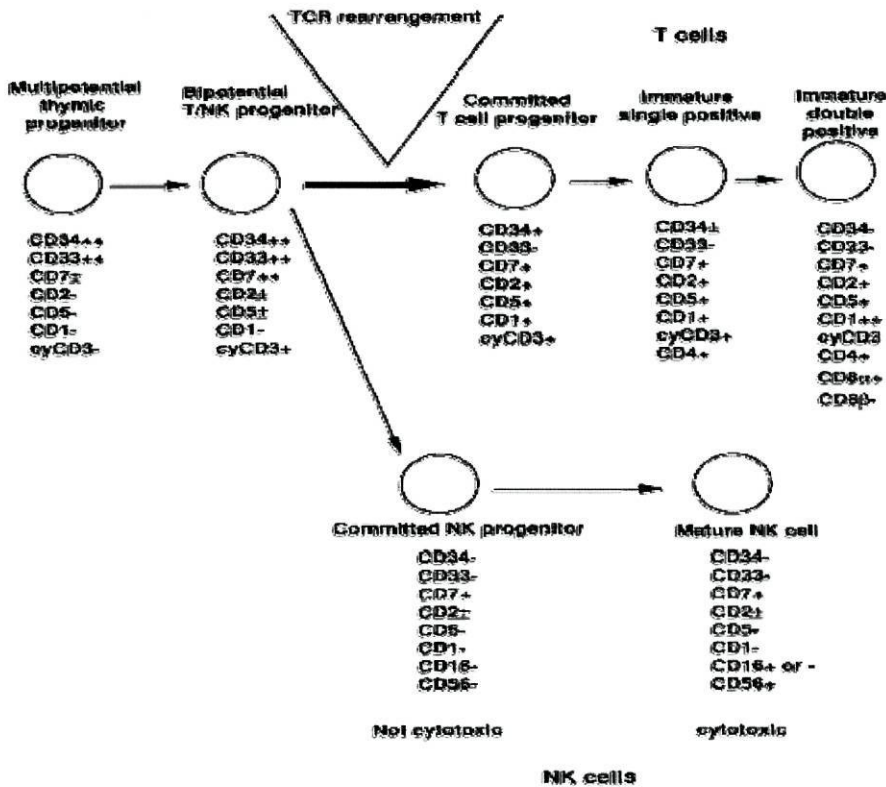


Figura 1. Modelo representativo da diferenciação das células T e NK no timo (adaptado de Spits et al, 1995).

O timo, um dos locais de diferenciação das células T, é possivelmente também um local de diferenciação das células NK. O timo contém células NK, representando uma pequena fracção de timócitos. Não se sabe se estas células NK têm de facto origem em precursores NK no timo ou se simplesmente circulam através deste. Existem trabalhos que indicam a presença de clones CD3⁻ CD56⁻ progenitores de células NK no timo (Hori et al, 1992 e Sánchez et al, 1993). Em 1994, Sánchez registou a presença no

timo, de progenitores CD34⁺, negativos para o CD1, CD3, CD4 e CD56, que na presença de IL-2, IL-7 e stem cell factor (SCF) se diferenciam em células NK.

O estudo dos factores que influenciam a diferenciação é ainda no presente uma área de investigação. Sabe-se que a diferenciação das células NK é afectada sempre que há uma diminuição das moléculas de MHC classe I (Lao et al, 1991; Hoglund et al, 1991 e Ljungren et al, 1994).

1.2.1.3. Funções das Células Natural Killer

As células que pertencem à linha linfóide são instrumentos na protecção do hospedeiro contra uma enorme variedade de agentes estranhos ao hospedeiro. De entre todas estas células as T e B são as melhores estudadas. São as células NK que pertencem a uma terceira linha linfóide, responsáveis pela morte de um vasto leque de células alvo, incluindo células tumorais e células infectadas por vírus ou bactérias bem como pela secreção de citocinas, principalmente interferão- γ (INF- γ) (Alberts et al, 1989b).

O papel fisiológico destas células ainda não foi completamente esclarecido, mas têm como principal função conhecida, a defesa contra vírus e outros microrganismos intracelulares. Pensa-se que estas células constituam uma primeira linha de defesa contra a infecção, usando a sua actividade citolítica ou a sua capacidade de secreção de citocinas. O termo natural killer resulta de observações registadas quando estas células foram isoladas do sangue e do baço. As células NK apresentavam uma actividade citolítica contra várias células alvo, sem ser necessária uma actividade adicional, acontecimento que contrastava com a conhecida actividade citolítica dos linfócitos T CD8⁺, os quais necessitavam ser activados antes de se diferenciarem em linfócitos T citolíticos (CTLs) capazes de lisar células alvo. Esta actividade citolítica das células NK é bloqueada por interacções específicas com determinados receptores que apresentam antígenos MHC classe I, do próprio e é levada a cabo sempre que as células tenham ausência deste antígeno à sua superfície (Alberts et al, 1989b).

1.2.1.3.1. Reconhecimento pelas Células Natural Killer de Células Infectadas

A activação das células NK é regulada por um equilíbrio entre sinais gerados por receptores de activação e sinais gerados por receptores de inibição. As células NK são

activadas quando reconhecem três tipos de alvo: (1) uma célula revestida por anticorpos; (2) células infectadas por vírus ou bactérias intracelulares; (3) células que têm ausência do complexo MHC classe I (Alberts et al, 1989b). O reconhecimento de células revestidas por anticorpos é mediado pelo receptor Fc γ RIIIa (CD16), um receptor de baixa afinidade para as porções Fc da IgG1 e IgG3 (Thinchieri et al, 1993). Como resultado deste reconhecimento as células NK lisam as células alvo que estejam revestidas pelos anticorpos. Este processo é denominado por citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e é um mecanismo efector da imunidade humoral. É pouco provável que este receptor de activação possa ser activado por outros ligandos que não sejam anticorpos e por isso não é funcional na imunidade inata. No entanto é importante conhecer como é que este receptor causa a activação das células NK, uma vez que outros receptores de activação podem usar mecanismos semelhantes.

A molécula Fc γ RIII tem uma cadeia α que liga domínios Fc de anticorpos, associada a homodímeros de uma subunidade de sinalização designada por cadeia γ . Esta última contém motivos de activação designados por “immunoreceptor tyrosine-based activation motifs” (ITAMs). Os resíduos de tirosina destes motivos são fosforilados sempre que o Fc γ RIII se liga a um anticorpo associado a uma partícula ou célula. A fosforilação provoca o recrutamento e activação de proteínas tirosina cinases que desencadeiam uma série de vias intracelulares que têm como resultado final a activação das células NK, a lise das células alvo e a produção de citocinas (Billadeau et al, 2002).

Não se sabe ainda quais os receptores de activação que são usados no reconhecimento de uma célula infectada quando não estão presentes anticorpos. Vários candidatos potenciais têm sido identificados por estudos *in vitro*, incluindo o CD2, integrinas e várias outras moléculas específicas das células NK (Schresta et al, 1998). É também possível que as ligações estáveis das células NK aos seus alvos, por meio de várias moléculas de adesão, por si só sejam suficientes para activar as células NK, particularmente se os receptores de inibição como o MHC-I não estiverem presentes. Com efeito as células NK expressam receptores que reconhecem o complexo MHC classe I e que tornam possível a inibição da actividade citotóxica em células que apresentem este complexo. A importância fisiológica desta especificidade das células NK tem a ver com a prevenção de um eventual ataque das células NK às células do próprio organismo, uma vez que todas as suas células nucleadas normais expressam o

MHC classe I. Muitos vírus criaram meios de inibir a expressão do MHC classe I, nas células por ele infectadas, escapando desta forma à lise específica de células infectadas por vírus, desempenhada pelos linfócitos T CD8⁺. As células NK são uma adaptação que permite ao hospedeiro eliminar células infectadas por esse tipo de vírus (Alberts et al, 1989b).

Dois grupos de receptores de inibição foram identificados nos humanos. Os KIR são membros da família das imunoglobulinas e contêm no seu domínio citoplasmático motivos de inibição designados por immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs). A ligação a estes motivos leva à fosforilação dos resíduos de tirosina nos ITIMs e ao recrutamento e activação de proteínas tirosina fosfatase. Estas fosfatases removem os grupos fosfato dos resíduos de tirosina de muitos substratos e assim antagonizam as cinases activadoras, recrutadas pelos ITAMs nos receptores de activação, bloqueando a activação das células NK. No entanto existe um subgrupo de KIRs que estão associados com motivos ITAM e que activam células NK (Billadeau et al, 2002).

Uma segunda classe de receptores de inibição nos humanos, é formada por heterodímeros que contêm uma proteína invariável designada por CD94 e uma subunidade variável de lectina, designada por NKG2. Também estas moléculas NKG2 contêm ITIMs, que se supõe funcionarem por activação de tirosina fosfatases (Schresta et al, 1998).

Os ligandos para os receptores de inibição das células NK são alelos particulares das moléculas MHC classe I. No homem, muitos dos receptores de inibição reconhecem alelos classe I, codificados pelo locus HLA-B ou HLA-C. Alguns reconhecem moléculas semelhantes à classe I, mas menos polimórficas, designadas por moléculas classe 1b, tais como HLA-E.

1.2.1.3.2. Funções Efectoras das Células Natural Killer

As funções efectoras das células NK são a lise das células infectadas por vírus ou de células tumorais e a secreção de INF- γ , que activa os macrófagos responsáveis pela fagocitose de microorganismos. O mecanismo de lise celular mediado pelas células NK é tão importante como o das células CTLs. As células NK contêm grânulos com perforina, que cria poros na membrana celular das células alvo, e enzimas designadas por granzymes, que penetram através dos poros realizados pelas perforinas e induzem a

apoptose nas células alvo. Ao eliminar as células infectadas por vírus, as células NK eliminam o reservatório para a infecção. Os grânulos das células NK, tal como os das CTLs, contêm também um antibiótico peptídico, designado por granublisina, que pode entrar na célula infectada e matar directamente os micróbios intracelulares. Alguns tumores, especialmente os de origem hematológica, são alvos de células NK. Pensa-se que, por as células tumorais não expressarem níveis normais de moléculas MHC classe I, elas se tornam alvo para as NK (Albert et al, 1999).

As células NK lisam células infectadas por vírus, antes que os CTL estejam activados, ou seja, durante os primeiros dias após a infecção vírica. No início da infecção vírica, as células NK expandem-se e são activadas por citocinas da imunidade inata, IL-12 e IL-15 e lisam células infectadas, especialmente aquelas que apresentam números reduzidos de moléculas MHC classe I. Para além disto, o INF- γ produzido pelas células NK, activa macrófagos para a destruição de micróbios fagocitados. Este último tipo de reacção descrito, pode controlar uma infecção de bactérias intracelulares, tais como *listeria monocytogenes*, durante várias semanas, permitindo que durante este tempo a imunidade mediada pelas células T se desenvolva e erradique a infecção. A falha de células NK leva ao aumento da susceptibilidade à infecção por alguns vírus e bactérias intracelulares (Boehm et al, 1997).

1.2.1.4. A Relação entre Citocinas e Células Natural Killer

A expansão e activação das células NK são também estimuladas por citocinas, essencialmente IL-15 e IL-12. As células NK proliferam e mostram aumento da actividade citolítica e da produção de INF- γ como resposta à IL-15 que é produzida nos macrófagos e outras células. A IL-12 derivada dos macrófagos é um poderoso indutor da produção de INF- γ e da citólise. A IL-18 também estimula a produção de INF- γ pelas células T e é por isso um participante central na produção de INF- γ e na subsequente activação mediada pelo INF- γ dos macrófagos, quer na imunidade inata, quer na adaptativa. Os INFs tipo I (INF- α e INF- β) também parecem activar o potencial citolítico das células NK. Pensa-se que ao aumentarem a expressão de receptores da IL-2, aumentam a resposta à IL-2. As IL-15, IL-12 e os INFs tipo I são produzidos pelos macrófagos, em resposta a uma infecção portanto, as três citocinas activam as células NK na imunidade inata. Altas concentrações de IL-2, também estimulam a actividade

das células NK e por este meio, as células NK podem funcionar na imunidade adaptativa mediada pelas células T (Boehm et al, 1997).

1.2.2. Doenças Linfoproliferativas das Células Natural Killer

1.2.2.1. Subtipos de Linfomas de Células Natural Killer

As neoplasias das células NK são raras e segundo os sistemas OMS e REAL (Harris et al, 1994; Harris et al, 1999 e Jaffe, 1996) podem ser sub-classificados de acordo com o seu estado de maturação e as suas características clínicas. Podemos dividir os neoplasmas de células NK em neoplasias de células imaturas e de células diferenciadas dado que as células imaturas diferem das diferenciadas por apresentarem uma morfologia blástica, poucos grânulos azurófilos ou mesmo ausência destes, ausência da enzima TIA-1 e ausência de actividade citotóxica.

Dentro da classe das neoplasias das células NK imaturas incluem-se duas entidades clínicas, a Leucemia Aguda de Células Percursoras NK/Mieloides, que não foi ainda muito bem definida e que se pensa ter origem em células mielóide/NK multipotenciais, e o Linfoma Blástico de Células NK (Scott et al, 1994 e Suzuki et al, 1999). Na classe das neoplasias de células NK diferenciadas, incluem-se a Leucemia Indolente de NK-LGL, Leucemia Agressiva de Células NK, o Linfoma Nasal de Células NK e o Linfoma Tipo Nasal de Células NK (Lougharn et al, 1993 e Rabbani et al, 1999). De entre as neoplasias das células NK, as mais comuns e por isso, as mais bem caracterizadas, são os Linfomas de Células NK Nasais e Tipo Nasal, sendo secundados pelas Leucemia Indolente LGL e Leucemia Agressiva de Células, que no entanto são doenças muito raras (Lymphoma Study Group, 1991; Taguchi et al, 1996; Tsukasaki et al, 2001 e Itoyama et al, 2001).

1.2.2.2. Leucemia Crónica de Células Natural Killer - Large Granular Lymphocytes

A Leucemia Crónica de Células Natural Killer – Large Granular Lymphocytes (NK-LGL) foi proposta como uma entidade distinta pertencente ao grupo das neoplasias de células NK, após se ter verificado que a proliferação persistente de Linfócitos Granulares Grandes (LGL) tinha associada anomalias cromossómicas clonais e que existia invasão de tecidos pelas células LGL da medula óssea, baço e fígado (Lougharn

et al, 1985). Desde então subdividiram-se as doenças clonais das células LGL em dois tipos de leucemia, leucemia de células NK-LGL e leucemia de células T-LGL consoante o tipo de célula LGL que estivesse na origem da neoplasia.

A Leucemia Crónica de Células NK-LGL, surge em doentes com uma média de idades de aproximadamente 55 anos. O diagnóstico diferencial desta neoplasia é estabelecido por um aumento acentuado do número de linfócitos LGL CD3⁺/CD56⁺, com ausência de rearranjos dos genes do TCR, ou de outro marcador clonal (Greer et al, 2001). Os doentes apresentam um percurso clínico indolente existindo no entanto a possibilidade de progressão da doença para um estado de leucemia agressiva (Ohno et al, 1989).

Nesta neoplasia as células leucémicas apresentam uma morfologia característica das células NK maduras e imunofenotipicamente caracterizam-se pelo perfil: CD56⁺, CD16⁺, CD94⁺, CD2⁺, CD11a⁺, CD45RA⁺, CD122⁺, CD3⁻, CD5⁻, CD28⁻, CD25⁻, TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$ ⁻, com expressão variável e heterogénea de CD8 e CD57. As células neoplásicas têm ainda expressão de granzyme B e são capazes de produzir INF- γ e TNF- α (Lima et al, 2003).

Os doentes com esta neoplasia, apresentam usualmente, níveis altos de LDH e β 2-microglobulina, associados a hipergamaglobulinemia (Greer et al, 2001; Lima et al, 2003).

A caracterização clínica desta neoplasia é ainda hoje assunto de discussão. Condições clínicas como a citopenia, vasculite, febre neutropénica, granuloma na medula óssea e infecção vírica por EBV em áreas endémicas, têm sido associadas a esta neoplasia (Sivakumaran et al, 1996 e Rabbani et al, 1999). Um estudo realizado recentemente, numa população de doentes com Leucemia Indolente NK-LGL CD56⁻/^{+dim}, aponta as citopenias, as doenças neoplásicas e as infeções víricas como estando frequentemente associadas a esta neoplasia. (Lima et al, 2003).

1.2.2.3. Patogénese da Leucemia Crónica de Células Natural Killer - Large Granular Lymphocytes

Os factores e mecanismos responsáveis pela patogénese da Leucemia Crónica de Células NK-LGL, não são ainda conhecidos. No entanto existe um conjunto de informações que sugerem algumas hipóteses. A hipótese mais consensual atribui à

ocorrência de infecção vírica, o papel de factor responsável pela persistente estimulação das células NK (Zambello et al, 1994) e propõem como mecanismos de patogénese o ataque citotóxico das células NK a células autólogas e/ou a alteração da apoptose via ligando-Fas/Fas nas células normais (Liu et al, 2000).

A associação da Leucemia Crónica de Células NK-LGL a infecções víricas (Rabbani et al, 1999), o facto de uma considerável percentagem de soros, provenientes de doentes com esta neoplasia, reagirem com a proteína p21 do HTLV-I/II e a constatação de que ratos transgénicos com o gene tax, do HTLV-I, desenvolvem esta neoplasia, são dados que sugerem a infecção vírica como estímulo para activação das células NK.

A observação que a anemia associada à Leucemia Crónica de Células NK-LGL, responde à terapia com ciclosporina A, uma droga supressora da actividade citolítica (Bible et al, 1996); e a constatação de que existem doentes com Leucemia Crónica de Células NK-LGL, associada a anemia hemolítica, cujas células NK têm actividade citolítica contra eritrócitos autólogos (Bassan et al, 1989), corroboram a hipótese de um ataque directo citotóxico por parte das células NK a células autólogas.

1.2.2.4. Tratamento das Neoplasias das Células Natural Killer

As neoplasias das células T e células NK periféricas, têm sido difíceis de classificar e de tratar, por uma série de razões, sendo a principal razão, o facto de estas patologias serem muito raras, representando menos de 15% dos Linfomas Não Hodgkin, no Ocidente. Dentro deste grupo de neoplasias minoritário, existem múltiplos subtipos, o que significa que alguns destes linfomas representam menos de 1% dos LNH. Para além da raridade, existem outros problemas no diagnóstico patológico dos linfomas T/NK: 1) não existe um marcador imunofenotípico para a clonalidade; 2) tem uma vasta heterogeneidade morfológica e 3) existe uma má correlação entre a morfologia das células e o prognóstico (Chan et al, 1992). Todos estes problemas no diagnóstico contribuíram para a falta de uma terapia consensual neste grupo de neoplasias.

Existem numerosos registos de trabalhos com pequenas séries de raros subsets de neoplasias, nomeadamente do tipo nasal, que registam para estas neoplasias maus resultados e mau prognóstico após a terapia com antraciclina.

1.2.2.5. Novas Terapias nos Neoplasmas de Células Natural Killer

Enquanto que a terapia constituída pelo CHOP é considerada terapia standard, para doenças anteriormente descritas como pertencentes aos LNH de grau intermédio na classificação de WF, o prognóstico em muitos linfomas NK tem sido tão fraco que novas terapias estão a ser procuradas. A Micose Fungoide e a Leucemia/Linfoma de Células T representam os extremos clínicos que compreendem as neoplasias das células NK, visto que a Micose Fungoide é mais indolente do que a Leucemia Indolente LGL e a Leucemia/Linfoma de Células T é mais agressiva do que a Leucemia Agressiva de Células NK ou o Linfoma Tipo Nasal de Células NK. Por estas razões, as novas terapias que estão a ser estudadas para estas duas doenças podem vir a ser aplicadas às neoplasias NK (Greer et al, 2001).

Na fase da Micose Fungoide de estágio IV, os doentes são normalmente tratados com terapias direccionadas para a pele e incluem tratamentos com luz ultra violeta, com psoralen, radioterapia e quimioterapia tópica. Nos casos mais avançados, a terapia sistémica é aplicada e inclui interferão, esteroides e quimioterapia. Novos agentes estão a ser desenvolvidos, entre eles destacam-se o bexaroten e denileukin difitox.

O efeito nas doenças das células NK, de altas doses de agentes quimioterapêuticos, é difícil de avaliar. Devido ao reduzido número de doentes não é possível calcular o impacto de tal tratamento (Waits et al, 1993). Até que os estudos provem o contrário, o transplante nas neoplasias das células NK deve ser utilizado seguindo os mesmos preceitos que se usam Leucemia Crónica de Células Grandes e Difusas B (DLBCL), como parte da terapia de “salvação” em pacientes quimiosensíveis e que recaíram. Um pequeno número de doentes com linfoma NK extramodal experimentou já este tipo de terapia de “salvação” (Sasaki et al, 2000), bem como em doentes com Linfomas Tipo Nasal de Células NK.

Mecanismos de resistências a drogas nos linfomas das células NK induzem o aumento da expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas e do p53 (Drenou et al, 1988). Agentes quimioterapêuticos incluindo o paclitaxel e o topotecan e os novos agentes mostraram ter actividade na recaída das malignidades hematológicas (King et al, 2000), no entanto, não existem muitos dados quanto à sua eficácia nas neoplasias das células NK. Devido à raridade das doenças das células NK, só a cooperação entre grupos e centros tornará possível avaliar o papel de novas drogas ou de transplantes nesses doentes.

1.3. A Neural Cell Adhesion Molecule-1 (CD56)

A citotoxicidade e a expressão dos antígenos CD16 e CD56 são características adquiridas pelas células NK, no seu último estágio de diferenciação. Enquanto que o antígeno CD16 nem sempre está presente nas células NK diferenciadas, o antígeno CD56 constitui um marcador imunológico importante destas células.

A molécula de CD56 também conhecida como neural cell adhesion molecule - 1 (NCAM-1), foi primeiro reconhecida pelo seu importante papel na adesão celular do tecido nervoso. Pensa-se que nas células NK a NCAM-1 contribui também para a adesão celular e que estará envolvida na citotoxicidade destas contra as células alvo que também expressem a NCAM-1 (Nitta et al, 1989).

A molécula NCAM-1 é também um marcador das neoplasias das células NK (Chan et al. 1997; Emile et al, 1996 e Tsang et al, 1996) e foi sugerida uma associação entre a expressão desta molécula em células tumorais e a facilidade de metastização tumoral (Fukuda, 1983).

1.3.1. Função da NCAM-1 (CD56)

As moléculas NCAM-1 são importantes na formação de interações célula-célula e célula-matriz, sejam estas de natureza homofílica ou heterofílica, regulando o contacto membrana-membrana necessário para iniciar interações específicas entre moléculas (Rustishauser, 1988).

Estas moléculas surgem cedo no desenvolvimento embrionário, desempenhando um papel na formação de colectividades celulares e na sua fixação a locais morfológicos específicos. Em fases mais tardias do desenvolvimento são importantes na adesão entre neurónios e na adesão entre neurónios e músculo. A molécula NCAM-1 pode assim influenciar eventos celulares tais como a comunicação intracelular, ou a transmissão de sinais que alteram os níveis de enzimas neurotransmissoras.

