UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

EDGAR GIL RIZZATTI

Análise do perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto
em fase leucêmica com *microarrays* de oligonucleotídeos

Ribeirão Preto
2004

EDGAR GIL RIZZATTI

**Análise do perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto
em fase leucêmica com *microarrays* de oligonucleotídeos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão

Ribeirão Preto
2004

À minha mãe, Claudina, com extrema gratidão

A meu pai, Edgar, com saudades

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão, pela orientação desta tese, por minha formação como hematologista e pesquisador, e pelo incentivo irrestrito e amizade que transcenderam, largamente, o escopo do binômio aluno-orientador.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Zago, pelas sugestões, orientações e apoio constantes durante a realização deste trabalho.

A Amélia Góes de Araújo, Aglair Bergamo Garcia, Marli Haydee Tavella e Denise Aparecida Palma Gallo, pela assistência técnica competente, pela dedicação e pela convivência harmoniosa no ambiente de trabalho.

Ao Dr. Ulf Klein, da Universidade de Columbia, Nova York, EUA, por ter gentilmente cedido os protocolos de separação das subpopulações de linfócitos B.

Ao Dr. Sebastião José Ismael, pela colaboração e pelos pacientes sob seus cuidados incluídos neste estudo.

Aos médicos: Dr. Dirceu E. Silva (Varginha, MG), Dr. Gilberto Colli (Barretos, SP), Dr. José Eduardo Bernardes e Dr. Benedito P. A. Prado Jr. (Ribeirão Preto, SP), Dr. Marcos de Bastos (Belo Horizonte, MG), Dr. José Eduardo Nicolau e Dra. Olívia R. L. Oliveira (Santos, SP), e Dra. Ana Marcela R. Fonseca (Uberaba, MG), pelos pacientes sob sua assistência incluídos nesta investigação.

À Dra. Wilma Terezinha Anselmo-Lima, da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e ao Dr. Max Perches Filho, pela colaboração na obtenção de amostras de amígdalas.

Ao Dr. Rodrigo Tocantins Calado e à Dra. Belinda Pinto Simões, pela obtenção da linhagem celular Granta-519.

Ao pós-graduando Rodrigo Alexandre Panepucci, ao Dr. Rodrigo Proto Siqueira e ao Dr. Oswaldo Keith Okamoto, pelas valiosas contribuições a esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, aos médicos assistentes, pós-graduandos e médicos residentes da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelas orientações, sugestões e assistência recebidas.

À Sandra Navarro, pelo dedicado auxílio na preparação das figuras deste trabalho.

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Fabíola, pelo apoio e companheirismo incondicionais.

Há um universo de mistérios à nossa volta e me anima a possibilidade da surpresa.

Emílio Ribas (1862-1925)

RESUMO

RIZZATTI, E. G. **Análise do perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto em fase leucêmica com *microarrays* de oligonucleotídeos.** 2004. 91 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

O linfoma de células do manto é associado à translocação t(11;14)(q13;q32) e à hiperexpressão da ciclina D1. Os pacientes com linfoma de células do manto apresentam-se com doença avançada ao diagnóstico e a fase leucêmica da doença é observada em cerca de um terço dos casos. Os linfócitos B virgens pré-centro germinativo, que ocupam a zona do manto dos folículos linfóides secundários, constituem a origem celular do linfoma de células do manto. A hiperexpressão da ciclina D1, por si só, não é suficiente para a patogênese da neoplasia, e a elucidação das alterações moleculares adicionais poderá fundamentar novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, os métodos de estudo do perfil de expressão gênica em larga escala têm potencial para auxiliar na descoberta dessas alterações moleculares adicionais. Todavia, nos estudos que empregaram esses métodos até o momento, o material genético foi obtido de amostras de gânglios acometidos pelo tumor, que contêm uma proporção variável de células normais do estroma do tecido linfóide. Por isso, ainda não se sabe quais dos genes identificados como alterados no linfoma de células do manto são específicos das células linfomatosas, e quais são dependentes das células normais que perfazem o estroma do gânglio. Com o objetivo de elucidar as alterações moleculares do linfoma de células do manto em nível celular, realizamos um estudo comparativo entre o perfil de expressão gênica de células linfomatosas purificadas e de linfócitos B virgens, utilizando *microarrays* de oligonucleotídeos. Células linfomatosas e linfócitos B virgens (IgD⁺CD38⁺CD27⁻) foram purificados em colunas magnéticas a partir do sangue periférico de pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica e de amígdalas de indivíduos normais, respectivamente (pureza > 95%). Três indivíduos foram selecionados em cada grupo e os experimentos foram

realizados em duplicatas usando *microarrays* comerciais modelo CodeLink Human UniSet I, com 10.000 genes. Foram identificados 106 genes com variação de expressão maior do que três vezes, 63 deles induzidos e 43 reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Dez genes (seis induzidos e quatro reprimidos) foram selecionados para quantificação, por RT-PCR em tempo real, em amostras de sangue periférico de 21 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica, além de 14 pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas e de sete indivíduos sem doenças neoplásicas. Os resultados dos experimentos com *microarrays* foram confirmados pela quantificação por RT-PCR em tempo real em todos os 10 genes selecionados e os valores de expressão do gene *TLR1* obtidos por esse método demonstraram correlação significativa com a sobrevida dos pacientes com linfoma de células do manto. Além de identificar vários genes modulados no linfoma de células do manto em nível celular, este estudo também revelou a expressão aberrante de diversos genes relacionados à apoptose e às vias de sinalização PI3K/AKT, WNT e TGF β . Esses resultados adicionam informações originais à patogênese molecular do linfoma de células do manto e apontam para vias específicas de sinalização molecular como potenciais alvos para novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Linfoma não-Hodgkin. Linfoma de células do manto. Expressão gênica. Microarrays.