Nas células NK, a NCAM-1 parece estar envolvida na adesão homofílica entre células e desempenhar um papel importante nas interações entre células NK e células alvo (Nitta et al, 1989). No entanto esta última função atribuída à NCAM-1 é controversa, sendo refutada por alguns investigadores (Lanier et al, 1991).

1.3.2. Distribuição Celular e Tecidual da NCAM-1 (CD56)

A NCAM-1 foi inicialmente identificada na retina e cérebro de galinhas, por Rutishauser e colaboradores em 1976 e anos mais tarde em outros tecidos e em outros vertebrados, entre os quais se encontra o homem. Estes trabalhos mostraram que a molécula NCAM-1 é uma glicoproteína altamente conservada entre as espécies e pode surgir, pelo menos, sob três formas, que se identificam pelos diferentes pesos moleculares. Estas três isoformas apresentam os pesos moleculares de 180 KDa, 140 KDa e 120 KDa. Cada uma destas proteínas é expressa preferencialmente em determinados tecidos e em determinados estádios do desenvolvimento embrionário (Cunningham et al, 1987).

A NCAM-1 é expressa na superfície de células hematopoiéticas, células neuroendócrinas, células musculares, células tumorais e em tecidos embrionários ectodérmicos e mesodérmicos. No tecido neural são expressas as isoformas de 180 e 140 KDa, no tecido muscular apenas é expressa a isoforma de 120 KDa e o tecido hematopoiético expressa exclusivamente a isoforma de 140 KDa (Warren, 2000).

Nos tecidos hematopoiéticos normais, a NCAM-1 é expressa predominantemente nas células NK, no entanto aparece também em cerca de 5% das células T do sangue periférico (Lanier et al, 1991). Dentro das células NK o seu nível de expressão define duas subclasses (Nagler et al, 1990): a subclasse das células NK CD56^{dim} que predominam no sangue periférico e no baço (Witte et al, 1989) e a subclasse das células NK CD56^{bright} que predominam no fígado (Winnock et al, 1991 e Nishikawa et al, 1991).

1.3.3. Estrutura da NCAM-1 (CD56)

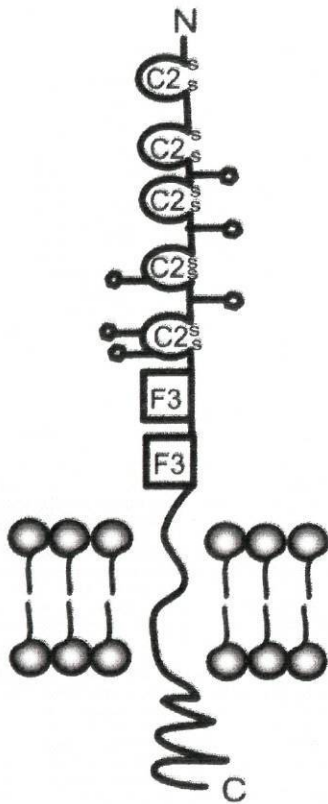


Figura 2. Representação da molécula NCAM-1, expressa na superfície das células NK (adaptado de Warren, 2000).

As três isoformas mais frequentes da NCAM-1 (de 180, 140 e 120 KDa), apresentam um domínio extracelular idêntico que as permite identificar como membros da família das imunoglobulinas. A porção extracelular da NCAM-1 contém cinco segmentos contíguos que apresentam uma sequência homóloga entre si (figura 2) e que por sua vez é também comum aos membros pertencentes à família das imunoglobulinas (Cunningham et al, 1987). Também na porção extracelular e após o quinto domínio homólogo, localizam-se dois segmentos homólogos à fibronectina tipo III (Cunningham et al, 1987 e Edelman, 1988). O domínio extracelular contém ainda 6 locais onde pode ocorrer a N-glicosilação (sendo que o grau de glicosilação é dependente do tipo de célula a que pertence a NCAM-1) e um local de ligação de ácido polissialílico (PSA), localizado no último domínio homólogo (domínio V) (Cunningham et al, 1987 e Warren, 2000).

O local de ligação da NCAM-1 situa-se na região que contém o terminal amina, sendo as regiões responsáveis pelas ligações aquelas que são englobadas nos loops dos segmentos homólogos delimitados por pontes dissulfeto. As ligações domínio-domínio são a base estrutural das ligações homofílicas na NCAM-1. Estes domínios podem ligar-se directamente a outros de uma molécula NCAM-1 pertencente a uma célula vizinha ou a domínios de uma molécula pertencente à mesma célula.

Como consequência do uso de exões diferentes durante o splicing alternativo, as três isoformas da NCAM-1 apresentam domínios transmembranares e citoplasmáticos muito diferentes. A molécula de 180 KDa tem uma longa cauda citoplasmática e é uma proteína integral e por isso relativamente móvel na membrana citoplasmática. A molécula de 140 KDa tem uma pequena cauda citoplasmática e também é uma proteína integral e relativamente móvel na membrana. A molécula de 120 KDa é uma âncora de fosfatidilinositol glicano (GPI), associada ao tecido muscular e tem como particularidade, entre os dois domínios de fibronectina III, uma sequência de 35

aminoácidos específicos para este tecido. Porque a proteína de 120 KDa se encontra ligada à membrana apenas por uma GPI, é a mais móvel de todas as isoformas (Cunningham et al, 1987).

A parte citoplasmática das proteínas de 180 KDa e 140 KDa permite a interacção com moléculas do citoplasma e a modulação por fosforilação de serinas e treoninas.

1.3.4. Mecanismos de Regulação da Actividade da NCAM-1 (CD56)

Ao contrário do que acontece nas imunoglobulinas, nesta molécula não há variação de aminoácidos na sequência da proteína que possa explicar diferenças nas ligações específicas. Supõe-se que a actividade da NCAM-1 seja regulada pela célula a que se liga por uma série de mecanismos de modulação na superfície celular, despoletados por sinais locais que têm origem nas colectividades celulares ligadas por NCAMs. Um exemplo deste mecanismo é o domínio V que liga o ácido polissialico (PSA), alterando a cinética de ligação da NCAM-1 por repulsão de cargas e impedimento alostérico (Cunningham et al, 1987 e Rutishauser et al, 1988). A sulfatação dos oligossacarídeos nos locais de N-acetilação, também contribui para o aumento da repulsão devido às cargas negativas. O tipo de isoforma que se expressa na célula pode funcionar também como um factor de regulação da actividade da NCAM-1 (Cunningham et al, 1987 e Rutishauser et al, 1988). A actividade da NCAM-1 parece estar dependente de uma combinação de eventos que podem ocorrer quer durante a transcrição do gene CD56, quer logo após a síntese da proteína e que regulam a expressão da proteína (Goridis et al, 1985).

Logo após a tradução a NCAM-1 sofre uma série de alterações que podem modular a sua expressão e actividade. Dessas alterações fazem parte a adição de oligossacarídeos à asparagina no domínio V, a fosforilação de serina e treonina, na cauda citoplasmática, a acilação da cauda citoplasmática com ácidos gordos, ou a sulfatação dos oligossacarídeos ligados à asparagina (Cunningham et al, 1987). Verificam-se também alterações na quantidade e na distribuição de PSA. Observações experimentais mostraram que ocorrem mudanças nas interligações gerais que permitem

o contacto entre duas células, sempre que o teor de PSA é alterado nas moléculas NCAM-1 (Rutishauser et al, 1988). Dependendo do conteúdo em PSA a presença de NCAM-1 nas células pode contribuir ou não para fortalecer não só as ligações homotípicas NCAM-1, como também as ligações de outras moléculas de membrana. Se o teor de PSA na NCAM-1, é baixo, algo que acontece nos tecidos adultos, a NCAM-1 aumenta a adesão entre as células. Se o teor em PSA é elevado, algo que acontece nos primeiros estádios do desenvolvimento embrionário, o grande volume ocupado por este carbohidrato e a sua carga negativa provocam o afastamento entre as moléculas de superfície das células envolvidas na interacção. Este fenómeno permite a ligação diferencial de ligandos aos receptores membranares. Um ligando de um receptor pequeno, relativamente imóvel e em pouca concentração na superfície celular, só se ligará ao seu receptor quando os valores de PSA forem mínimos. Por outro lado receptores com um domínio extracitoplasmático extenso, com relativa mobilidade e elevada concentração na superfície membrana ligam-se mais facilmente aos ligandos em caso de concentrações altas de PSA na molécula NCAM-1.

Moléculas NCAM-1 com uma elevada concentração em PSA têm vindo a ser identificadas em células tumorais e julga-se que o nível de PSA nas moléculas de NCAM-1 dessas células pode estar associado com a disseminação tumoral e a sua facilidade para a metastização (Fukuda, 1996).

1.3.5. Estrutura do Gene da NCAM-1 (CD56)

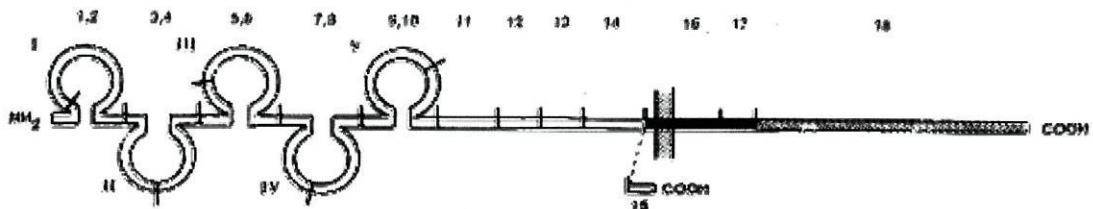


Figura 3. Esquema representativo da correspondência entre cada um dos domínios da molécula NCAM-1 e os exões do gene CD56, que os codificam. A numeração árabe representa os exões que codificam os domínios proteicos representados pela numeração romana (adaptado de Cunningham 1987).

Técnicas de Southern e Northern blot identificaram um gene único para a molécula NCAM-1 (Gordis et al, 1985). As técnicas de hibridização *in situ* permitiram identificar a localização deste gene na porção distal do braço longo do cromossoma 11 mais precisamente na banda q23.1 (Nguyen et al, 1986), junto dos loci que codificam a molécula Thy-1 e a subunidade T3- δ do complexo T3 das células T, também elas moléculas de superfície envolvidas em interações intercelulares.

Nos anos 90, Barton e colaboradores clonaram e caracterizaram a região promotora do gene do CD56. O promotor foi localizado numa região 5' do gene CD56 com aproximadamente 465 pb, que se estende desde a posição -144 à posição -611 (a partir do ATG). Esta região genómica contém várias sequências consensus para a ligação de factores de transcrição, de entre os quais se destacam a sequência TGAGGT (compreendida entre as posições -298 e -304) análoga à do gene do elemento de resposta ao AMP cíclico; a sequência ATCGAAAT (compreendida entre as posições -558 e -549) análoga à dos genes das imunoglobulinas e a sequência GCTGATTAAG (compreendida entre as posições -523 e -514) (Barton et al, 1990), não tendo sido identificados no entanto elementos TATA ou CCAAT. O promotor do gene CD56 caracteriza-se ainda por estar localizado num domínio rico em GC muito semelhante àqueles que se encontram nos genes designados por “house keeping genes”, que contém um elevado número de dinucleótidos CpG. Esta última característica faz deste promotor um excelente candidato para a ocorrência de metilação, no entanto a grande representatividade que a molécula NCAM-1 tem quer nos tecidos embrionários, quer nos tecidos diferenciados, sugerem que este promotor se encontra normalmente no estado não metilado (Barton et al, 1990). O gene do CD56 é constituído por 18 exões (tabela 2), ocupando cerca de 30 kilobases (Kb) do gene, que por splicing alternativo originam diferentes isoformas da NCAM-1 (figura 3) (Hemperly et al, 1990). Catorze destes exões são comuns entre os três polipéptidos e codificam a região correspondente aos cinco domínios homólogos da NCAM-1, os restantes exons, por splicing alternativo originam os diferentes domínios transmembranares e citosólicos das isoformas NCAM-1 (figura 3). No mínimo o gene do CD56 pode originar três mRNAs de 6,8 a 7,2 Kb, de 6,2 Kb e 4,2 Kb que codificam respectivamente os polipéptidos de 180 KDa, 140 KDa e 120 KDa (<http://www.ensemble.org>).

Tabela 2. Localização genómica dos 18 exões da NCAM-1, no gene CD56 (contig NT_035088.1).

<i>Exão</i>	<i>Primeiro nucleótido do exão</i>	<i>Último nucleótido do exão</i>	<i>Tamanho do exão</i>
1	298	350	54 bp
2	241059	241133	76 bp
3	242966	243184	220 bp
4	244203	244346	145 bp
5	244723	244860	139 bp
6	245941	246058	119 bp
7	246513	246682	171 bp
8	253049	253191	144 bp
9	270325	270475	152 bp
10	270850	271034	186 bp
11	271398	271494	98 bp
12	271827	271997	172 bp
13	273713	273844	133 bp
14	294554	294681	129 bp
15	298826	299003	179 bp
16	308868	309075	207 bp
17	310440	310556	116 bp
18	313947	314066	119 bp

Um conjunto de observações tem sugerido a existência de um gene ancestral, comum aos genes das imunoglobulinas e da NCAM-1. Este gene ancestral seria anterior às alterações que permitiram o aparecimento de regiões variáveis e regiões constantes, nos domínios das imunoglobulinas. A hipótese do gene ancestral comum é suportada não só pelas semelhanças estruturais entre os cinco domínios homólogos da NCAM-1 e os domínios das imunoglobulinas, mas também pela estrutura dos exões que codificam esses domínios na NCAM-1. Cada um dos cinco domínios homólogos na NCAM-1 é codificado por dois exões, contrariamente ao que acontece para as regiões homólogas dos outros membros da superfamília das imunoglobulinas (com excepção da proteína linfocítica T4), codificadas por um único exão. Este facto é consistente com a ideia de que os genes das imunoglobulinas podem ter evoluído de um gene precursor mais pequeno do que aquele que agora é necessário para codificar um domínio inteiro (Cunningham et al, 1987).

Capítulo II

Introdução e Objectivo

2.1. Introdução

Os linfócitos grandes granulares (LGL) constituem cerca de 10 a 15% das células mononucleares do sangue periférico (Timonen et al, 1981). Fenotipicamente caracterizam-se por terem um tamanho maior do que o normal dos linfócitos e por apresentarem grânulos azurófilos no citoplasma. As células LGL podem dividir-se em duas linhagens principais: CD3 negativas e CD3 positivas. A maior população de LGL no sangue periférico de um indivíduo normal é constituída por células NK. Estes LGL são CD3 negativas, não reorganizam os genes do TCR e são mediadoras da citotoxicidade independente da apresentação de antígeno (Lanier et al, 1986b).

As doenças clonais do LGL podem surgir a partir de duas linhagens de células normais que lhe correspondem, ou seja, podem ter origem nas células NK ou nas células T (Lougharn, 1993). Em 1977, um síndrome de elevado número de LGL circulantes associado com neutropenia foi descrito. A grande questão que se colocou neste tipo de doença foi, se a linfocitose era reactiva ou neoplásica. Em 1985 foram detectadas anomalias cromossómicas clonais em doentes com esta patologia (Lougharn et al, 1995). A patologia foi designada por Leucemia LGL, baseada na observação da clonalidade e na demonstração da invasão de tecidos pelos LGL da medula óssea, baço e fígado. Em 1993 foi proposta a classificação da Leucemia LGL nas Leucemias NK-LGL e Leucemias T-LGL, para doenças clonais LGL de origem em células NK-LGL e T-LGL, respectivamente (Lougharn, 1993).

A Leucemia NK-LGL ou Leucemia Crónica de Células NK-LGL foi classificada no grupo das neoplasias das células NK (Harris et al, 1994) e é diferenciada da Leucemia T-LGL por apresentar um aumento acentuado do número de linfócitos LGL CD3⁻/CD56⁺ com ausência de rearranjos dos genes do TCR e de marcadores clonais (Greer et al, 2001). No entanto, dentro do grupo das doenças linfoproliferativas com origem nas células NK, a diferenciação da Leucemia Crónica de Células NK-LGL de um Linfoma/Leucemia Agressiva de Células NK, ou de uma Linfocitose Crónica Reactiva de Células NK, torna-se muitas vezes problemática, dadas as semelhanças entre as populações em expansão, nas diferentes doenças e a ausência de marcadores de clonalidade específicos (Jaffe, 1996). Com o intuito de encontrar marcadores de clonalidade para este grupo de doenças, estudos ligados ao cromossoma X, pesquisas da

presença de DNA viral e análises de citogenética têm vindo a ser realizadas nos últimos anos (Nash et al, 1993 e Kelly et al, 1994).

Recentemente, os trabalhos realizados por Lima e colaboradores, sobre a caracterização imunofenotípica de células NK na fase inicial da activação de células NK na fase tardia da activação, em indivíduos normais e de células NK em expansão e em doentes com linfocitose crónica de células NK-LGL, permitiram identificar, nestes últimos uma população de células NK que tem ausência, ou fraca expressão da molécula de superfície CD56 (células NK CD56^{-/+dim}) (Lima et al, 2002 e Lima et al, 2003). Imunofenotipicamente a população de células que não expressa o CD56 (CD56⁻) caracteriza-se não só pela ausência de CD56, mas também por apresentar em relação às células NK normais, uma menor e mais heterogénea expressão de CD7, CD57 e CD11b; uma maior e mais homogénea expressão de CD2, CD11c e CD94, bem como uma maior e heterogénea expressão de HLA-DR (Lima et al, 2003).

Comparando o perfil imunofenotípico das células NK CD56^{-/+dim}, com o das células NK recentemente activadas, verifica-se que têm em comum o aumento da expressão de CD11c, CD57 e HLA-DR, característico destas últimas. Se a mesma comparação for estabelecida em relação ao perfil imunofenotípico característico das células NK em fase tardia da activação, verifica-se que também com estas, as células NK CD56^{-/+dim} tem em comum o aumento da expressão de CD2 e a diminuição da expressão de CD7, característico da fase tardia da activação. Assim esta população de células NK CD56^{-/+dim}, parece apresentar um perfil imunofenotípico de activação aberrante, que tem características típicas, não só, de células na fase inicial da activação (tipicamente observado em doentes com infecções víricas agudas) mas também, de células NK na fase tardia da mesma (tipicamente observado em doentes com infecções crónicas) (Lima e tal, 2003).

A descoberta de uma população de células NK CD56^{-/+dim}, com um fenótipo de activação aberrante, é sugestivo de que alterações genéticas clonais possam estar na origem deste. Com a finalidade de encontrar um marcador de clonalidade, nesta população delineou-se um estudo centrado no gene do CD56 e nos doentes da população referida que não expressam a molécula NCAM-1. A amplificação por reacção da polimerase em cadeia (PCR), usando primers intrónicos, dos 18 exons que constituem o gene CD56; seguida de análise dos mesmos por sequenciação permitirá a detecção da presença ou ausência de anomalias genéticas neste gene. Caso as anomalias genéticas registadas afectem o nível de transcrição do gene, o tipo de transcrito de RNA

do gene, o nível de expressão ou a estrutura da NCAM-1, elas poderão ser directamente relacionadas com o fenótipo CD56⁻ e consideradas como marcadores de clonalidade desta população.

O estudo da população de células NK CD56^{-/+dim}, em doentes com linfocitose crónica identificou uma associação entre esta doença e as infecções víricas, sugerindo a hipótese de que a expansão de células NK CD56^{-/+dim} possa ser induzida por estimulação vírica (Lima e tal, 2003). Com a finalidade de estudar esta hipótese, investigou-se também por PCR, a presença de genoma víral, pertencente ao Herpes Simplex-1/2, Human Herpes Vírus-6, Citomegalovirus, Epstein-Barr Vírus e Human T-Cell Lymphotropic Vírus Type-1.

2.2. Objectivo

Durante o presente trabalho realizou-se a pesquisa de mutações genéticas no gene CD56, de uma população de doentes diagnosticados com leucemia crónica de células NK-LGL, em que as células em expansão são CD56⁻, com o objectivo de identificar possíveis alterações genéticas que funcionem como marcadores clonais desta neoplasia.

Numa fase inicial do estudo e tendo como objectivo o estudo dos dezoito exões do gene CD56, foi seu objectivo implementar protocolos experimentais que permitissem a amplificação destes últimos, por reacções da polimerase em cadeia. Sendo seu objectivo na fase seguinte, a análise por sequenciação, dos produtos anteriormente amplificados e a pesquisa de eventuais alterações genéticas. Numa fase final procurou-se estabelecer uma relação entre os resultados obtidos após a pesquisa das alterações genéticas e a ausência da expressão da NCAM-1.

Durante este trabalho procurou-se também esclarecer qual o papel que a infecção vírica poderá representar, na linfocitose crónica das células NK CD56⁻, dos doentes em estudo.

Capítulo III

Material e Métodos

3.1. População de Doentes em Estudo

A população em estudo é composta por nove doentes de raça caucasiana, 5 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com média de idade de 60 anos, seguidos no Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António. Todos os doentes apresentam um diagnóstico de leucemia crónica de células NK-LGL e imunofenótipo CD56⁺.

3.2. Colheita e Processamento das Amostras

A colheita de sangue periférico foi feita pelo sistema vacutainer, para tubos de 4 mL com EDTA. No laboratório uma porção de sangue foi usada para a realização de esfregaço (aproximadamente 500 µL) e a restante para a separação de células mononucleares, por gradiente de densidade (lymphoprep). O pellet celular foi conservado a – 20°C.

3.3. Diagnóstico Histológico e Imunofenotípico

A avaliação da morfologia das células foi realizada por esfregaços sanguíneos corados com Leishman. Para a caracterização imunofenotípica usou-se um painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. A análise foi realizada em citómetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson, USA). O painel incluiu anticorpos contra CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD25, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD57, CD94, CD122, CD158a, CD161, HLA-DR, NKb1, TCRαβ e TCRγδ. Apenas os doentes com diagnóstico de leucemia/linfoma de células NK e fenótipo CD56⁺ foram seleccionadas para o estudo.

3.4. Extracção de Ácidos Nucleicos das Amostras

3.4.1. Extracção de DNA

A extracção e purificação do DNA foi realizada a partir do pellet celular resultante do processamento da amostra. O pellet celular foi ressuscitado em 1 ml de soro fisiológico e 200 μ L desta suspensão foram submetidos a extracção automática de DNA no sistema MagNA Pure LC (Roche Diagnostics, USA), usando o kit comercial MagNA Pure LC Total Nucleic Acids Extraction Kit (Roche Diagnostics, USA). No final da extracção obtiveram-se 100 μ L de suspensão de ácidos nucleicos.

3.4.2. Extracção de mRNA

A extracção e purificação do mRNA foi realizada a partir do pellet celular resultante do processamento da amostra. O pellet celular foi ressuscitado em 300 μ L de tampão de lise (MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I Lysis Buffer) e submetido a extracção automática de mRNA no sistema MagNA Pure LC (Roche Diagnostics, USA), usando o kit comercial MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, USA). No final da extracção obtiveram-se 50 μ L de mRNA.

3.5. Pesquisa de Genoma Viral nas Amostras

A pesquisa de genoma viral nas amostras em estudo foi realizada por PCR em tempo real sendo alvo de amplificação regiões características dos vírus em teste.

3.5.1. Pesquisa do Genoma dos Vírus Herpes Simplex-1/2 (HSV-1/2), Human Herpes-6 (HHV-6) e Citomegalovirus (CMV)

A pesquisa do genoma dos vírus HSV-1/2, HHV-6 e CMV necessitou de 5 μ L do DNA extraído, aos quais se adicionou uma mistura de 20 μ L, constituída por 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP, 1 x Primer Mix (Epoch Biosciences,

USA), 1x Probe Mix (Epoch Biosciences, USA) e 1 U de FastStart Taq (Roche Diagnostics, USA). A amplificação foi realizada no sistema de PCR em tempo-real SmartCycler (Cepheid, USA) que executou uma incubação inicial de activação enzimática a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 50 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C durante 15 segundos, hibridização a 56°C durante 40 segundos e polimerização a 72°C durante 20 segundos. Paralelamente ao DNA de cada uma das amostras, um controlo positivo para o vírus em teste, bem como um controlo negativo foram também incluídos. O procedimento, tal como foi descrito, é executado para a pesquisa dos três vírus referidos, mas a composição da mistura de reacção varia consoante o vírus em teste, uma vez que os reagentes Primer Mix e Probe Mix são específicos para cada um dos vírus.

3.5.2. Pesquisa do Genoma dos Vírus Epstein-Barr (EBV) e Varicella Zooster (VZV)

A pesquisa do genoma dos vírus EBV e VZV necessitou de 5 µL do DNA extraído, aos quais se adicionou 20 µl de uma mistura de reacção pertencente ao kit comercial Artus Amplification Kit (Artus, Alemanha). A amplificação foi realizada no sistema de PCR em tempo-real LightCycler (Roche Diagnostics, USA) que executou uma incubação inicial de activação enzimática a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 50 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C durante 15 segundos, hibridização a 56°C durante 40 segundos e polimerização a 72°C durante 20 segundos. Paralelamente ao DNA de cada uma das amostras, um controlo positivo para o vírus em teste e um controlo negativo foram também incluídos.

3.5.3. Pesquisa do Genoma do Vírus Human T-cell Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-1)

A pesquisa do genoma do vírus HTLV-1 necessitou de 5 µL do DNA extraído, aos quais se adicionou uma mistura de 20 µl, constituída por 5 mM de MgCl₂, 6 µM de cada um dos primers SK110 e SK111 (Dehée A. et al, 2002) 3 µM da sonda TaqMan (Dehée A. et al, 2002) e 1 x Hibridization Probes Mix (Roche Diagnostics, USA). A amplificação foi realizada no sistema de PCR em tempo-real LightCycler (Roche Diagnostics, USA) que executou uma incubação

inicial de activação enzimática a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C durante 10 segundos, hibridização a 65°C durante 30 segundos e polimerização a 72°C durante 40 segundos. Paralelamente ao DNA de cada uma das amostras, um controlo positivo para o HTLV-1 e um controlo negativo foram também amplificados.

3.6. Caracterização Genética do Gene CD56 da População de Doentes em Estudo

A caracterização genética do gene dos doentes em estudo foi conseguida por amplificação dos 18 exons presentes no gene CD56, seguida de sequenciação de cada um destes para cada um dos doentes.

3.6.1. Amplificação dos Exões do Gene CD56 por PCR

Na amplificação de cada um dos exões do CD56, 5 µL do DNA extraído de cada um dos doentes, e de um dador de sangue saudável, foram adicionados a 45 µL da mistura de reacção constituída por 200 mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 1 mM de MgCl₂, 1 x tampão da EXT DNA Polimerase (Finnzymes, Finlândia), 0.5 µM de cada um dos primers forward e reverse (ver tabela 3) e 1 U de EXT DNA Polimerase (Finnzymes, Finlândia). As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer, USA), que executou uma incubação inicial de desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguindo-se 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridização à temperatura indicada na tabela 3 para o par de primers a usar, durante 30 segundos e polimerização a 72°C durante 45 segundos, e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. O procedimento, tal como foi descrito, é executado para a amplificação dos 18 exões referidos, mas a composição da mistura de reacção varia consoante os exões a amplificar, uma vez que o par de primers é específico para cada um dos exões (ver tabela 3).

O produto amplificado foi analisado no sistema de electroforese capilar Agilent 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, USA).

Tabela 3. Sequência dos primers forward e reverse e temperaturas de hibridização, usados na amplificação de cada um dos exões do gene CD56.

<i>Exão</i>	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>	<i>Temperatura de hibridização (°C)</i>
1	ACTCATTCTCCGATCAGC	AGTCCACGTAAAACCACC	56
2	ACTCCACACAACCTCCTCC	GAAGCAAGTTCTAAAATGCAGC	58
3	AGCCACTGTCAGTCTGGAGG	AAGGAGAGGCCAGAGAATGC	58
4	TTCTTTGTGAGAGAAGCAGC	CTATTCAGGACCCAGAAACC	57
5	GGAAAGAGACTCAGCCACC	GCAGAGATCAGGAAGAACG	57
6	CCAAATTTTACAACCACC	CCCCATTCTCCTCTAGTCC	57
7	GAATAAGAGGTGTATGTGGACG	GGAAGTGGCAAGAAATGG	61
8	CCTTTGTTGGATAGGTGC	CAATCTGCTTTGAGTCTGC	54
9	CTGCCATAGCACTGTTGC	TTTCCTCTCTCATCCTGACC	60
10	CCCTGACCTCTACTATAACC	CCTAGAGTCAAACCTGTGC	61
11	ATCTGAGTCTGTGACCATCC	CTCACCAGATGCTTCTCC	61
12	AGCAGAAATGACAGAGATGTGC	TGATCCCAATGGAAACACC	52
13	CAGAAATAGAATTGCTGGACC	GTGTTAGCTGTCACTGAGAACC	65
14	TGAGAAAGCAAGAAAAGTGTCC	CTGCCAGACACAGAATAAGACC	54
15	TATCCTTCTTGCCGTTTCTCC	ACAAACAGAAAGCAGAGGCAGC	60
16	TCGCATCTCAGTCTGTTAACC	CAAACCTCAGCAAGGTGG	60
17	GATGAAGGGACTGAGGCAGG	GGTAGGGTGGGGAGGTGG	-
18	GGTCTCAGTGGTTCTGTTTCC	TTTGCTCGTTCTCTTACC	56

3.6.2. Sequenciação dos Exões do Gene CD56

Após a amplificação 50 µL do produto amplificado, foram purificados através de colunas Microcon (Perkin-Elmer, USA). O produto purificado foi analisado e quantificado no sistema de electroforese capilar Agilent 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, USA). Trinta nanogramas do produto purificado são utilizados para a reacção forward e para a reacção reverse do PCR assimétrico. As misturas de reacção para o PCR assimétrico têm um volume de 20 µL e são constituídas por 3.2 µM de primer forward ou reverse, 30 ng do produto purificado e 1 x Big Dye Terminator DNA Sequencing Mix (Applied Biosystems, USA). O PCR assimétrico foi realizado no termociclador Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer, USA), que executou uma incubação inicial de desnaturação a 96°C durante 5 minutos, seguindo-se 25 ciclos de amplificação com desnaturação a 96°C durante 10 segundos, hibridização a 50°C durante 5 segundos e polimerização a 60°C durante 4 minutos.

Os produtos do PCR assimétrico foram purificados através de colunas Auto Seq G-50 (Amersham Biosciences, USA) e liofilizados na centrífuga de vácuo

Concentrator (Eppendorf, USA), a 60°C durante 40 minutos. O produto liofilizado é reconstituído em 20 µL de Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, USA), incubado a 95°C durante 2 minutos e conservado a 4°C até ao momento da sequenciação. A sequenciação foi realizada no ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA), num capilar curto (47 cm x 50 µM) preenchido com o polímero Performance Optimized Polymer 6 (Applied Biosystems, USA).

3.6.3. Estudo da Frequência do Novo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) numa População de Dadores de Sangue

O estudo foi realizado em 50 dadores de sangue saudáveis e analisado em termos comparativos, para a ausência ou presença do polimorfismo, com três casos de doentes pertencentes à população em estudo e que apresentavam o referido polimorfismo. O estudo compreendeu a análise da curva de melting, do produto de amplificação contendo o exão 13, obtido para cada um dos dadores e dos três doentes. Para o efeito, a 5 µL do produto de amplificação adicionaram-se 5 µL de uma mistura constituída por: 0.2 µM sonda anchor SNP13 (5'FL-GCAGCCAGTCCGTAAGTAAAGC-3'), 0.1 µM sonda reporter SNP13 (5'Red640-AGCTGCCCCCCTTTTCCC-3'), 1 mM MgCl₂ e 1x tampão FastStart Taq DNA Polimerase (Roche Diagnostics, USA) e procedeu-se à análise de melting no sistema de PCR em tempo real LightCycler (Roche Diagnostics, USA). O sistema de PCR executa uma primeira incubação a 95°C durante 3 minutos, seguida de uma incubação a 65°C durante 3 minutos e termina com um acréscimo gradual de temperatura a 0.05°C/s até atingir os 80°C.

3.7. Estudo do Transcrito Correspondente à Isoforma de 140 KDa da NCAM-1, na População de Doentes em Estudo

O estudo do transcrito correspondente à isoforma de 140 KDa da NCAM-1 envolve uma primeira fase, onde o mRNA da amostra é convertido em cDNA, por transcrição reversa e onde a qualidade deste último é testada por amplificação do transcrito de um gene constitutivo controlo (gene da glicose-6-fosfato desidrogenase); enquanto na segunda fase é realizada a pesquisa específica da presença do transcrito da NCAM-1.

3.7.1. Transcrição Reversa do mRNA Extraído

Para a reacção de transcrição reversa 10 µl do mRNA extraído de cada um dos doentes, de um controlo do kit comercial “LC t(9;22) Quantification Kit” (Roche Diagnostics, USA) e de um dador, são desnaturados a 65°C durante 10 minutos e posteriormente adicionados a 10 µL da mistura de reacção constituída por 0.5 mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 1 x AMV- RT buffer (Promega, Madison, USA), 0.5 µM de Random Primers, 8 U/µL de AMV Reverse Transcriptase (Promega, USA) e 8 U/µL de RNase Inhibitor (Promega, USA). As reacções de transcrição reversa foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer, USA), que executou uma incubação a 37°C, durante uma hora, seguida de um passo de inactivação enzimática, a 65°C durante 10 minutos.

3.7.2. Amplificação do Transcrito da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A amplificação do transcrito da glicose-6-fosfato desidrogenase foi realizada de acordo com as instruções do kit “LC t(9;22) Quantification Kit” (Roche Diagnostics, USA), a partir de 5 µl do cDNA sintetizado. As reacções de amplificação foram realizadas no sistema de PCR em tempo-real LightCycler (Roche Diagnostics, USA) que executou uma incubação inicial de activação enzimática a 95°C durante 30 segundos, seguindo-se 45 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C durante 1 segundo, hibridização a 64°C durante 10

segundos e polimerização a 72°C durante 26 segundos. Paralelamente ao cDNA de cada uma das amostras, o controlo fornecido pelo kit e cDNA do dador, foram também amplificados.

3.7.3. Amplificação do Transcrito da Isoforma 140 KDa NCAM-1

Para a amplificação do transcrito da isoforma 140 KDa NCAM-1, foram adicionados 10 µL de cDNA de cada uma das amostras e do dador a 40 µL de uma mistura composta por 1 x PCR buffer II (Applied Biosystems, USA), 0.5 mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 2 mM MgCl₂, 8 mM de cada um dos oligonucleotidos: 23 mer (5'-CCCGATTCA TCCTTGTTC AAC-3') e 25 mer (5'-TCGGGATCCGGACTGGCTGCGTCTT-3') (De Greef et al, 1998) e 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, USA). As reacções de amplificação foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600 (Perkin-Elmer, USA), que executou uma incubação inicial de desnaturação a 95°C durante 7 minutos, seguindo-se 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização a 55°C durante 30 segundos e polimerização a 72°C durante 30 segundos e um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Capítulo IV

Resultados

4.1. Pesquisa de Genoma Viral nas Amostras

As amplificações do genoma dos vírus HSV-1/2, CMV, HHV-6, EBV e VZV, realizadas com o intuito de verificar uma associação entre a infecção por parte de um destes agentes e a Leucemia Crónica de Células NK-LGL, apresentaram resultados negativos, validados pela amplificação de controlos específicos para cada uma das diferentes reacções de amplificação. As imagens *a)*, *b)*, *c)*, *e)* e *f)* da figura 4, demonstram a ausência de amplificação de DNA vírico nas amostras dos doentes em estudo.

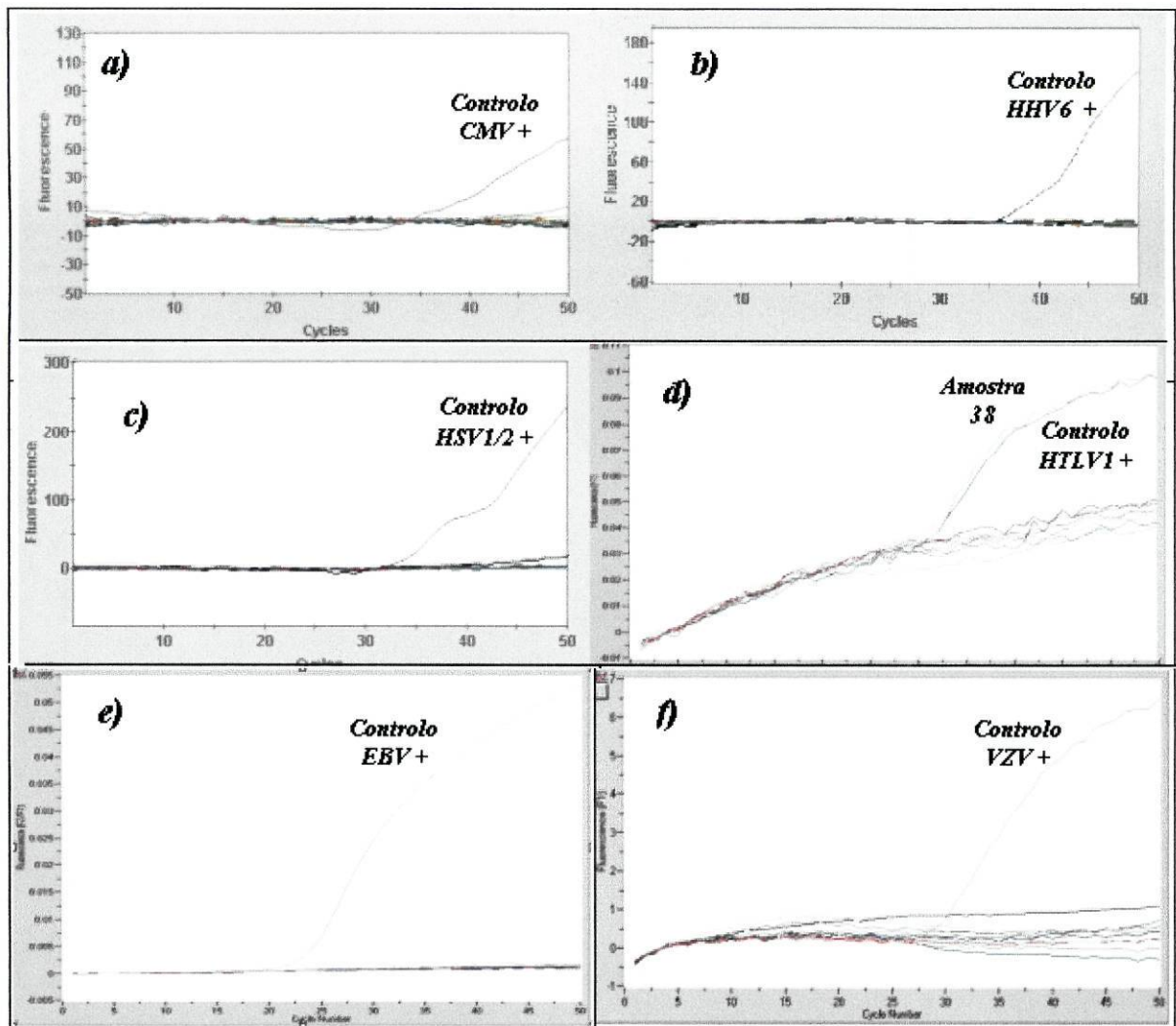


Figura 4. Curvas de amplificação dos PCR em tempo real para a pesquisa de genoma viral nas amostras em estudo. Curva de amplificação do PCR realizado para a pesquisa de *a)* CMV; *b)* HHV-6; *c)* HSV-1/2; *d)* HTLV-1; *e)* EBV e *f)* VZV.

Resultados

A imagem *d)* da figura 4, apresenta os resultados obtidos para a pesquisa de genoma do vírus HTLV-1 nas amostras do grupo em estudo. Tal como acontece para os vírus anteriormente referidos, os resultados são negativos, exceptuando-se a amostra do caso 33, que apresenta uma curva de amplificação semelhante à do controlo positivo. Assim de entre os nove casos de leucemia de células NK-LGL estudadas, apenas um tem associada uma infecção vírica por HTLV-1.

4.2. Estudo do Transcrito correspondente à Isoforma de 140KDa da NCAM-1

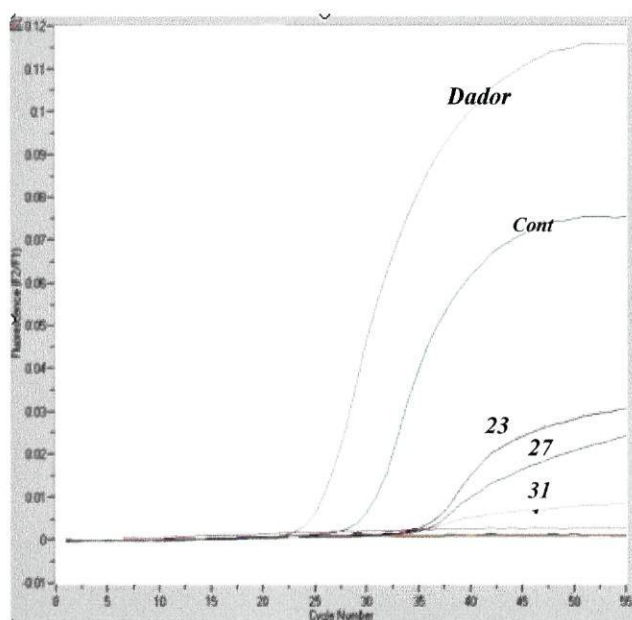


Figura 5. Amplificação do transcrito da glicose-6-fosfato desidrogenase, a partir do cDNA dos dentes em estudo.

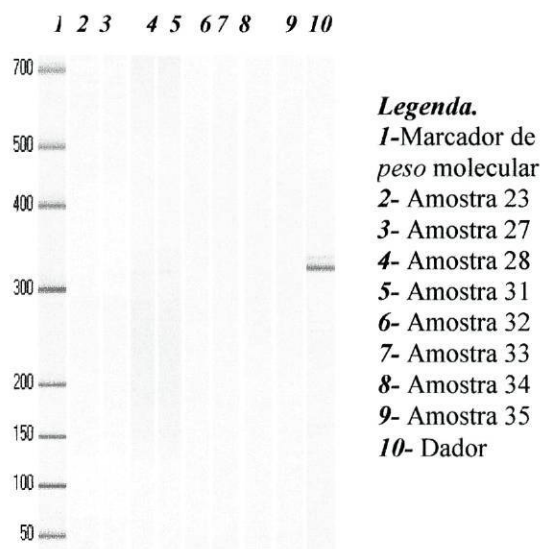


Figura 6. Amplificação do transcrito da isoforma 140 KDa, a partir do cDNA dos doentes em estudo.

Com o objectivo de determinar se o gene CD56 estaria a ser transcrito nas células CD56⁺, dos doentes em estudo, realizou-se uma transcrição reversa seguida de um PCR, com primers específicos para a NCAM-1. Para excluir a possibilidade de falsos negativos e a possibilidade de degradação do mRNA, paralelamente ao PCR acabado de referir, realizou-se um PCR específico para a glicose-6-fosfato

desidrogenase. O resultado deste último mostra que apenas as amostras dos doentes 23, 27 e 31, não sofreram degradação do mRNA, sendo por esta razão as únicas relevantes para o estudo da presença do transcrito da NCAM-1 (figura 5).

A reacção de PCR específica para a NCAM-1, que amplifica um produto de 320 bp, mostrou que nas células CD56⁻ dos doentes 23, 27 e 31, de facto não há síntese do transcrito NCAM-1 (figura 6).

4.3. Caracterização Genética do Gene CD56 da População de Doentes em Estudo

4.3.1. Amplificação dos Exões do Gene CD56 por PCR

A reacção da polimerase em cadeia permitiu a amplificação de 17 das 18 regiões codificantes que estão presentes no gene CD56, na quase totalidade das amostras pertencentes aos doentes em estudo. A escassez do material genético disponível nos casos das amostras dos doentes 23, 27, 34, 35 e 38, impossibilitou o estudo de algumas regiões do gene CD56, para estes doentes. No caso dos doentes 23 e 34 não foi possível o estudo do exão 12; no caso do doente 27, o estudo dos exões 8 e 12; no caso do doente 35, o estudo dos exões 4, 12 e 15; e no caso do doente 38, o estudo dos exões 5, 6, 9, 13, 14, 15, 16 e 18 (ver tabela 4).

O exão 17 do gene CD56 não foi estudado em nenhum dos casos, devido a dificuldades na definição das condições que permitissem a amplificação, por PCR dessa região.

As imagens *b)* das figuras 7 a 23, mostram os produtos de amplificação obtidos para o estudo das 17 regiões anteriormente referidas, cujos pesos moleculares variam entre os 178 bp e os 464 bp.

Tabela 4. Resultados obtidos, após o estudo por PCR e sequenciação dos exões do gene CD56.

Exão	Amostra								
	23	27	28	31	32	33	34	35	38
1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N	N
6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N
7	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
8	WT	N	WT	WT	WT	WT	WT	N	WT
9	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N
10	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
12	N	N	WT	WT	WT	WT	N	N	WT
13	WT	WT	WT	WT	C->A	C->A	C->A	WT	N
14	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N
15	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N	N
16	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	N
17	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18	WT	WT	WT	WT	M	WT	WT	WT	N

Legenda: WT – genótipo Wild Type; M – alteração cromossômica; C->A – substituição de uma citosina por uma adenina no nucleótido 273865 ; N - estudos não realizados.

4.3.2. Análise por Sequenciação dos Exões do Gene CD56

A pesquisa de alterações nucleotídicas, nas 17 regiões em estudo, foi realizada por comparação das sequências obtidas para cada exão (imagens *a*) figuras 7 a 23) entre os doentes, um dador saudável e a sequência publicada para o produto de PCR que amplifica a região do exão em causa. As imagens *c*) das figuras 7 a 23, mostram o alinhamento de todas as sequências que apresentam 100% de homologia entre si. Nesta condição estão todas as sequências obtidas para o dador (que funcionou como um controlo normal da análise por sequenciação) e a grande maioria das sequências dos doentes em estudo. Fora desta condição ficam algumas sequências obtidas para os doentes 32, 33 e 34, que revelaram possuir alterações face à sequência normal do gene CD56. A tabela 4 apresenta o resumo dos resultados obtidos, por doente e para cada exão em estudo, após a conclusão da análise das sequências.

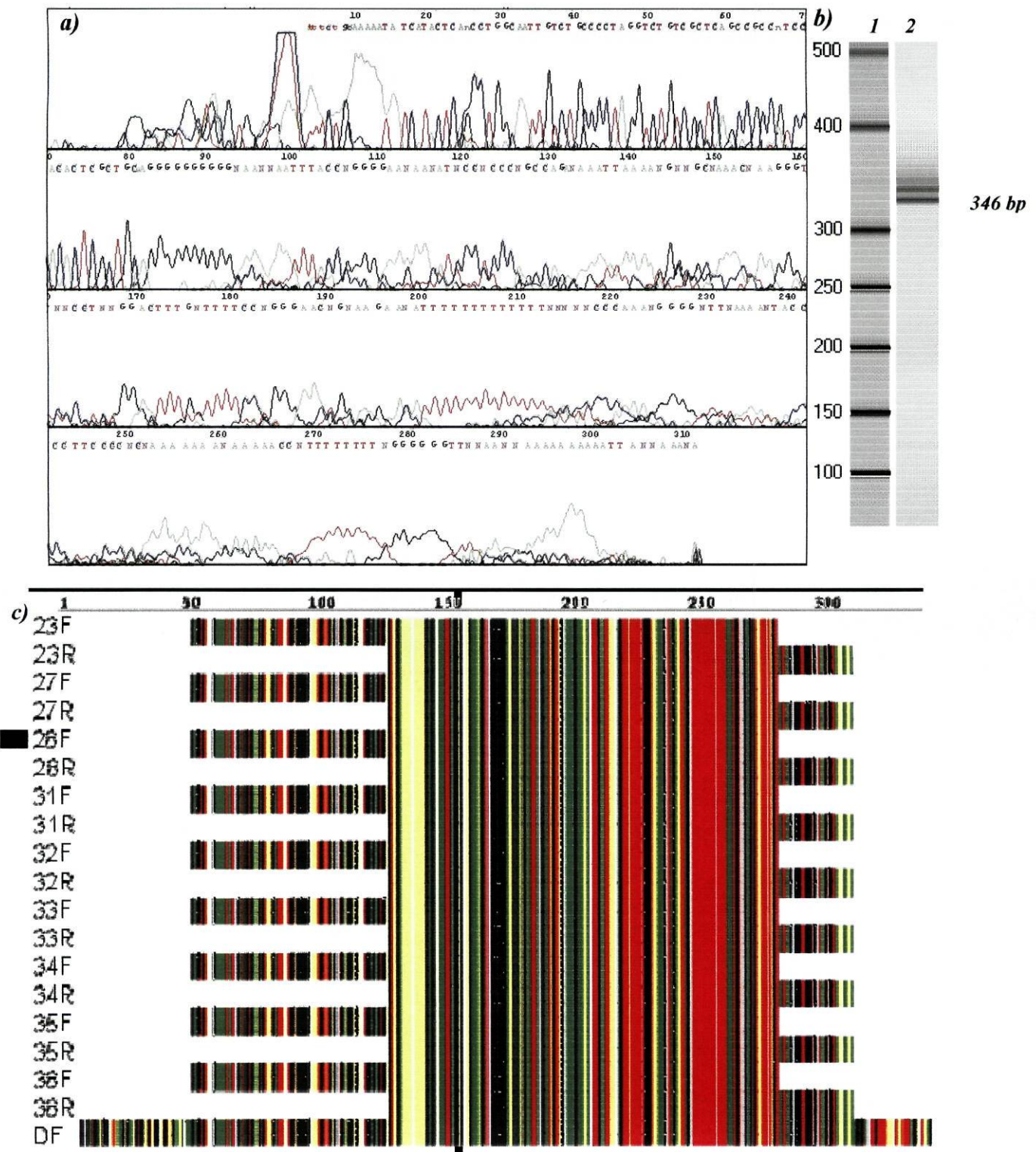


Figura 7. Resultados da amplificação e seqüênciação do exão 1 do gene CD56. *a)* Cromatograma da seqüência que contém o exão 1. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 1 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das seqüências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38. R-seqüência obtida com o primer reverse, F-seqüência obtida com o primer forward.

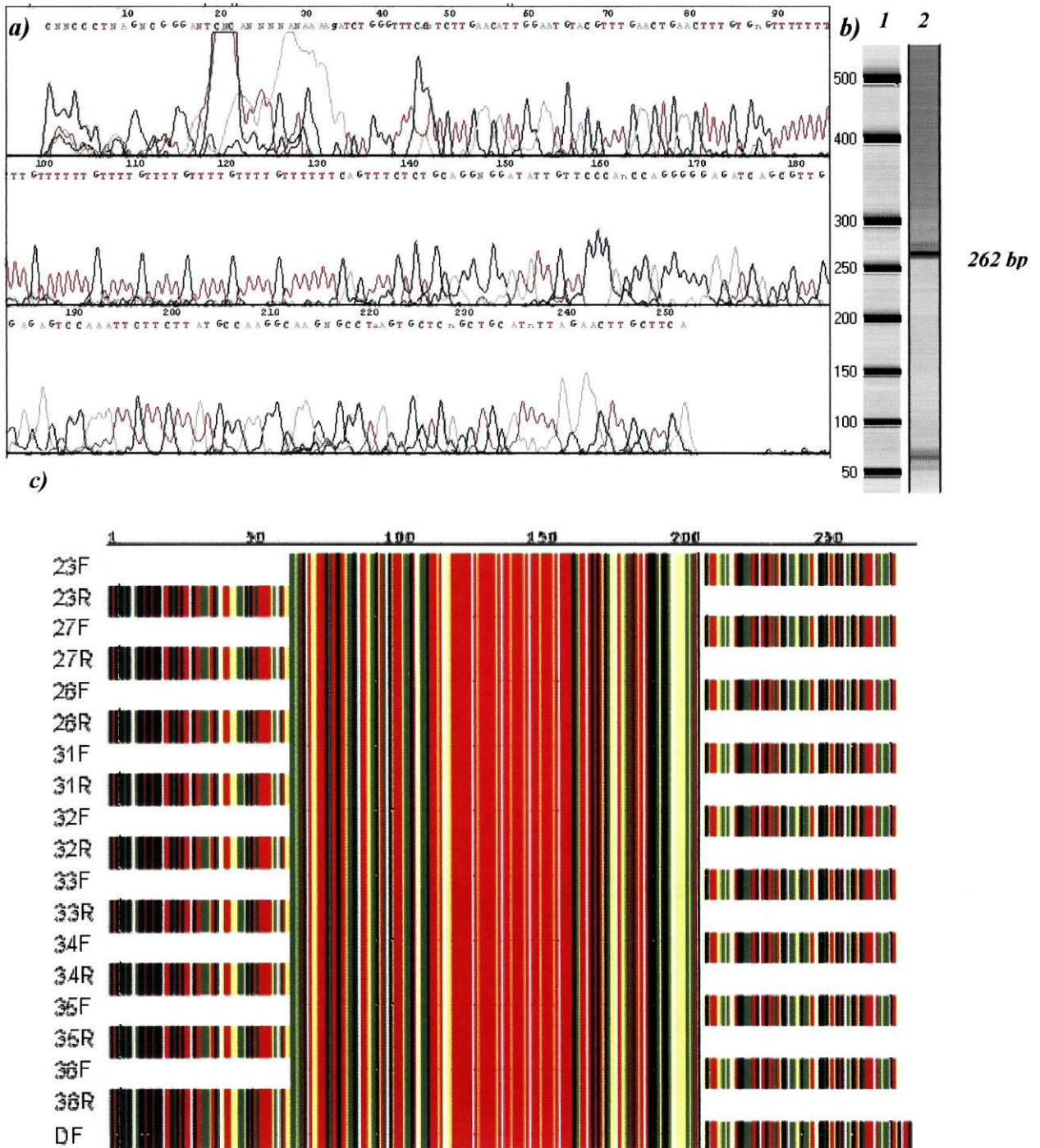


Figura 8 Resultados da amplificação e sequenciação do exão 2 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 2. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 2 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

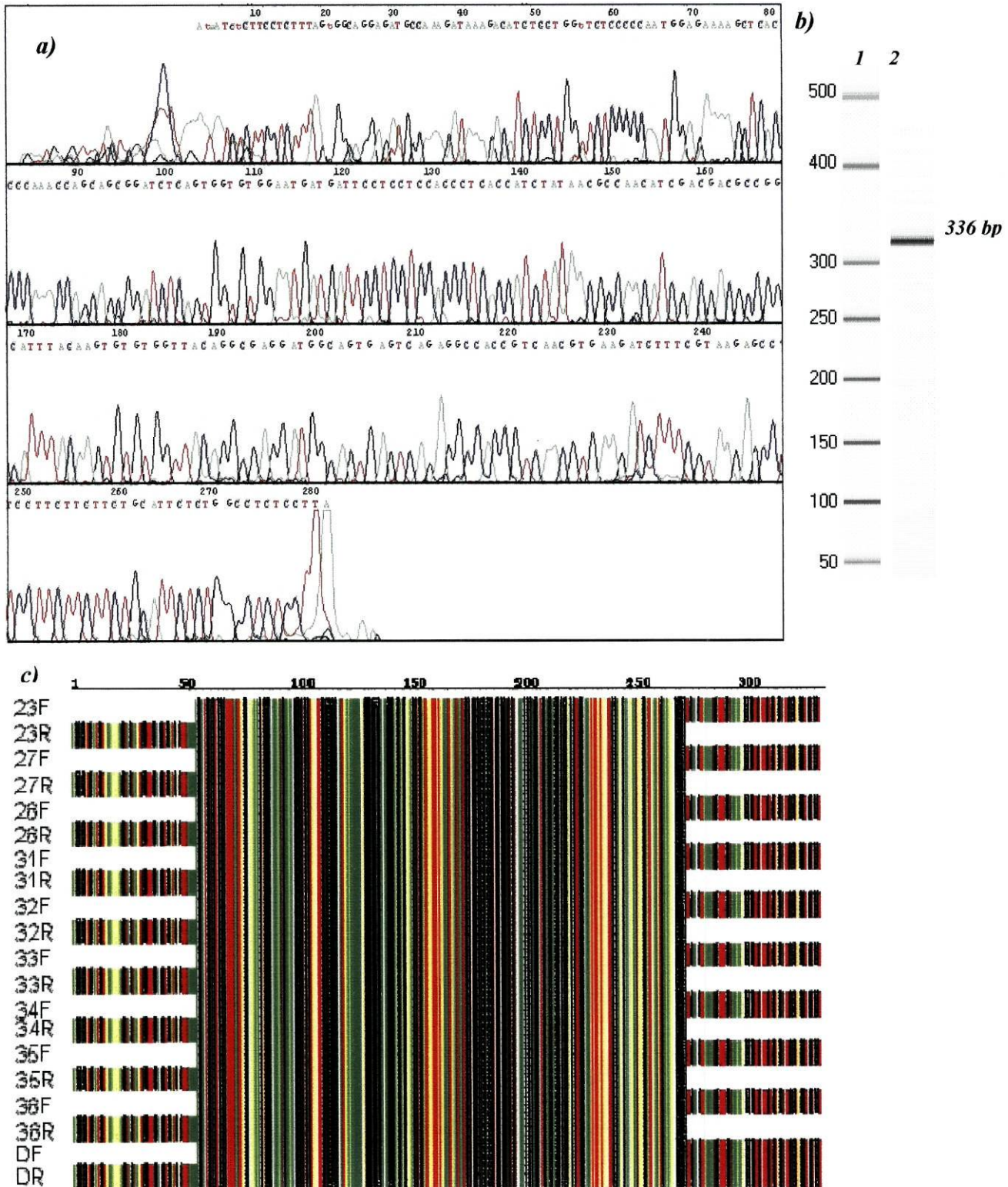


Figura 9. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 3 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 3. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 3 (coluna 1- marcador de peso molecular, cpluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

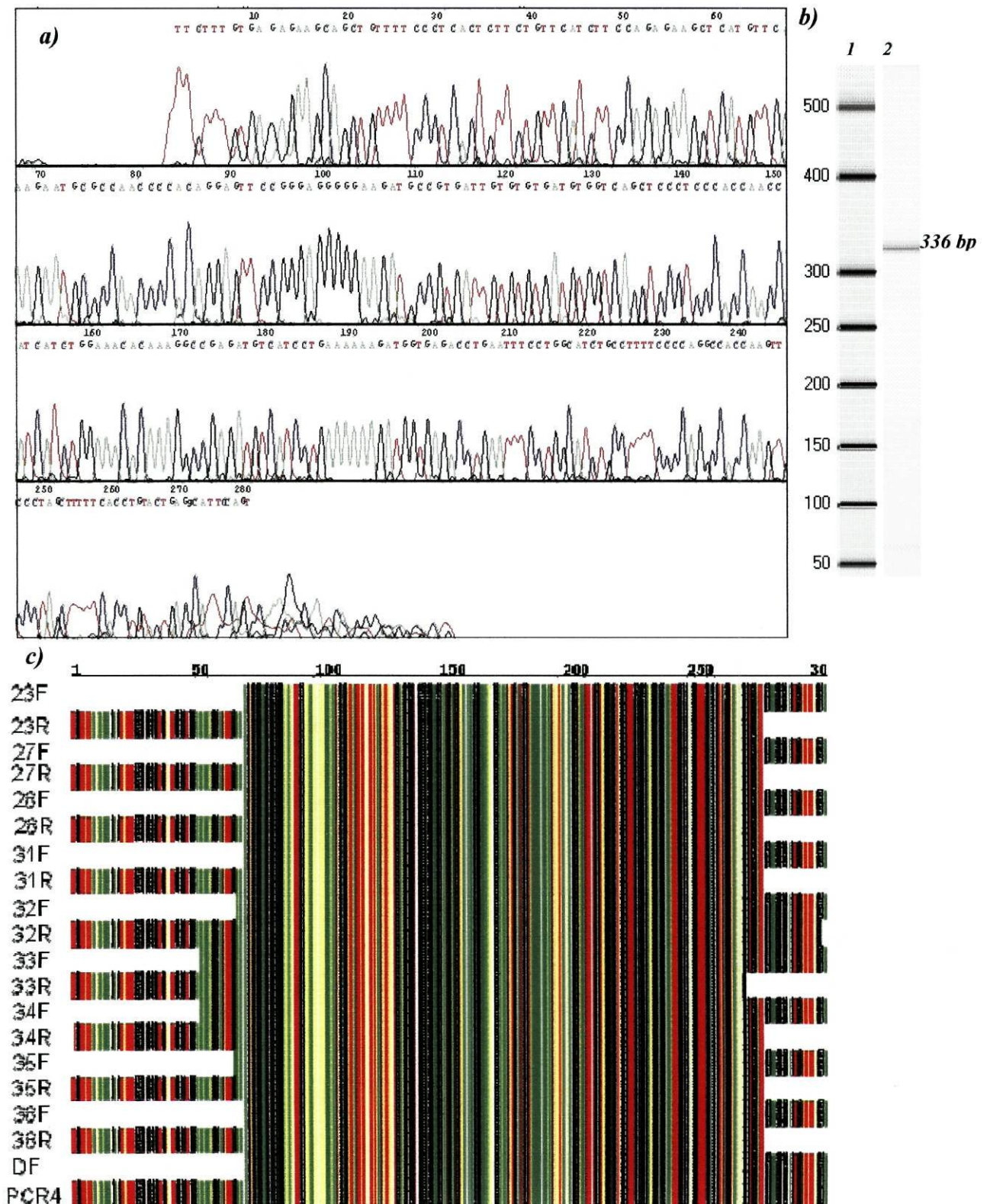


Figura 10. Resultados da amplificação e seqüenciação do exão 4 do gene CD56. *a)* Cromatograma da seqüencia que contém o exão 4. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 4 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das seqüencias obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38. R-seqüencia obtida com o primer reverse, F-seqüencia obtida com o primer forward.

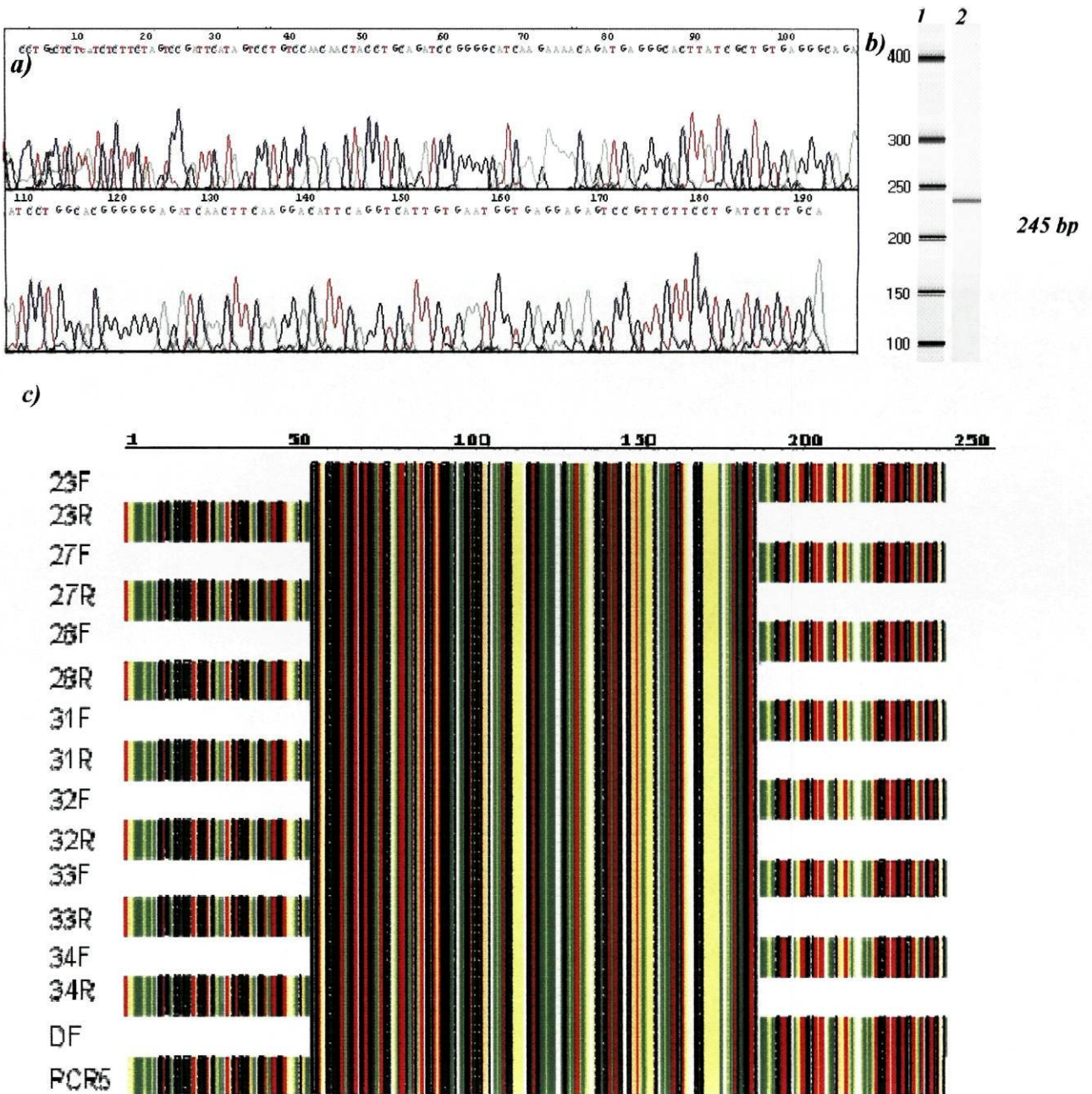


Figura 11. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 5 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 5. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 5 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33 e 34. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

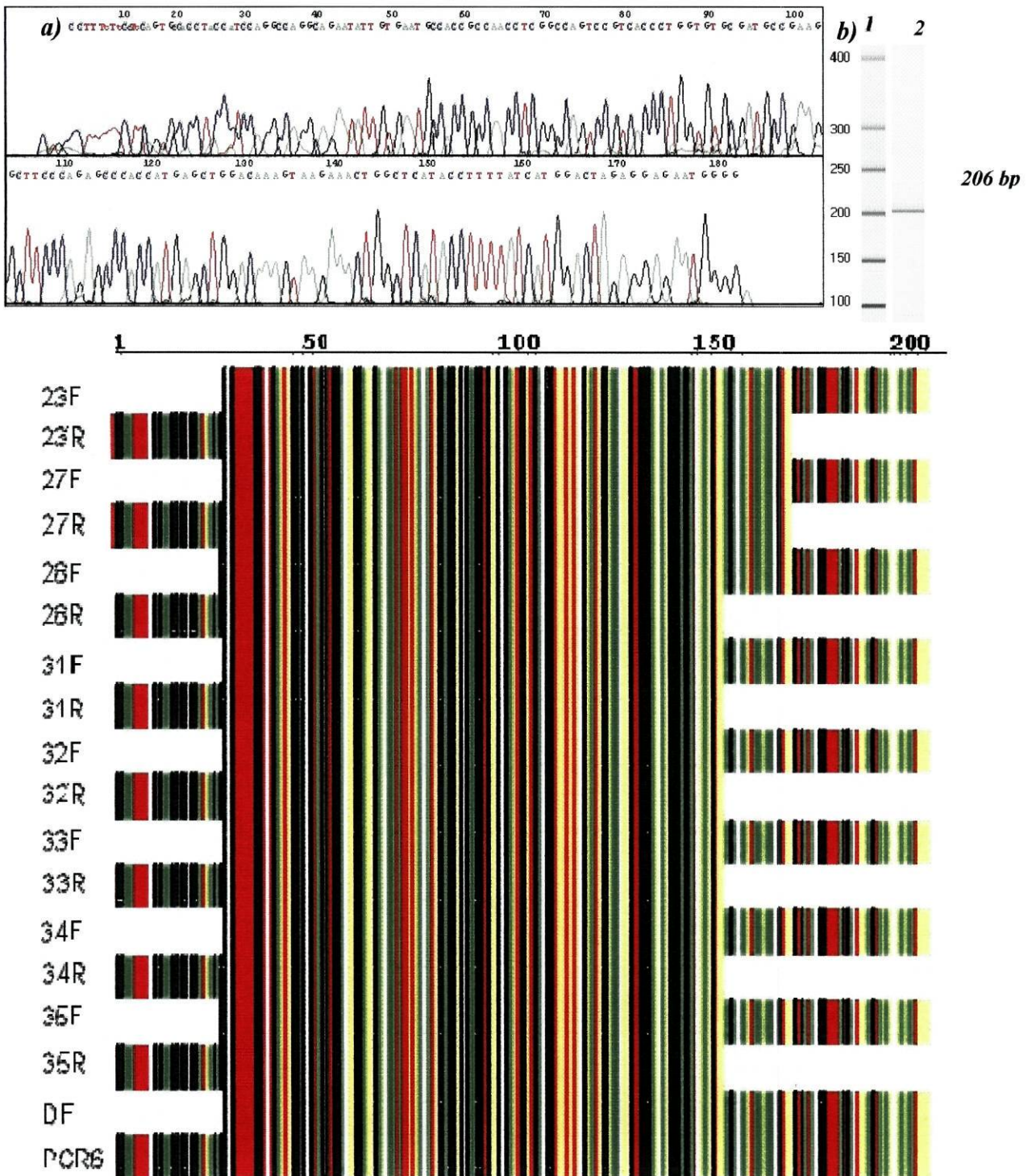


Figura 12. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 6 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 6. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o 6 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

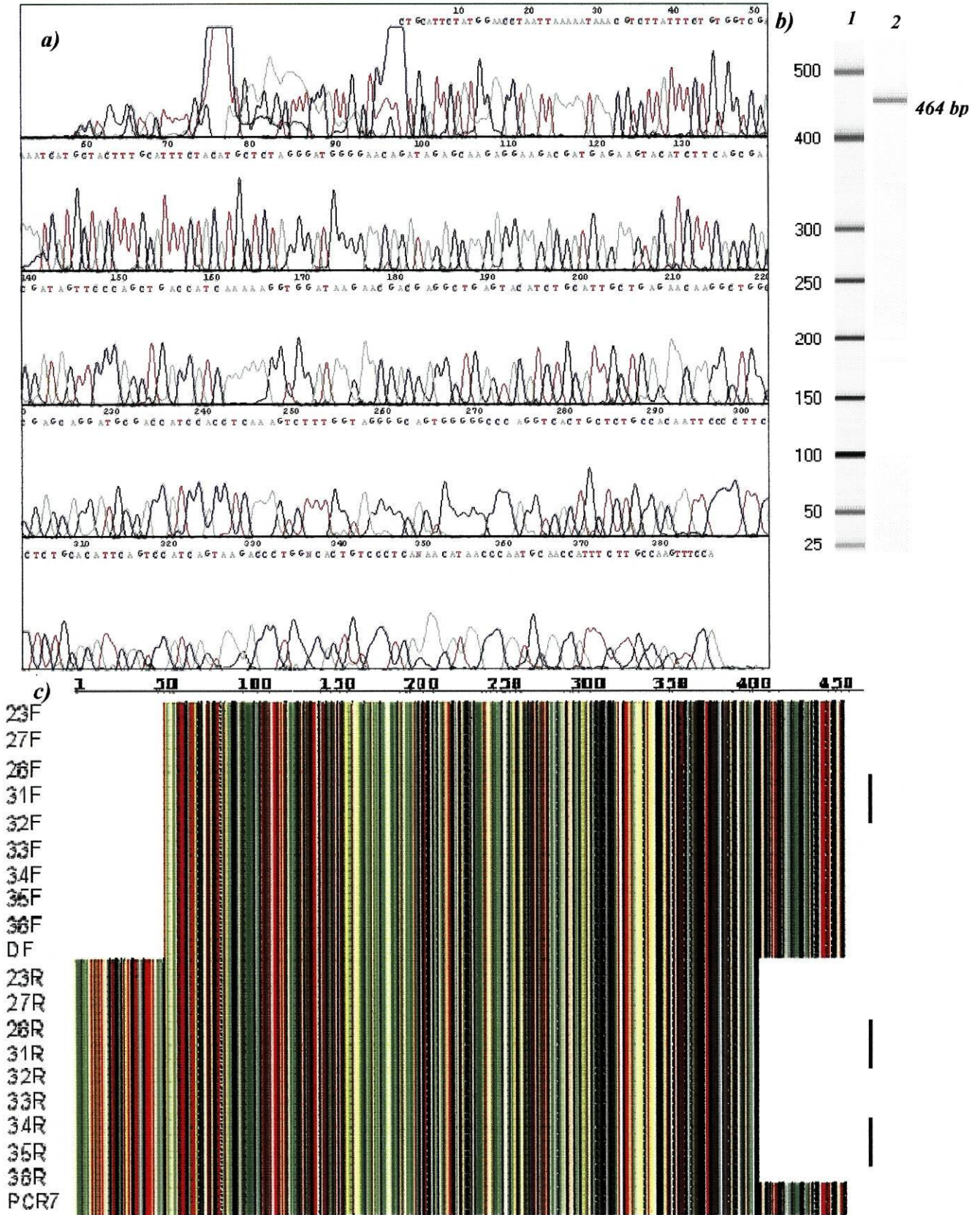


Figura 13. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 7 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 7. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 7 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 55 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

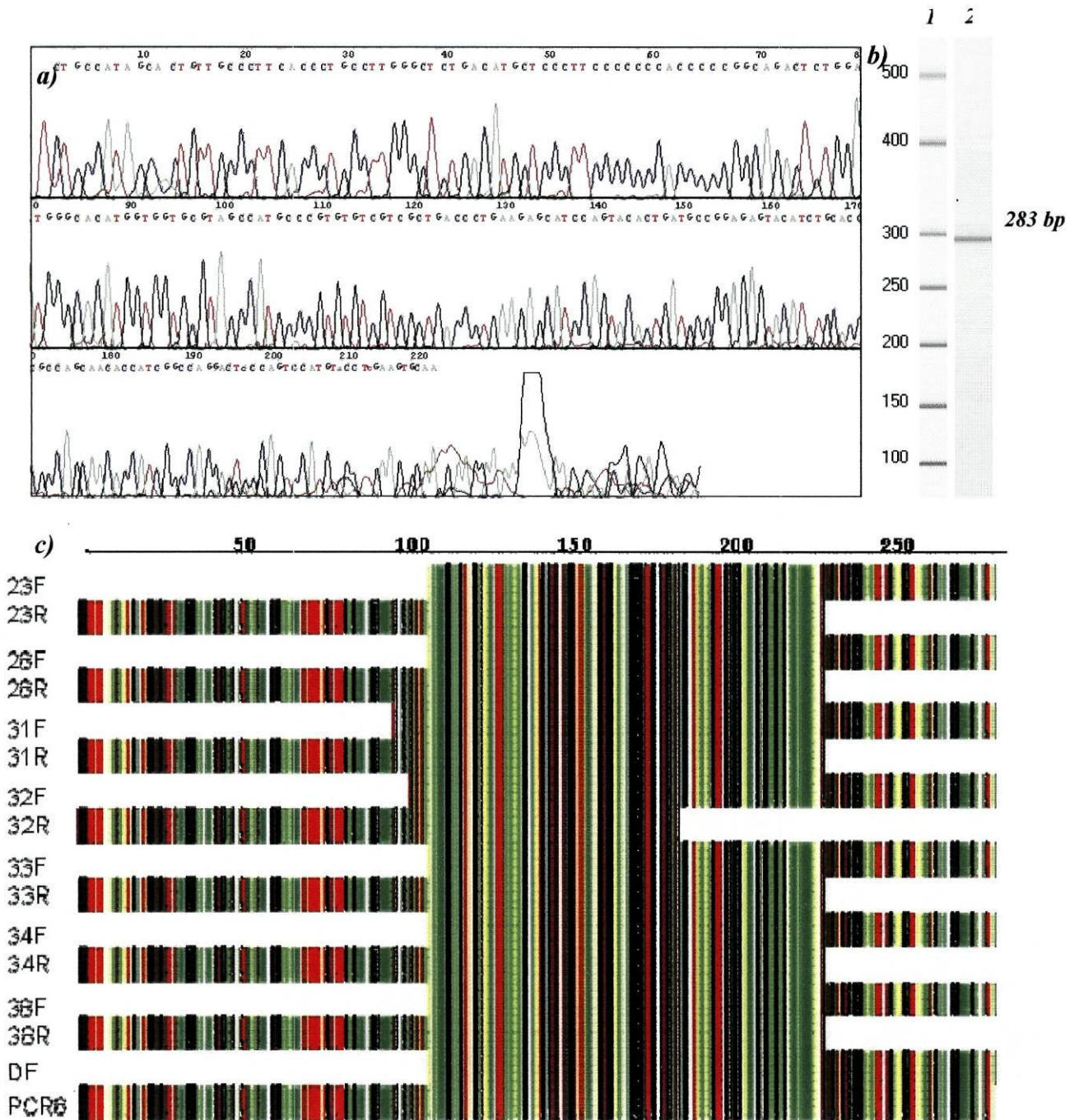


Figura 14. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 8 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 8. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 8 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 28, 31, 32, 33, 34 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

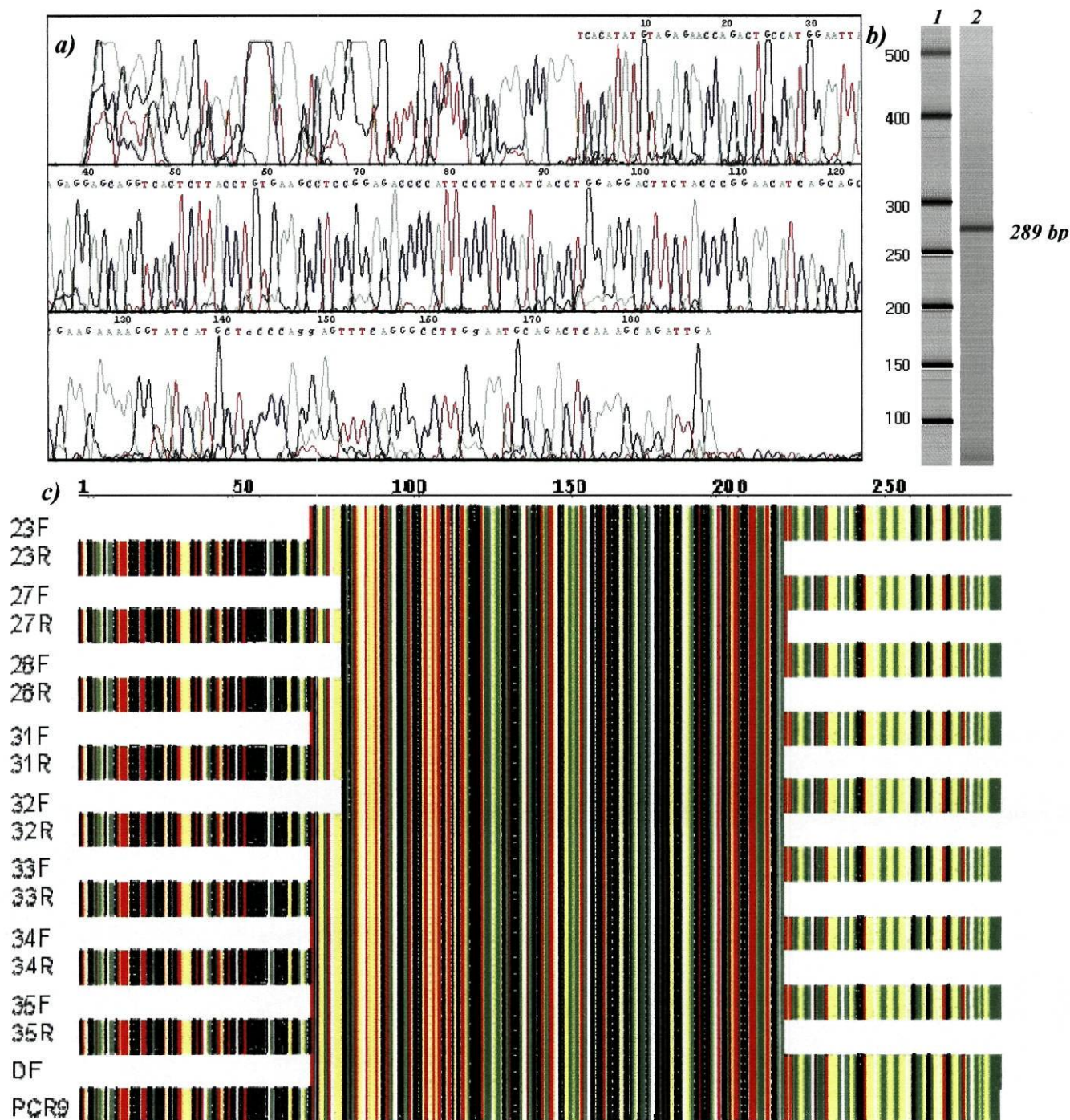


Figura 15. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 9 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 9. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 9 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

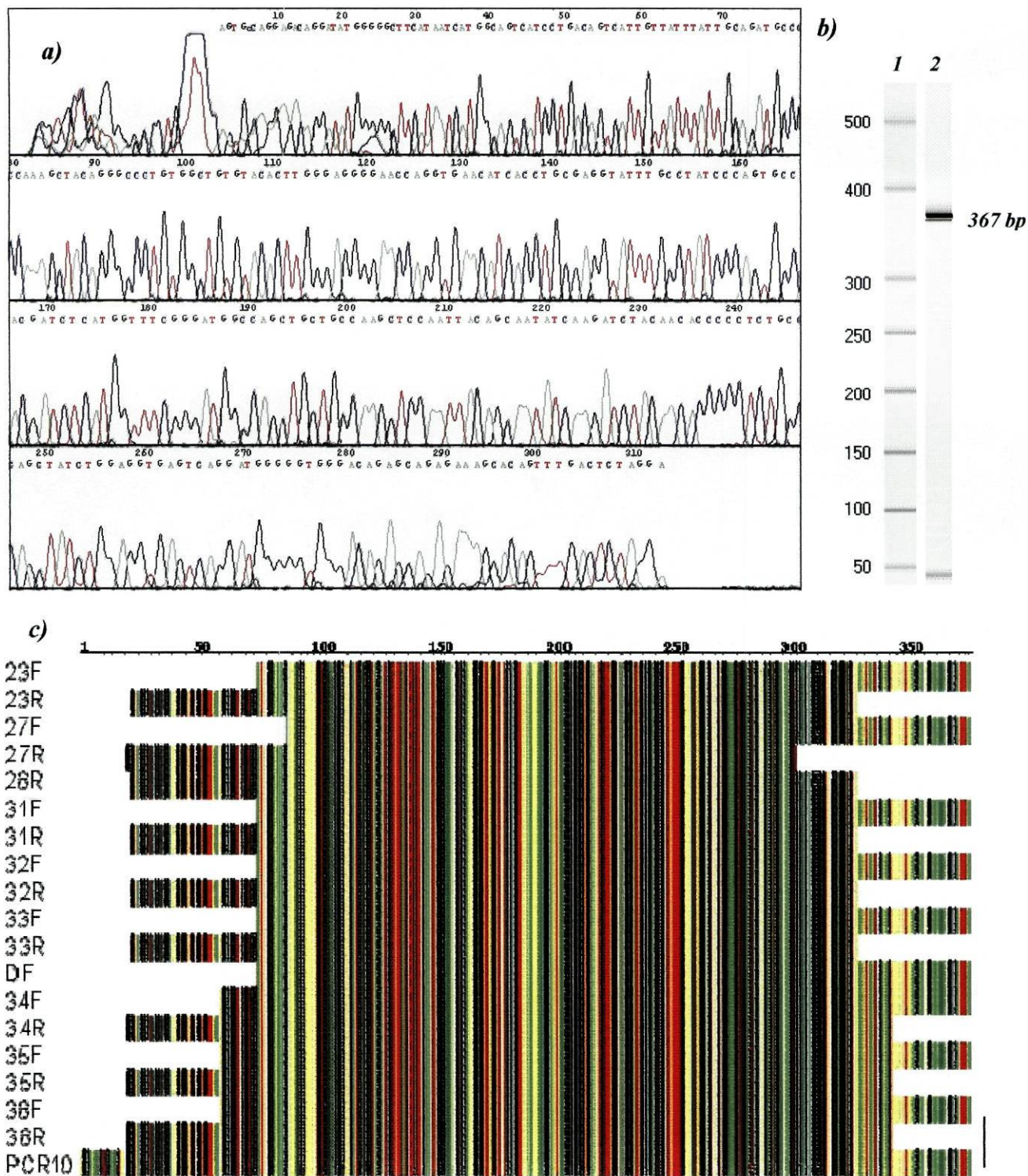


Figura 16. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 10 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 10. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 10 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38.

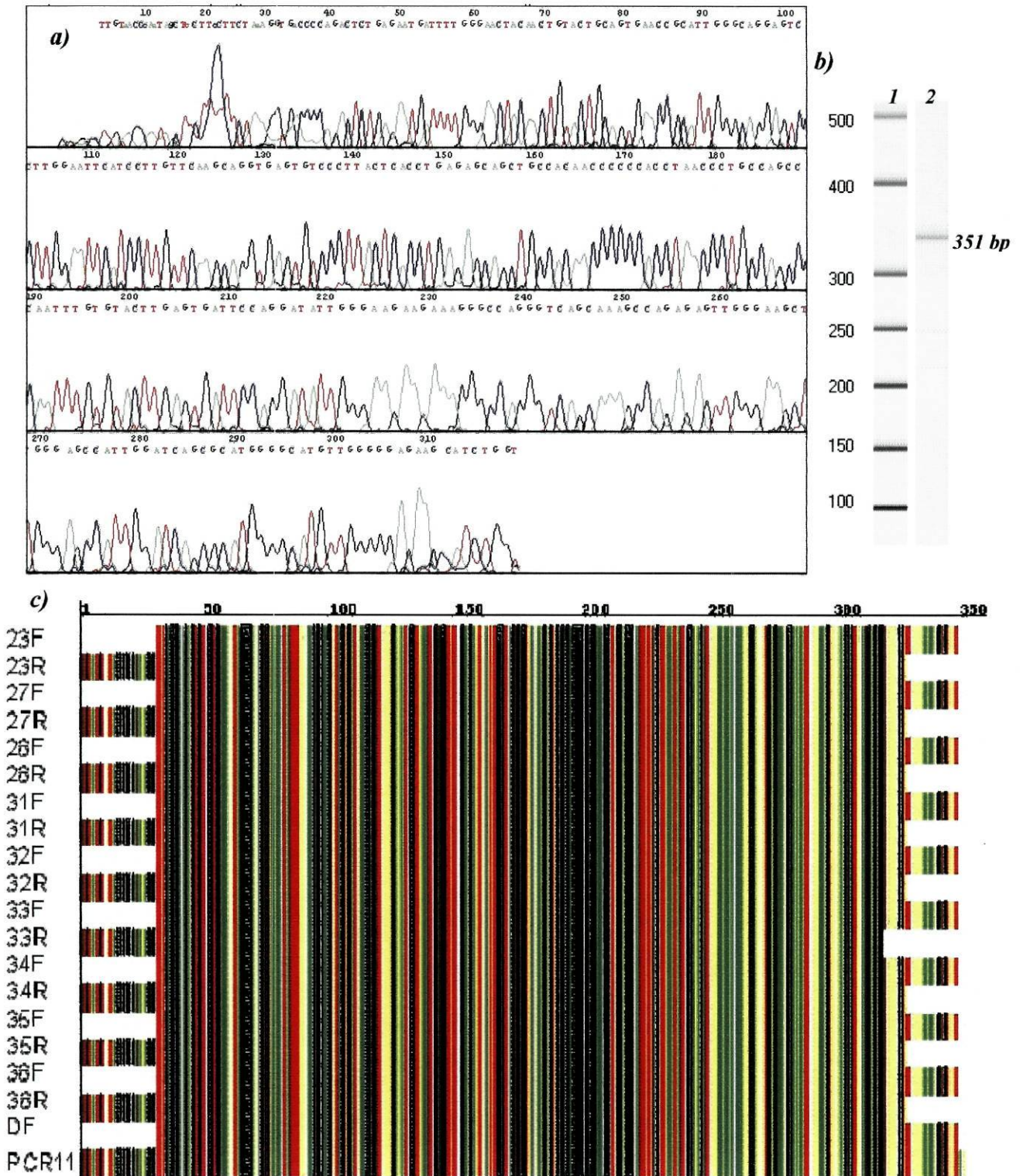


Figura 17. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 11 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 11. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 11 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

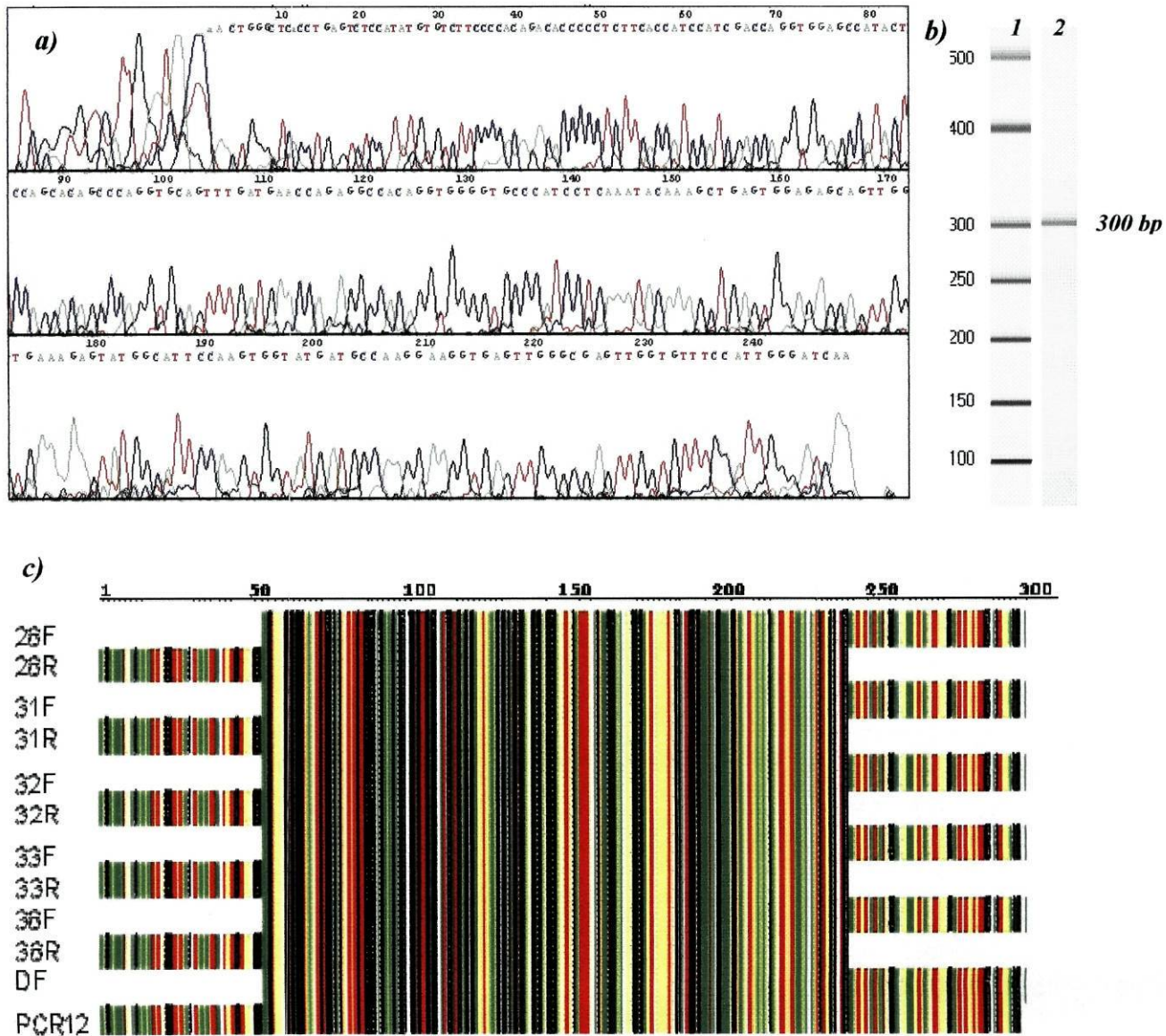


Figura 18. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 12 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 12. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 12 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 28, 31, 32, 33 e 38. R-sequência obtida com o primer reverse. F-sequência obtida com o primer forward.

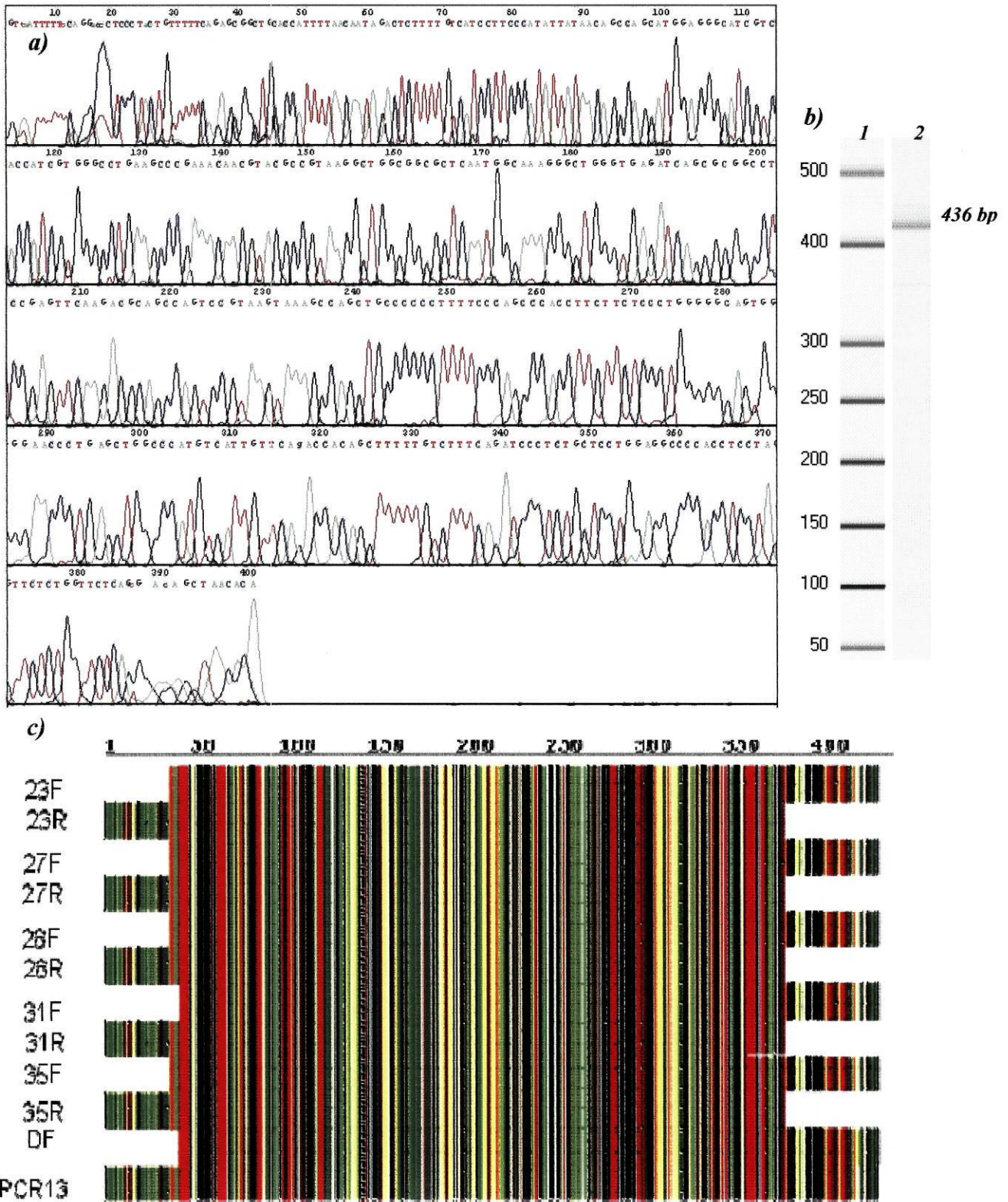


Figura 19. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 13 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 13. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 13 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

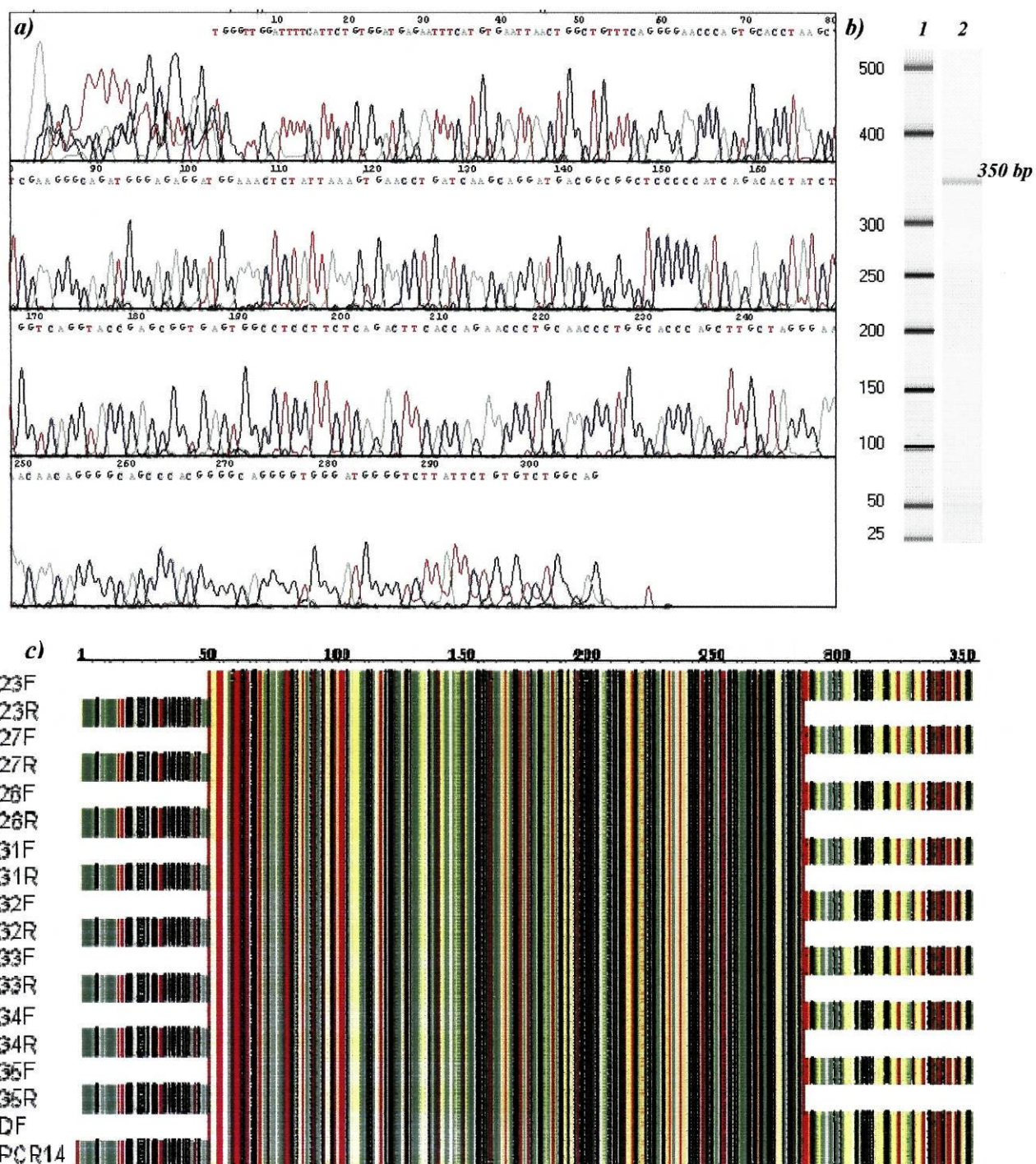


Figura 20. Resultados da amplificação e sequencição do exão 14 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 14. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 14 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

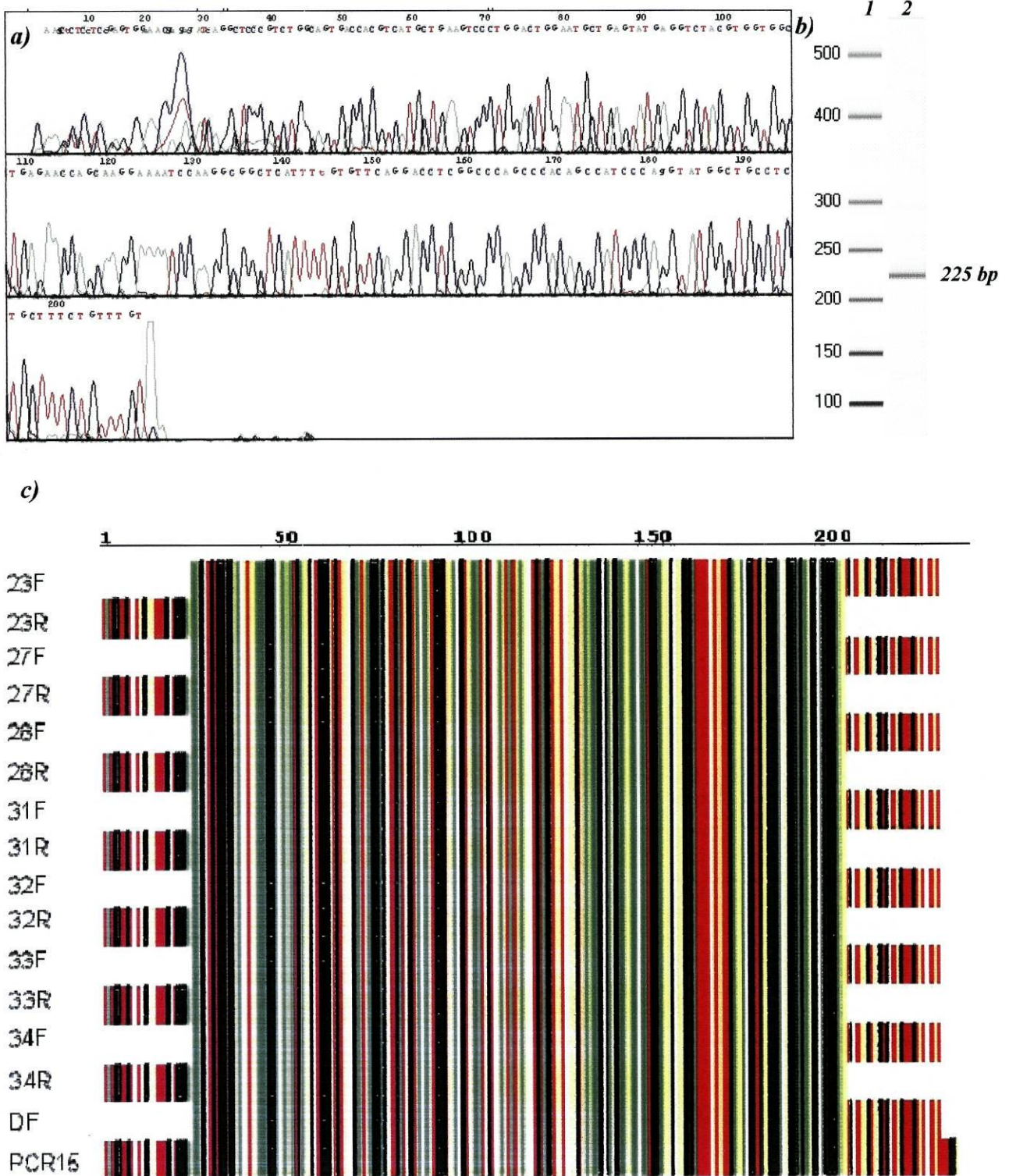


Figura 21. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 15 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 15. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 15 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33 e 34. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

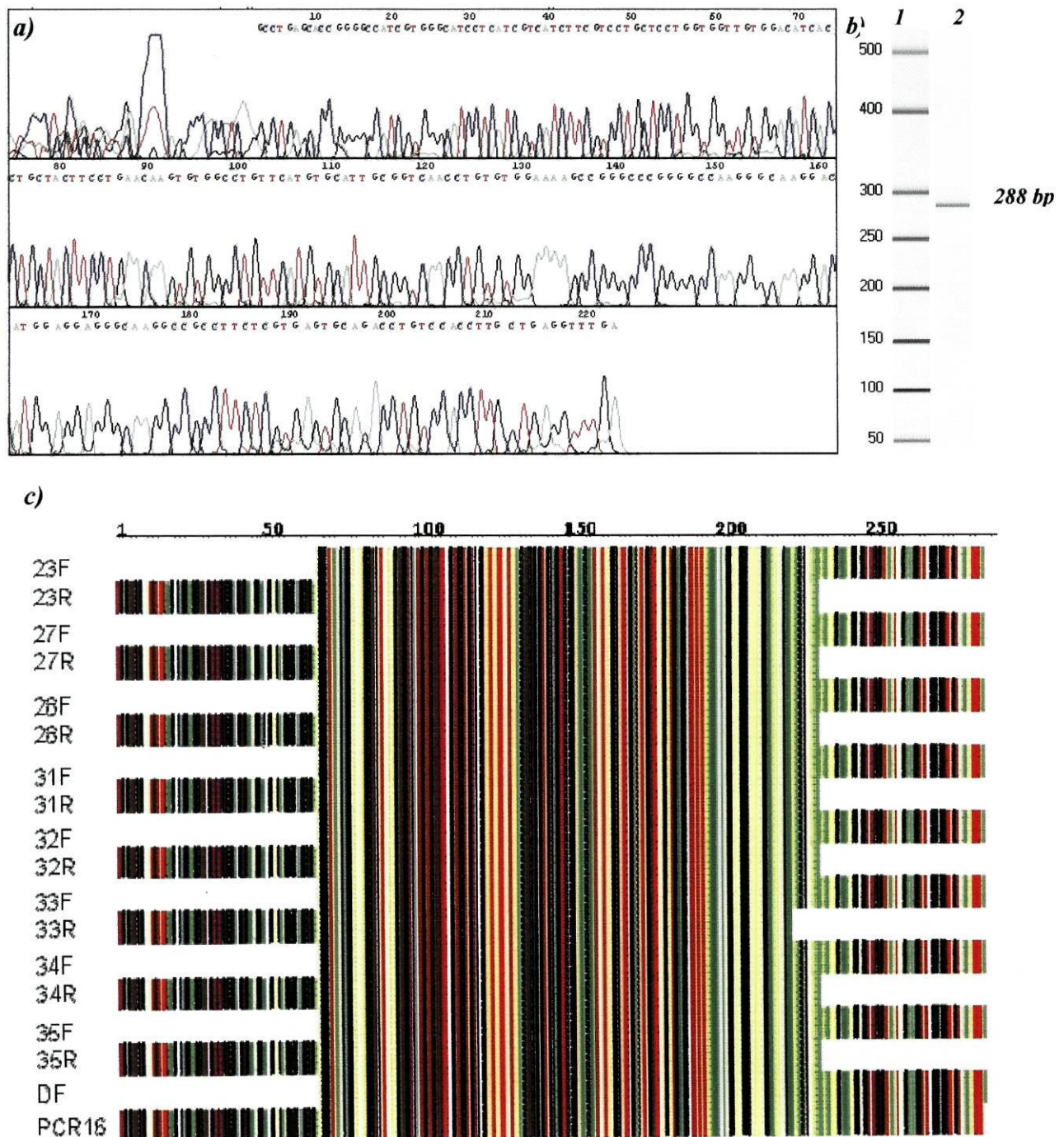


Figura 22. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 16 do gene CD56. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 16. **b)** Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 16 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). **c)** Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

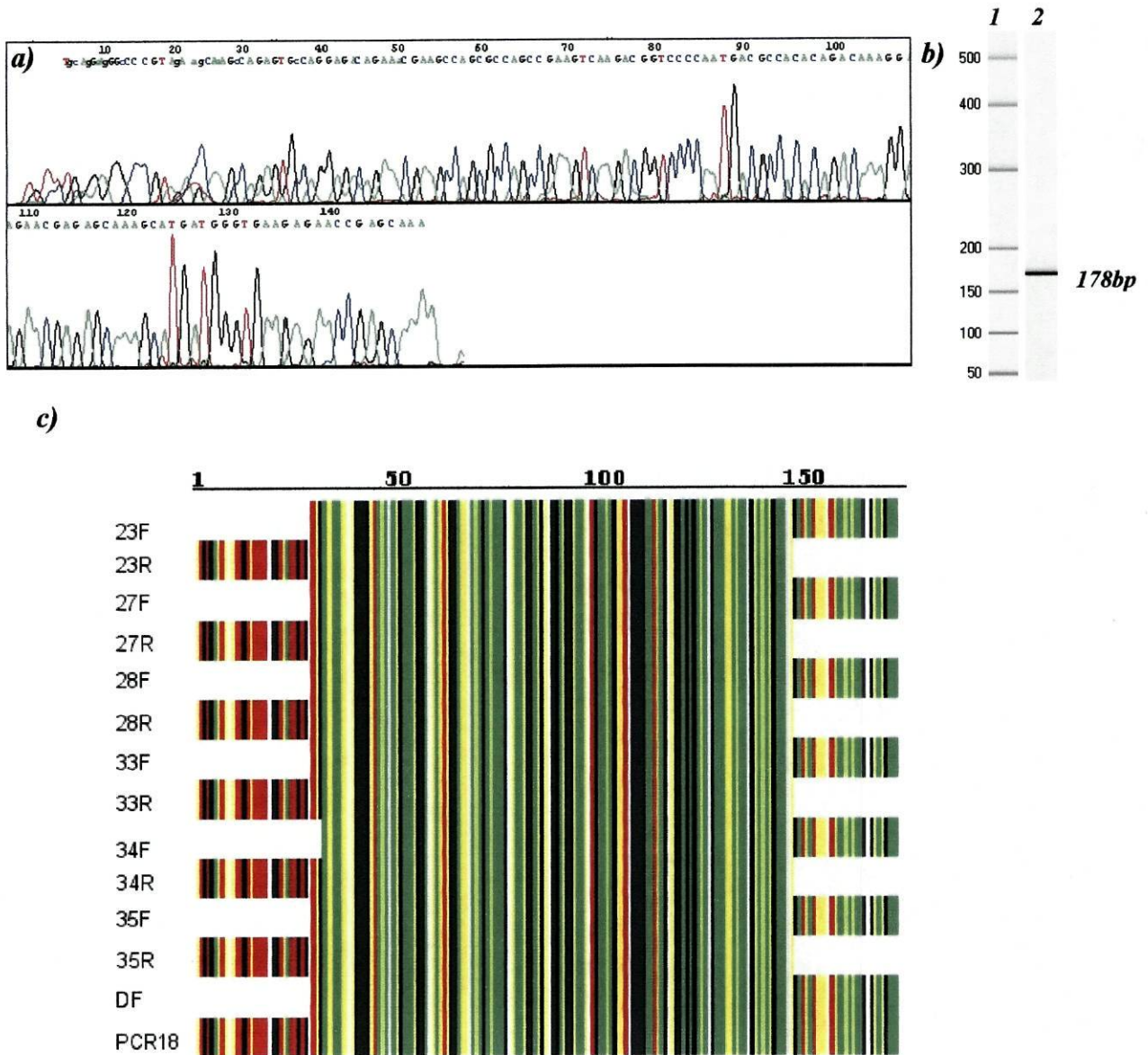


Figura 23. Resultados da amplificação e sequenciação do exão 18 do gene CD56. *a)* Cromatograma da sequência que contém o exão 18. *b)* Representação da electroforese capilar do produto da amplificação da região que contém o exão 18 (coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2 – produto do PCR). *c)* Alinhamento das sequências obtidas para o dador (D), doentes 23, 27, 28, 33, 34 e 35. R-sequência obtida com o primer reverse, F-sequência obtida com o primer forward.

Conforme é referido na tabela 4, os doentes 32, 33 e 34, não apresentam um fenótipo normal, no que diz respeito à sequência que compreende o exão 13, do gene CD56. A análise das sequências, para este exão, nesses doentes, mostrou que há uma diferença entre elas e a sequência publicada, para a região em causa. As sequências dos doentes 32, 33 e 34 diferem da sequência publicada e da sequência do dador, no nucleótido número 273865 (numeração de acordo com o contig NT_035088.1) do gene CD56. Enquanto que no genótipo “wild type” o nucleótido presente nessa posição é uma citosina (C), nos casos dos doentes 32, 33 e 34, a citosina é substituída por uma adenina (A) (ver figura 24). A frequência com que este polimorfismo surge na população normal foi estudada procurando a sua presença numa população de 50 dadores de sangue. O uso de sondas FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), complementares à sequência normal presente nos dadores, permitiu verificar que nenhum dos dadores em estudo apresenta troca de C por A na posição 273865. A figura 25 mostra a diferença das temperaturas de melting (T_m), das sondas FRET, quando hibridizadas com um dador e quando hibridizadas com um dos doentes anteriormente referidos. No caso dos doentes referidos a menor T_m ($74,2^\circ\text{C}$), em relação à T_m de $75,8^\circ\text{C}$ dos dadores (figura 25), corresponde à menor estabilidade entre sondas e sequência, provocada pelo “mismatch” no nucleótido 273865, que ocorre em todos os doentes.

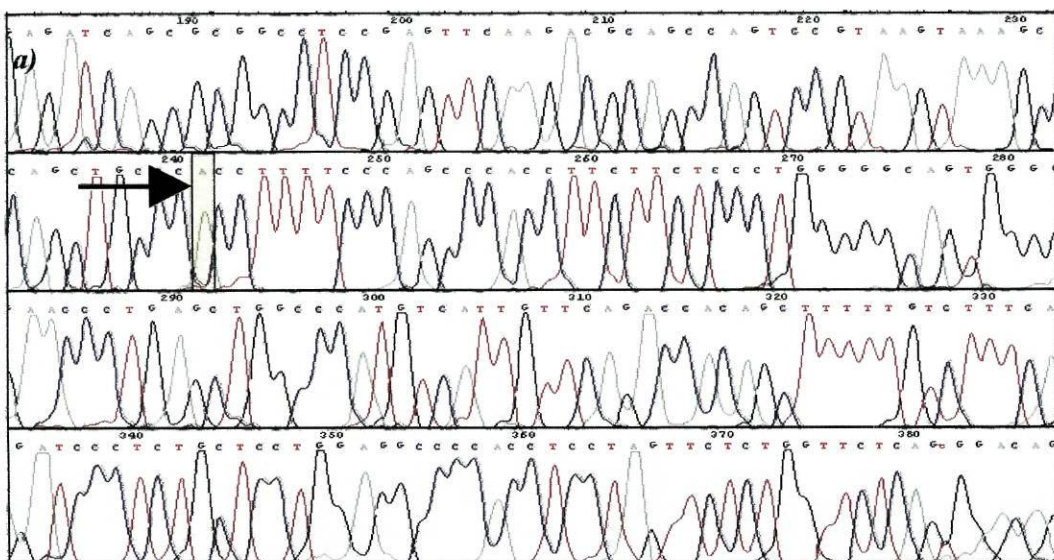


Figura 24. Resultados da sequenciação do exão 13 do gene CD56, para as amostras 32, 33 e 34. **a)** Cromatograma da sequência que contém o exão 13, assinalado com \rightarrow encontra-se o local onde a citosina é substituída pela adenina, no nucleótido 273865.

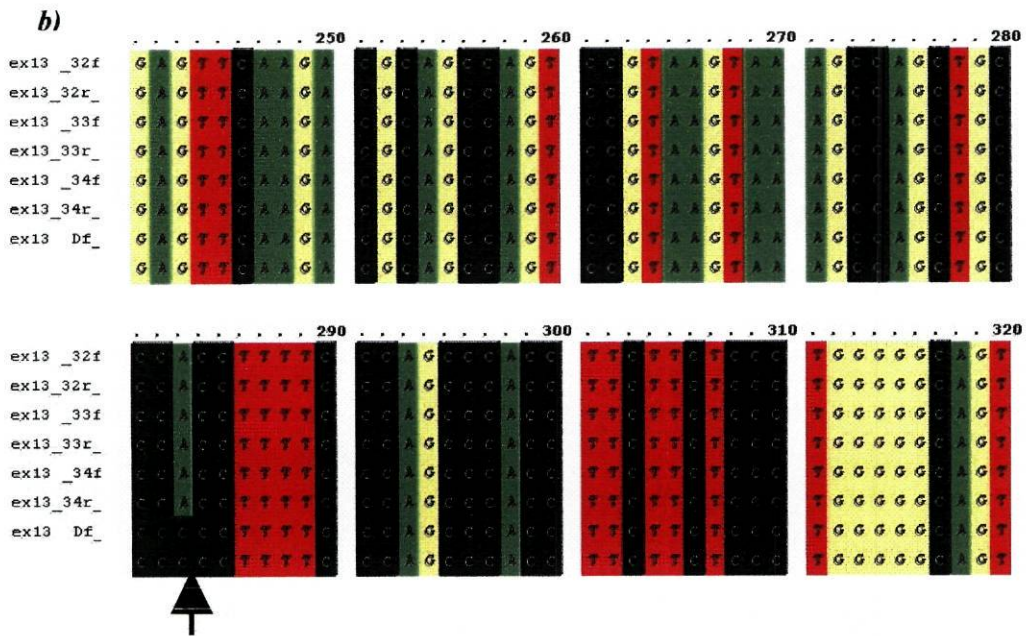


Figura 24 (continuação). Resultados da sequenciação do exão 13 do gene CD56, para as amostras 32, 33 e 34. **b).** Alinhamento das sequências obtidas para o dador, doentes 32, 33 e 34, assinalado com encontra-se o local onde a citosina é substituída pela adenina, no nucleótido 273865.

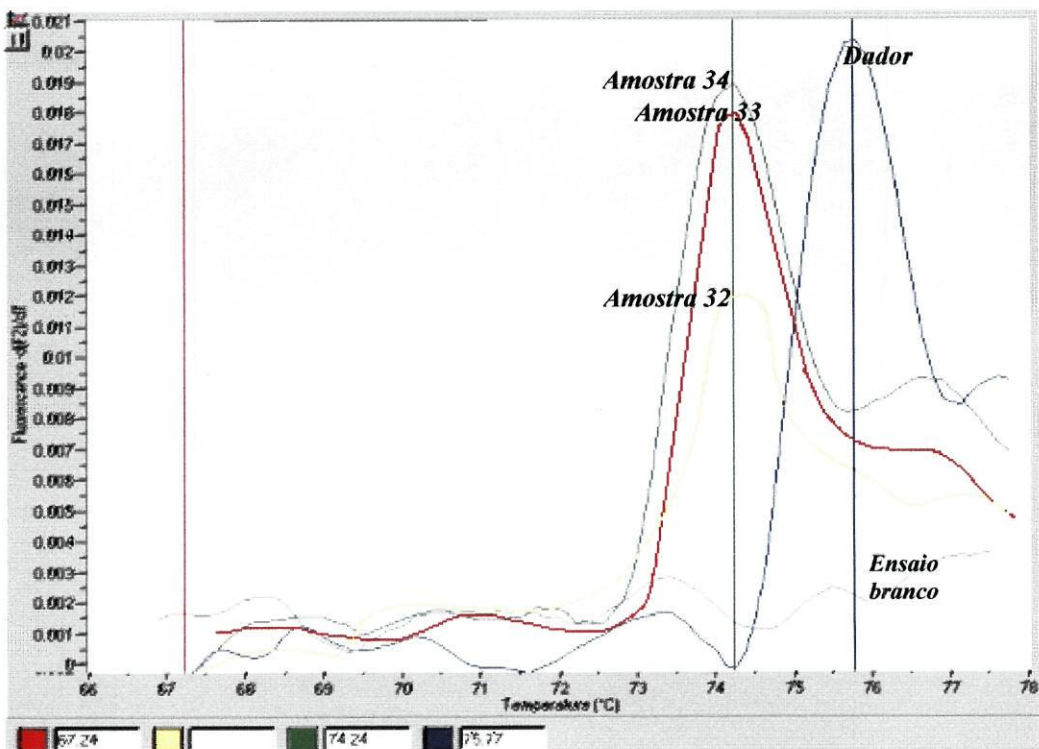


Figura 25. Detecção do polimorfismo presente no nucleótido 273865 das amostras 32, 33 e 34, por análise de melting no sistema de PCR em tempo-real Light Cycler.

Resultados

A análise das sequências do exão 18, revelou que no caso do doente 32, a identidade entre estas e a sequência obtida a partir da reacção forward do PCR assimétrico é de apenas 11%, quando comparada com a sequência obtida a partir da reacção reverse, com a sequência obtida para o dador e com as sequências obtidas para os restantes doentes. Na sequência obtida a partir do primer forward do exão 18, no caso do doente 31, toda a sequência anterior ao nucleótido 314059 (numeração de acordo com o contig NT_035088.1) difere completamente da sequência esperada (figura 26). A análise de blast realizada para esta nova sequência ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.com](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) indicou que ela poderá pertencer ao gene AP3B1 (Adaptor-Related Protein Complex 3, Beta-1 subunit), do cromossoma 5 (figura 27).

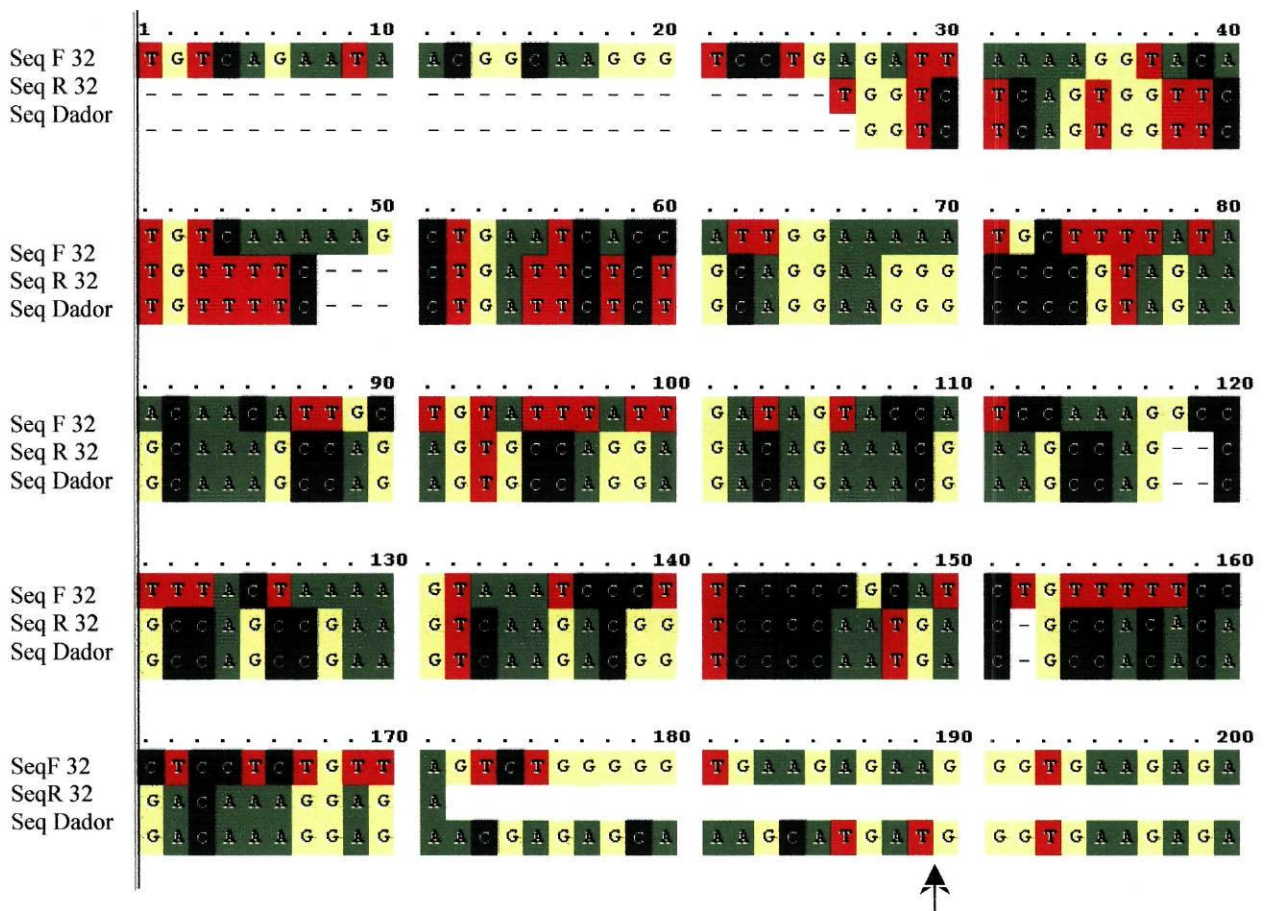


Figura 26. Alinhamento das sequências obtidas para o dador e doente 32. Na primeira linha de sequências está representada a sequência obtida, para o doente, usando o primer forward (Seq F 32); na segunda linha está representada a sequência obtida, para o doente, usando o primer reverse (Seq R 32) e na terceira linha está representada a sequência obtida para o dador (Seq Dador). A seta indica o nucleótido 314059, a partir do qual a sequência obtida usando o primer forward, se torna distinta das outras sequências.

```

>ref|NT_006713.13|Hs5_6870 Homo sapiens chromosome 5 genomic contig
      Length = 21028260

Score = 337 bits (175), Expect = 1e-90
Identities = 175/175 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      taacgcagggtcctgagattaaaagtacatgtcaaaaagctgaatcaccattggaaaaat 60
              |||
Sbjct: 6744428 taacgcagggtcctgagattaaaagtacatgtcaaaaagctgaatcaccattggaaaaat 6744487

Query: 61      gcttttataacaacattgctgtatttattgatagtagtaccatccaaaggcctttacaaaagt 120
              |||
Sbjct: 6744488 gcttttataacaacattgctgtatttattgatagtagtaccatccaaaggcctttacaaaagt 6744547

Query: 121     aatcccttccccgcacatctgttttccctcctctgtagttgtgggtgaagagaa 175
              |||
Sbjct: 6744548 aatcccttccccgcacatctgttttccctcctctgtagttgtgggtgaagagaa 6744602
    
```

Figura 27. Imagem do resultado obtido para o blast da sequência com o primer do exão 18, para a amostra 32.

Capítulo V

Discussão

Discussão

As causas que estão na origem do desenvolvimento da Leucemia Crônica de células NK-LGL, permanecem até hoje, por identificar. Frequentemente ao longo dos anos, foi sendo registada uma associação entre as doenças linfoproliferativas e a presença de agentes infecciosos virais, levando alguns autores a considerar que estes agentes possam ser uma das causas de desenvolvimento de linfoma (Lougharn et al, 1997; Malnatti et al, 1993; Zambelo et al, 1993). Segundo estes autores a presença de um agente vírico levaria a uma persistente estimulação das células NK e ao desenvolvimento de uma expansão clonal destas células, o que culminaria no aparecimento da doença linfoproliferativa. Sabendo que as doenças linfoproliferativas das células NK, também apresentam, em determinados tipos de linfoma/leucemia, uma associação com infecções víricas (Greer et al, 2001), a população de doentes com Leucemia Crônica de Células NK-LGL em estudo, foi submetida a análises para a identificação da presença de genoma viral dos agentes HTLV-I, HHV-6, HSV-1/2, CMV, VZV e EBV.

A possibilidade de a infecção por HTLV-I/II, estar associada à patogénese das doenças linfoproliferativas das células NK, foi sugerida por muitos autores, particularmente depois da descoberta de que, em modelos animais o gene tax do HTLV induz a leucemia de células NK (Martin et al, 1993; Grossman et al, 1995). No entanto os resultados encontrados para a população em estudo, neste trabalho, só comprovam a presença de genoma de HTLV-I, em um dos doentes (figura 4d)). Os resultados encontrados para a pesquisa de genoma viral de HHV-6, HSV-1/2, CMV, VZV e EBV, mostram que não há presença de DNA destes agentes nas amostras de nenhum dos doentes. Os resultados obtidos para o EBV, estão em concordância com estudos anteriores que sugerem não existir uma associação entre a infecção por este agente e as doenças linfoproliferativas das células NK, fora das regiões endémicas de infecção por EBV (Loughran et al, 1993; Pellenz et al, 1996). No entanto, a pesar de não ter sido encontrado DNA viral, nas amostras da população em estudo, para os agentes referidos, não pode ser colocada de parte a hipótese de uma possível associação entre a infecção vírica destes e a leucemia crónica de células NK-LGL. De acordo com autores como Lima e Zambello, a infecção vírica poderá ser condição necessária para a estimulação persistente e o desenvolvimento da expansão clonal, mas não o será para a manutenção desta (Lima et al, 2003; Zambello et al, 1993). Trabalhos como o de Lougharn e

colaboradores, parecem suportar esta teoria. Tal como no presente trabalho, também Loughran, quando estudou a presença de infecções víricas por HTLV-I/II em leucemia crónica de células NK-LGL, encontrou resultados negativos para a presença de genoma viral. Contudo análises de serologia da sua população em estudo, mostraram que o soro dos doentes era seropositivo para a proteína do envelope do vírus HTLV-I. No caso da população em estudo neste trabalho, resultados semelhantes aos de Lougharn foram também encontrados. Análises serológicas realizadas por Lima e colaboradores, em 2003, confirmam também a existência de seropositividade para CMV, EBV, HSV-1/2 e VZV, apesar de o genoma destes não ter sido detectado por técnicas de PCR nesses doentes. Estes resultados constituem assim mais uma observação a favor da teoria anteriormente referida.

Nesta análise de associação entre infecções víricas e doença linfoproliferativa, foram apenas testados os agentes virais incluídos na rotina do Laboratório da Unidade de Biologia Molecular do Hospital Geral de Santo António. Assim sendo, a infecção vírica por agentes como o HHV-8 e o HCV, dois vírus que frequentemente surgem associados aos LNH, não foi testada. Trabalhos anteriores, referem porém que não existe uma associação entre as infecções víricas por estes dois tipos de vírus e as doenças linfoproliferativas das células LGL-T ou NK (Lougharn et al, 1997; De Vita et al, 2000).

Passados 10 anos, desde que as doenças linfoproliferativas das células NK, foram reconhecidas pelo sistema de classificação da OMS, a semelhança morfológica e funcional continua a dificultar a diferenciação entre casos de leucemia crónica de células NK-LGL, e outros tipos de leucemias, também pertencente a este grupo de doenças (Greer et al, 2001). A procura de um marcador de clonalidade específico para a leucemia crónica de células NK-LGL continua por esta razão a ser válida e importante para a sua distinção de outros tipos de leucemias NK.

De entre os doentes com leucemia crónica de células NK-LGL, seguidos no Serviço de Hematologia Clínica do Hospital Geral de Santo António, Lima e colaboradores, identificaram um grupo de doentes que apresenta um fenótipo para as células NK neoplásicas, nunca antes descrito e que se caracteriza por apresentarem células neoplásicas NK CD56^{-/+dim}. O grupo de doentes com células NK CD56^{-/+dim}, utilizado neste trabalho é formado pelos doentes que dentro da população NK CD56^{-/+dim}, não apresentaram expressão da molécula de CD56 à superfície da célula NK. A possibilidade de encontrar uma alteração clonal que explicasse a ausência da NCAM-1 à

superfície destas células e de que esta pudesse ser considerada um marcador específico da doença, conduziu ao estudo da organização do gene CD56, nesta população CD56⁺.

A análise da presença do transcrito de mRNA específico da molécula NCAM-1, por intermédio de uma reacção RT, seguida de uma reacção de PCR que lhe era específica, revelou que em todas as amostras de doentes disponíveis para o estudo de RNA, havia ausência do transcrito da NCAM-1, enquanto que a amostra do dador analisada juntamente com as anteriores apresenta resultado positivo para a presença do transcrito da NCAM-1. Perante estes resultados, colocou-se então a hipótese de existir uma alteração no gene CD56, destes doentes.

A procura de alterações à normal organização do gene CD56 levou assim ao estudo das regiões codificantes deste. Terminado o estudo pôde constatar-se, que excluindo o exão 18 e o intrão 13, as regiões analisadas não apresentam qualquer alteração em relação ao genótipo “wild type”, que possa ser usada quer como marcador de clonalidade, quer como razão para explicar a ausência da expressão da NCAM-1. No entanto, assumir que estes resultados põem de parte a hipótese de não existirem alterações genéticas, nas regiões codificantes, que justifiquem a ausência de expressão da NCAM-1, seria precipitado. Temos sempre que considerar que existe um exão que ficou por estudar e ter em atenção que a todo o momento novas alterações à organização do gene CD56 estão a ser propostas. Sendo um exemplo disto, os dois novos exões descobertos no gene do CD56 humano nos últimos três meses (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview).

O estudo das regiões codificantes, não foi contudo infrutífero. Na região intrónica situada entre o exão 13 e o exão 14, mais precisamente 19 nucleótidos após o fim do exão 13, foi identificado um novo SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ainda não registado nas bases de dados consultadas (www.ncbi.nlm.nih.gov, ctd 21179122). Este novo SNP surge em três dos doentes estudados mas não parece ter qualquer representação na população normal. O significado a atribuir a este SNP é ainda difícil de estipular, uma vez que não existe informação que permita saber qual a importância desta região intrónica no processamento da informação genética do gene CD56. Pode acontecer que esta região seja interveniente numa das fases de splicing do RNA e de alguma forma regule o transcrito específico para a NCAM-1. Uma outra possibilidade resulta de a mutação ocorrer numa zona rica em citosinas, e por isso ser potencialmente alvo de metilação. Com efeito, as recentes descobertas realizadas acerca da forma como os padrões de metilação e estrutura da cromatina modulam a transcrição

genética vieram colocar os eventos epigenéticos no mesmo nível de importância dos eventos genéticos. Para esta mudança muito contribuíram os estudos sobre iniciação e progressão tumoral, que mostraram que, em células neoplásicas, as razões de metilação do DNA e o equilíbrio entre heterocromatina e eucromatina estão profundamente alterados (Jones et al, 2002). Sabendo que o condensamento da cromatina em heterocromatina leva à repressão da transcrição genética e que a metilação é um fenómeno permanente na heterocromatina, é tentador pensar que não só a hipermetilação é um factor que contribui para a alteração do equilíbrio eucromatina/heterocromatina, mas também que, alterações em sequências, que participem no compactamento do DNA contribuem para esse efeito, e que se este fosse o caso da sequência onde surge o SNP do intrão 13, esta alteração genética estaria a contribuir para a alteração epigenética.

No respeitante ao estudo da região codificante do exão 18, verificou-se que, embora a sequência obtida após o PCR assimétrico com o primer reverse, seja idêntica à sequência “wild type” do dador; a sequência obtida após o PCR assimétrico com o primer forward apresenta apenas uma porção semelhante à do dador, sendo a restante sequência idêntica a uma porção do gene Ap3b1, localizado no cromossoma 5, banda q14.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). Esta observação é sugestiva de que tenha ocorrido uma translocação entre o cromossoma 11, no locus do gene CD56 e o cromossoma 5, no locus do gene Ap3b1. Caso a translocação se venha a confirmar quer por análise do cariótipo do doente, quer por análise de PCR, a disrupção do gene CD56 no exão 18 poderia ter como consequência a ausência de expressão da NCAM-1 à superfície celular. Para além da alteração do gene CD56, a alteração do gene Ap3b1, poderia também estar envolvido indirectamente na ausência da expressão da NCAM-1, uma vez que este gene codifica uma subunidade do complexo AP3 (Adaptor-Related Protein Complex), expressa em todo o tipo de células, que se pensa estar envolvido nas vias de endereçamento das proteínas transmembranares (Dell’Angelica et al, 1997). Autores como Clark, sugerem ainda que a disrupção deste gene pode comprometer as capacidades citotóxicas dos linfócitos T uma vez que a deficiência no complexo AP3, resulta indirectamente na diminuição da actividade da perforina e granzyme (Clark et al, 2003). Como já se referiu anteriormente, um estudo do cariótipo do doente, uma análise de PCR com primers específicos para as extremidades da nova sequência encontrada no PCR assimétrico forward e estudos funcionais do clone NK maligno deste doente seriam necessários para confirmar as hipóteses acabadas de formular.

Uma outra possibilidade para explicar a inexistência do transcrito CD56 nestes doentes seria o aparecimento de alterações a nível do promotor do gene. Recentemente vários estudos têm relacionado as alterações epigenéticas em promotores com o aparecimento e a progressão das neoplasias (Burbre et al. 2001; Knudon, 2000). Promotores como o do gene CD56, ricos em ilhas CpG, são particularmente afectados por estas alterações. Em células normais, as ilhas CpG dos promotores, não se encontram metiladas, mas nas neoplasias a hipermetilação destas regiões do promotor leva ao silenciamento do gene, afectando a sua transcrição (Jones et al, 2002). Caso esta fosse a alteração verificada no promotor do gene CD56, o silenciamento deste gene por metilação aberrante do seu promotor, explicaria a ausência de transcrito da NCAM-1 nas células neoplásicas, e a sua presença no caso do dador. A metilação aberrante do promotor associada à perda de função do gene, surge com muita frequência e pode associar-se a todos os tipos de cancro (Baylin et al, 2000), sugerindo mesmo a existência de uma relação entre o gene escolhido para ser silenciado e o tipo de cancro (Esteller et al, 2001). Um exemplo deste fenómeno são os genes CDKN2B, cujo promotor aparece frequentemente metilado nos linfomas (Herman et al, 1997) e GSTP1, cujo promotor surge metilado apenas nos cancros da mama, próstata e fígado (Lin et al, 2001).

Assim como acontece com a disrupção de genes de supressão tumoral, por meio das mutações genéticas, também a hipermetilação do promotor associada à perda de função do gene parece fornecer às células neoplásicas vantagens selectivas que permitem a progressão tumoral (Jones et al, 2002). A propagação da metilação parece ser um fenómeno que ocorre durante a carcinogénese e que se supõe aumentar com a idade (Issa et al, 1994). Ao contrário daquilo que acontece quando há uma mutação genética em um dos genes de supressão tumoral, em que o facto de existir uma mutação provoca a paragem da síntese da proteína correspondente, em todas as células do clone neoplásico; no caso de alterações epigenéticas do promotor, o grau de silenciamento do gene depende da extensão da metilação que ocorre em cada célula do clone neoplásico (Graff et al, 2000). Assim sendo, células NK neoplásicas com elevado grau de metilação bloqueariam a expressão da NCAM-1, enquanto que células com menor grau de metilação do promotor expressariam a molécula, surgindo desta forma um fenótipo CD56^{-/+dim} para a população de células neoplásicas NK, semelhante ao dos doentes de onde foi retirada a população em estudo neste trabalho. Se tivermos em conta que o envelhecimento e a progressão tumoral contribuem para o aumento da metilação seria

oportuno sugerir que a população de doentes com células NK CD56⁺, em estudo representa uma fase mais avançada na progressão da doença em relação à restante população de doentes com células NK CD56^{-dim}.

Para comprovar a hipótese de que a ausência do transcrito da NCAM-1, se deve a alterações epigenéticas no promotor, seria no entanto necessário realizar testes que identificassem a hipermetilação do promotor. As técnicas de MCA-RDA (methylated CpG island amplification - representational difference analysis) (Toyota et al., 1999), MS-AP-PCR (methylation - sensitive arbitrarily primed PCR) (Gonzalzo et al., 1997) e DMH (differential methylation hybridization) são técnicas que recorrem a enzimas de restrição sensíveis à metilação que permitem distinguir fragmentos de diferentes tamanhos, quando há presença de DNA metilado. Caso estas técnicas resultassem negativas para a metilação das ilhas CpG do promotor do gene CD56, outras hipótese como por exemplo alterações genéticas na região do promotor, ou nas regiões a ele adjacentes e que intervenham no mecanismo cis de regulação ou com o mecanismo trans de regulação, teriam que ser equacionadas.

No presente estudo não foram ensaiados estudos de hipermetilação do promotor, uma vez que a quantidade e qualidade do material de estudo disponível não o permitiram. Esta é no entanto uma interessante via de estudo que importará prosseguir no futuro.

Capítulo VI

Conclusão

Conclusão

Os resultados da pesquisa de genoma viral nas amostras em estudo, revelando serologias positivas mas virémias negativas na maioria dos doentes, parecem apoiar a teoria segundo a qual, a infecção vírica poderá ser a causa para a estimulação persistente e o desenvolvimento da expansão clonal, mas uma vez esta iniciada não será necessária a persistência do agente vírico para que ela se mantenha. Assim, a detecção de genoma viral não se revelou útil na definição clonal nesta patologia.

Em contraste, os estudos da expressão de mRNA do CD56, e a pesquisa de mutações no respectivo gene revelaram-se mais utilizáveis para a definição clonal nestes doentes. Com efeito, as alterações encontradas no intrão 13 e na sequência do exão 18 de alguns dos doentes em estudo poderão ser utilizadas para este fim. Embora não se possa ainda determinar qual o efeito que têm estas alterações no processo neoplásico, algumas possibilidades podem ser apresentadas. Por um lado, face à localização do novo SNP, no início do intrão 13, é tentador sugerir que possa estar envolvido em processos de splicing do RNA ou de organização da cromatina. Quanto à existência de uma possível translocação t(5;11), distúrbios a nível do endereçamento de proteínas seria um dos efeitos a esperar.

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho sugerem ainda como possível causa da ausência de expressão da molécula NCAM-1, nas células NK, potenciais alterações na região promotora do gene CD56. Devido ao facto de o material usado neste estudo, ser material de arquivo e existir em pouca quantidade, estudos sobre a organização da região promotora não puderam ser efectuados. No entanto, atendendo às características do tipo de promotor em causa (promotor rico em ilhas CpG) e às características heterogéneas da expressão da molécula NCAM-1, na população de doentes NK CD56^{-/+dim}, de entre os quais foram seleccionadas os doentes CD56⁻, suspeita-se que a hipermetilação do promotor seja a alteração responsável pela ausência do transcrito da NCAM-1. A confirmação da hipermetilação deste promotor confirmaria não só o silenciamento epigenético do gene CD56, mas poderia significar também a identificação de um marcador clonal específico para a Leucemia Crónica de Células NK-LGL. Um marcador deste tipo seria facilmente detectado, tornando muito simples, não só o diagnóstico, mas também a progressão da doença. Este marcador constituiria ainda um excelente alvo para a terapia visto que agentes químicos desmetilantes, como a 5-azacitidina, são capazes de reactivar os genes silenciados por hipermetilação.

Em conclusão, o presente trabalho levantou uma série de novas questões para as quais importará agora procurar respostas. Para tal será necessário reunir um número suficiente de doentes, desta rara neoplasia, que permita o estudo do estado de metilação do promotor, a realização da análise de cariótipo e um melhor conhecimento da organização genómica do gene CD56. A confluência de todos estes resultados permitirá estabelecer uma boa relação entre alterações genéticas/epigenéticas encontradas e os efeitos que podem provocar.

Bibliografia

- Arber D. (2000) **Molecular Diagnostic Approach to Non-Hodgkin's Lymphoma.** *Journal of Molecular Diagnostics* 2, 4: 178.
- Arima N. (1997) **Autonomous and interleukin-2-responsive growth of leukemic cells in adult T-cell leukaemia (ATL): a review of the clinical significance and molecular basis of ATL cell growth.** *Leukemia Lymphoma* 26:476.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1989a) **Cancer.** pp1187-1216 in: *Molecular Biology of the Cell*, 2th ed. New York, NY: Garland Publishing.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1989b) **The Immune System.** pp1001-1054 in: *Molecular Biology of the Cell*, 2th ed. New York, NY: Garland Publishing.
- Anderson JR, et al. (1998) **Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphoma: distribution of the major subtypes differ by the geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.** *Annual Oncology* 9 :717.
- Ballerini P, et al. (1993) **Multiple genetic lesions in aquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphoma.** *Blood* 81:166.
- Bárcena A, et al.. (1993) **Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymos. CD7 expression in the earliest stages of T- and myeloid development.** *Blood* 82: 3401.
- Bárcena A, et al. (1994) **Lymphoid and myeloid differentiation of fetal CD34+ lineage – cells in human thymic organ culture.** *Journal of Experimental Medicine* 180: 569.
- Barton CH, et al. (1990) **Characterization of the human N-CAM promotor.** *Biochemical Journal*, 268: 161.
- Bassan R, et al. (1989) **Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells.** *Cancer* 63: 90.
- Baylin S, Herman JG. (2000) **DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.** *Trends Genetics* 16: 168.
- Bhatia K, et al. (1993) **Point mutations in the c-MYC transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytoma.** *Nature Genetics* 5: 56.
- Bible KC, Tefferi A. (1996) **Cyclosporine A alleviates severe anaemia associated with refractory large granular lymphocytic leukaemia and chronic natural killer cell lymphocytosis.** *British Journal of Haematology* 93: 406.
- Billadeau D, Leibson JP. (2002) **ITAMs versus ITIMs : striking a balance during cell regulation.** *The Journal of Clinical Investigation* 2: 161.
- Boehmu, et al. (1997) **Cellular responses to interferon-gamma.** *Annual Review of Immunology* 15: 749.
- Burbee D.G, et al (2001) **Epigenetic inactivation of RASSF-1A in lung and breast cancer and malignant phenotype suppression.** *Journal of National Cancer Institute* 93: 691.
- Cartwright R, et al. (1999) **The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992.** *European Journal of Cancer* 35: 627.

- Cesarman E, et al. (1987) **Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma.** *Science* 238:1272.
- Chabannon C, et al. (1992) **Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors.** *Journal of Immunology* 149: 2110.
- Chan JKC. (1999) **Peripheral T-cell and NK-cell neoplasms: an integrated approach to diagnosis.** *Modern Pathology* 12: 177.
- Chan WC, et al. (1992) **Large Granular lymphocyte proliferation with the natural killer-cell phenotype.** *American Journal of Clinical Pathology* 93: 353.
- Clark RH, et al. (2003) **Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse.** *Nature Immunology* 4: 1111.
- Corradini P, et al. (1999) **Clinical relevance of minimal residual disease monitoring on non-Hodgkin's lymphomas: critical reappraisal of molecular strategies.** *Leukemia* 13:1091.
- Cross SL, et al. (1987) **Regulation of the interleukin 2 α chain promoter: activation of non-functional promoter by the transactivation gene of HTLV-1.** *Cell* 49:47.
- Cunco A, et al. (1999) **13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma correlation with clinicopathologic features.** *Haematologica* 84:589.
- Cunningham BA, et al. (1987) **Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing.** *Science* 236: 799-806.
- Dammacco F, et al. (1998) **Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia, and non-Hodgkin's lymphoma: an emerging picture.** *Leukemia Lymphoma* 31:463.
- Dearden C, et al. (1991) **Deoxycoformycin in the treatment of nature T-cell Leukemias.** *British Journal of Cancer* 64: 903.
- Dehé A et al. (2002) **Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay.** *Journal of Virological Methods* 102: 37-51.
- De Greef C, et al. (1998) **Differential gene expression of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in a panel of multiple myeloma cell lines.** *Leukemia* 12: 86.
- De Stefani E, et al. (1998) **Tabacco, alcohol, diet and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study in Uruguay.** *Leukemia Research* 22: 445.
- Dell' Angelica EC, et al. (1999) **Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak síndrome due to mutations in the beta-3^a subunit of AP-3 adaptor.** *Molecular Cell* 3: 11.
- De Vita Vincent T, Hellman Jr Samuel, Rosenberg Steven A (2001) **Lymphomas.** Cap 45, pp 2215 in : *Cancer*. Volume 2, Lippincot Willians e Wilkins - 6^a edição . Philadenphia, USA.
- Dinsen GE, et al. (1999) **Unexplained increases in cancer incidence in the United States from 1975 to 1994. Possible sentinel health indicators?** *Annual Review Public Health* 20:173.
- Doglioni C, et al. (1992) **High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy.** *Lancet* 338:834.

- Drenou B, et al. (1988) **Multidrug resistance in aggressive lymphoproliferative disorders of T and natural-killer origin.** *Leukemia/lymphoma* 30: 381.
- Edelman GM. (1988) **Morphoregulatory molecules.** *Biochemistry* 27: 3533.
- Emile JF, et al. (1996) **CD5- CD56+ T-cell receptor silent peripheral T-cell lymphomas are natural killer cell lymphomas.** *Blood* 87: 1466.
- Esteller M, et al. (2001) **A gene hypermethylation profile of human cancer.** *Cancer Research* 61: 3225.
- Ferreira OC Jr, et al. (1997) **Human T- cell leukemia virus: epidemiology, biology and pathogenesis.** *Blood Review* 11: 91.
- Fukuda M. (1983) **Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens.** *Cancer Research* 304: 347.
- Gaidano G, et al. (1991) **p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.** *Proc National Academy of Science USA* 88:5413.
- Gamberi B, et al. (1997) **Lack of microsatellite instability is rare in B-cell non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood* 89:975.
- Gillert E, et al. (1999) **A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4 ;11) in primary leukemic cells.** *Oncogene* 18:4663.
- Gonzalo M, et al. (1997) **Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR.** *Cancer Research* 57: 594.
- Goridis, et al. (1985) **Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development.** *Journal Cell Biology.* 101: 1921.
- Graff JR, et al (2000) **Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression.** *Journal of Biological Chemistry* 275: 2727.
- Greer JP, et al. (1996) **Ki-1 anaplastic large cell lymphoma (ALCL): correlation of clinical features with p80^{NPM/ALK} expression and histology (abstract).** *Blood* 224a.
- Greer JP, et al. (2001) **T cell and NK cell lymphoproliferative disorders.** *Hematology*, 259.
- Greiner TC, et al. (1995) **Non-Hodgkin's lymphoma.** *Cancer* 75:370.
- Grossman WJ, et al. (1995) **Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene in human T-cell leukaemia virus type I.** *Proc National Academy of Science USA* 92: 1057.
- Hartge P, et al.(1994) **Hodgkin's lymphoma and Non-Hodgkin's lymphoma.** *Cancer Surveillance* 20:423.
- Harris NL, et al. (1994) **A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.** *Blood* 84: 1361.

- Harris NL, et al. (1999) **World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting.** Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology* 17: 3835.
- Hemperly JJ, et al. (1990) **Characterization of cDNA clones defining variant forms of the human neural cell adhesion molecule N-CAM.** *Journal of Molecular Neurosciences* 2: 71.
- Herman J, et al. (1997) **Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4B} and 16p^{INK4A} characterized the major types of haematological malignancies.** *Cancer Research* 60: 2368.
- Hoglund P, et al. (1991). **Recognition of β 2 microglobulin-negative (β 2m) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from β 2m- mice.** *Protocols National Academy of Sciences USA* 88: 10332.
- Hollstein M, et al. (1991) **p53 mutations in human cancer.** *Science* 253:49.
- Hori T, et al. (1992) **Human fetal liver-derived clones that express CD3 gamma, delta and epsilon and proliferate in response to IL-2, IL-3, IL-4 or IL-7: implications from the relationship between T and NK cells.** *Blood* 80: 1270.
- Issa JP, et al. (1994) **Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon.** *Nature Genetics* 7: 536
- Itoyama T, et al. (2001) **Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell leukemia/lymphoma : a study of 50 cases from the human T-cell leukemia virus type-1 endemic area, Nagasaki.** *Blood* 97: 3612.
- Jaffe ES. (1996) **Classification of natural killer (NK) cell and NK-like T- cell malignancies.** *Blood* 87:1207.
- Jeang KT, et al. (1990) **HTLV-1 trans-activator protein, Tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene.** *Science* 247:1082.
- Jones P, Baylin S. (2002) **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nature Reviews* 3: 415.
- Kelly A, et al. (1994) **Clonality of CD3 negative large granular lymphocyte proliferation determined by PCR based X inactivation studies.** *Journal of Clinical Pathology* 47: 399.
- Kieffe E, Leibowitz D. (1989) **Oncogenesis by herpesvirus.** In: Weinberg RA, ed. *Oncogenes and the molecular origin of cancer.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- King K, Younes A,. (2000) **Isofosfamide - and paclitaxel - based treatment of relapsed and refractory lymphoma.** *Seminars Oncology* 27 (Suppl1): 14.
- Knudson A. (2000) **Chasing the cancer demon.** *Annual Review Genetics* 34: 1.
- Lanier LL, et al. (1986) **Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function.** *Journal of Immunology* 137: 2735.
- Lanier LL, et al. (1991) **Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56).** *Journal of Immunology* 12: 4421.
- Lanier L, et al. (1992) **The developmental relationship between NK cells and T cells.** *Immunology Today*

- Lao N, et al. (1991) **MHC class I deficiency susceptibility to natural killer (KN) cell and impaired NK activity.** *Science* 253: 199.
- Lima M, et al. (2002) **The “ex vivo” patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states.** *Blood Cells, Molecules and Diseases* 28: 181.
- Lima M, et al (2003) **Clinico-biological, immunophenotypic and molecular characteristics of CD56⁺dim Chronic NK-Large Granular Lymphocytosis.** *American Journal Pathology* (submitted June 2003).
- Lin X, et al. (2001) **Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide.** *Cancer Research* 61: 8611.
- Liu JH, et al. (2000) **Chronic neutropenia mediated by Fas ligand.** *Blood* 95: 3119.
- Ljungren HG, et al. (1994) **Altered natural killer cell repertoire in Tap-1 mutant mice.** *Protocols National Academy of Science USA* 91: 6520.
- Lo Coco F, et al. (1993) **P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma.** *Blood* 82:2289.
- Lotzova E, et al. (1993) **Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+ CD33- bone marrow progenitors.** *Journal of Immunology* 150: 5263.
- Lougharn TP. (1993) **Clonal disease of large granular lymphocytes.** *Blood* 82: 1.
- Lougharn TP, et al. (1985) **Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and auto-immune neutropenia, thrombocytopenia and haemolytic anemia.** *Annals Internal Medicine* 102: 169.
- Lymphoma Study Group (1984-87). (1991) **Major prognostic factors of patients with adult T-cell leukaemia-lymphoma: A cooperative study.** *Leukemia Reserch* 15: 81.
- Lynch HT, et al. (1992) **Genetics of Hodgkin’s and non-Hodgkin’s lymphoma: a review.** *Cancer* 83:695.
- Malnati MS, et al. (1993) **Recognition of viral-infected cells by natural killer clones is controlled by polymorphic target cell elements.** *Journal of Experimental Medicine* 178: 961.
- Martin MP, et al. (1993) **Large granular lymphocytosis in a patient infected with HTLV-II.** *AIDS Research Human Retrovirus* 9: 715.
- Migliazza A, et al. (1995) **Frequent somatic hypermutations of the 5’ non-coding region of the BCL-6 gene in B-cell lymphoma.** *Proc National Academy of Science USA* 92:12520.
- Miller JS, et al.. (1992) **The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture.** *Blood* 80: 2182.
- Mitelman F, et al. (1997) **A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia.** *Nature Genetics* (special issue): 417, 1997.
- Nador RG, et al. (1996) **Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Karposi’s sarcoma associated herpes virus.** *Blood* 88:645.

- Nagler A, et al. (1990) **Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptor in human CD16- natural killer cells *in vivo*.** *Journal of Experimental Medicine*. 171: 1527.
- Nash R, et al. (1993) **Clonal studies of CD3-lymphoproliferative disease of granular lymphocytes.** *Blood* 81: 2363
- Nelson RA, et al. (1997) **Alcohol, tobacco and recreational drug use and the risk of non-Hodgkin's lymphoma.** *British Journal Cancer* 76:1532.
- Nishikawa K, et al. (1991) **Accumulation of CD6- CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy deciduas.** *Immunology* 3: 743
- Nitta T, et al. (1989) **Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as na adhesion molecule in natural killer-target cell interaction.** *Journal of Experimental Medicine* 170: 1757.
- Nguyen C, et al. (1986) **Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11.** *Journal Cell Biology* 102(3): 711.
- Offit K, et al. (1991) **Citogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations.** *Blood* 77:1508.
- Ogawa M. (1993) **Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.** *Blood* 81: 2844.
- Ohno Y, et al. (1989) **Acute transformation of chronic large granular lymphocyte leukaemia associated with additional chromosome abnormality.** *Cancer* 64: 43.
- Pellenz M, et al. (1996) **Detection of Epstein-Barr virus by PCR analyzes in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes.** *Leukemia Lymphoma* 23:371.
- Pescarmona E, et al. (1999) **Expression of p53 and retinoblastoma gene in high-grade nodal peripheral T-cell lymphoma immunohistochemical and molecular findings suggesting different pathogenic pathways and possible clinical implications.** *Journal of Pathology* 1188: 400.
- Phillips JH, et al. (1992) **Ontogeny of human natural killer cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 ϵ , δ proteins.** *Journal of Experimental Medicine* 175: 1055.
- Raab-Traub N, Flynn K. (1986) **The structure of the termini of Epstein-Barr virus as a marcar of clonal cellular proliferation.** *Cell* 47: 883.
- Rabbani GR, et al. (1999) **A long term study of patients with chronic natural killer lymphocytosis.** *British Journal of Haematology* 106: 960.
- Rabkin CS, et al. (1993) **Increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma.** *Seminars of Hematology* 30: 286.
- Ries L, et al. (1999) **SEER cancer statistics review.** Bethesda, MD.
- Romana S, et al. (1999) **Molecular analysis of chromosomal brakpoints in three examples of chromosomal translocations involving the TEL gene.** *Leukemia* 13:1754.

- Rutishauser U, et al. (1988) **The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions.** *Science* 240: 53-57.
- Sánchez MJ, et al. (1993) **Putative prethymic T-cell precursors within the early human embryonic liver: A molecular and functional analysis.** *Journal of Experimental Medicine* 177: 19.
- Sánchez MJ, et al. (1994) **Identification of a common T/NK cell progenitor in human fetal thymus.** *Journal of Experimental Medicine* 180: 569.
- Sasaki M, et al. (2000) **Successful treatment of disseminated nasal NK/T-cell lymphoma using double autologous peripheral blood stem cell transplantation.** *International Journal of Hematology* 71: 75.
- Scherr PA, et al. (1992) **Non-Hodgkin's lymphoma and occupational exposure.** *Cancer* 52:5503.
- Scott AA, et al. (1994) **HLA-DR-, CD33+, CD56+, CD16- myeloid/natural killer cell acute leukaemia: a previously unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukaemia M3.** *Blood* 84:244.
- Seow A, Lee J, Sng I, Fong CM, Lee HP. (1996) **Non-Hodgkin's lymphoma in a Asian population: 1968-1992 time trends and ethnic differences in Singapore.** *Cancer* 77:1899.
- Shiramisu B, et al. (1991) **Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association.** *Blood* 77:1516.
- Shresta S, et al. (1998) **How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?** *Current Opinion in Immunology* 10: 581.
- Siebert R, et al. (1997) **Familial Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma: different patterns in first-degree relatives.** *Leukemia Lymphoma* 27: 503.
- Sivakumaran M, et al. (1996) **Clinical and laboratory characteristics of chronic natural killer cell lymphocytosis.** *Blood*, 87: 1659.
- Spit H, et al. (1995) **Development of Human T and Natural Killer Cells.** *Blood* 10: 2654.
- Suzuki R, et al. (1999) **Malignancies of natural killer (NK) cell precursor myeloid/NK cell precursors acute leukemia and blastic NK cell lymphoma/leukaemia.** *Leukemia Research* 23:625.
- Tanaka S, et al. (1992) **Frequent incidence on somatic mutations in translocated bcl-2 oncogenes of non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood* 79: 229.
- Taguchi H, et al. (1996) **An intensive chemotherapy of adult T-cell Leukemia /lymphoma: CHOP followed by etoposide, vindesine, ranimustine, and mitoxantrone with granulocyte colony-stimulating factor support.** *Journal Acquired Immune Deficiency Human Retrovirol* 12:182.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. (1997) **A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood* 89: 3909.

- Timonen T, et al. (1981) **Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and T cells.** *Journal of Experimental Medicine* 53: 569.
- Tjonnfjord GE, et al.. (1993) **T lymphocyte differentiation in vitro from adult human pre-thymic CD34+ bone marrow cells.** *Journal of Experimental Medicine* 177: 1531.
- Toyota M, et al. (1999) **Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification.** *Cancer Research* 59: 2307.
- Trinchieri G, et al.(1993) **Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells.** *Nature Immunology* 12: 218.
- Tsang WYW, Chang JKC, Ng CS, Pau MY. (1996) **Utility of a paraffin selection-reactive CD56 antibody (123C3) form characterization and diagnosis of lymphomas.** *American Journal of Surgical Pathology* 20: 202.
- Tsukasaki K, et al. (2001) **Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course.** *Blood* 97: 3875.
- Uittenbogaard MN, et al. (1995) **Transcriptional repression of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein.** *Journal Biological Chemistry* 270: 28503.
- Waits TM, et al. (1993) **Effective therapy for poor-prognosis non-Hodgkin's lymphoma with 8 weeks of high-dose-intensity combination chemotherapy.** *Journal of Clinical Oncology* 11: 943.
- Wano Y, et al. (1988) **Stable expression of the tax gene of type 1 human T-cell leukemia virus in human T-cell activates specific cellular genes involved in growth.** *Proc National Academy of Science USA* 85: 9733.
- Warren HS. (2000) **CD56.** *Journal of Regulators and Homeostatic Agents* 14: 317.
- Witte T, et al. (1989) **Heterogeneity of human natural killer cell in the spleen.** *Immunology* 69: 166.
- Winnock M, et al. (1991) **Characterization of liver-associated natural killer cells in patients with liver tumors.** *Hepatology* 13: 676.
- Zambello R, et al. (1994) **Serologic and molecular evidence for a possible pathogenic role of viral infection in CD3-negative natural killer-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes.** *Leukemia* 9: 1207
- Ziegler JL. (1981) **Burkitt's lymphoma.** *New England Journal Medicine* 305:735.
- Zucca E, et al. (1998) **Molecular analysis of the progression from *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach.** *New England Journal Medicine* 338:804.
- zur Hausen A. (1991) **Virus in human Cancer.** *Science* 254:1167.