ABSTRACT

RIZZATTI, E. G. **Gene expression profiling of mantle cell lymphoma in leukemic phase with oligonucleotide microarrays.** 2004. 91 p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Mantle cell lymphoma is associated with the translocation t(11;14)(q13;32) and overexpression of cyclin D1. Mantle cell lymphoma is predominantly disseminated at diagnosis and a frank leukemic phase is detected in one third of patients. The pre-germinal-center naive B-cells, which populate the mantle zone of the secondary lymphoid follicles, are the cells of origin of mantle cell lymphoma. Overexpression of cyclin D1 is not sufficient by itself to cause lymphoma, and a better understanding of the additional molecular lesions may provide insights toward new therapeutic approaches. In this context, large scale gene expression studies may be useful in the investigation of such additional molecular lesions. However, the great majority of mantle cell lymphoma cases studied by these methods to date had the genetic material harvested from lymph nodes, which have a variable proportion of normal cells from the lymphoid stroma. It is therefore not known how many genes identified as differentially expressed in mantle cell lymphoma by tumor versus normal experiments are cell-autonomous rather than dependent on the tumor microenvironment. To address this issue, we compared the gene expression profile of mantle cell lymphoma cells and normal naive B-cells using oligonucleotide microarrays. Lymphoma cells and naive B-cells (IgD+CD38 $\pm$ CD27-) were highly purified, by magnetic activated cell sorting, from the peripheral blood of patients with mantle cell lymphoma in the leukemic phase and from tonsils of normal individuals, respectively (purity > 95% in all samples). Three individuals were selected for each group and experiments were performed in replicates using the Amersham CodeLink Human UniSet I Bioarrays, with 10,000 genes. We identified 106 genes differentially expressed with a fold change of at least three-fold, 63 induced and 43

repressed in mantle cell lymphoma in comparison with naive B-cells. Ten genes were selected (six induced and four repressed in lymphoma cells) for quantification by real-time RT-PCR in non-purified peripheral blood samples from 21 patients with mantle cell lymphoma in the leukemic phase, as well as in 14 patients with other chronic lymphoproliferative diseases and seven normal individuals. Microarray results were confirmed by real-time RT-PCR for all selected genes and expression values of the *TLR1* gene as quantified by this method showed significant correlation with patient survival in mantle cell lymphoma. In addition to the identification of several modulated genes in mantle cell lymphoma at cellular level, this study revealed that some genes functionally connected through apoptosis or the PI3K/AKT, WNT and TGF β signaling pathways are aberrantly expressed in mantle cell lymphoma. These results add original data to the molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma and point to specific molecular signaling pathways related to inhibition of apoptosis as potential targets for new therapeutic approaches.

Keywords: Non-Hodgkin's lymphoma. Mantle cell lymphoma. Gene expression profiling.
Microarrays

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Linfoma de células do manto: denominação e conceito	1
1.2 Características clínicas e imunofenotípicas	4
1.3 A translocação t(11;14)(q13;q32): da patogenia ao diagnóstico	6
1.4 Origem celular e patogênese molecular do linfoma de células do manto	8
1.5 Perfil de expressão gênica	11
2 Objetivos	20
3 Pacientes e métodos	21
3.1 Pacientes e controles	21
3.2 Caracterização dos pacientes e controles	22
3.2.1 Pacientes com linfoma de células do manto	22
3.2.2 Indivíduos controle e pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas	26
3.3 Linhagem celular e cultura de células	27
3.4 Purificação de células por separação magnética	28
3.4.1 Purificação dos linfócitos B virgens	28
3.4.2 Purificação das células linfomatosas do sangue periférico	29
3.5 Citometria de fluxo	30
3.5.1 Imunofenotipagem das doenças linfoproliferativas crônicas ao diagnóstico	30
3.5.2 Grau de pureza das amostras isoladas por separação celular magnética	31
3.6 Extração do RNA	32
3.7 Experimentos com <i>microarrays</i> de oligonucleotídeos	33
3.8 RT-PCR em tempo real	36
3.9 Análise dos dados	37
4 Resultados	38
4.1 Genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto	38
4.2 Validação dos resultados dos <i>microarrays</i>	43
4.3 Vias de sinalização com expressão aberrante no linfoma de células do manto	51
5 Discussão	53
6 Conclusões	72
Referências	73
Anexos	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma de células do manto: denominação e conceito

O linfoma de células do manto é um subtipo de linfoma não-Hodgkin cujas características clínicas, anatomopatológicas, imunofenotípicas e genéticas vêm sendo caracterizados nos últimos 30 anos (SWERDLOW; WILLIAMS, 2002). A evolução desse processo ilustra de maneira ímpar como os métodos de investigação desenvolvidos ao longo das últimas três décadas têm sido utilizados para melhor definir e compreender um linfoma originalmente reconhecido somente por seus aspectos morfológicos. Assim, constitui um excelente exemplo do sucesso da abordagem multiparamétrica atualmente empregada em onco-hematologia e fundamenta os princípios que norteiam esforços continuados no desenvolvimento de uma classificação precisa dos linfomas não-Hodgkin. Em adição, estudos recentes têm demonstrado que o conhecimento das alterações genéticas e moleculares do linfoma de células do manto pode transcender o campo da onco-hematologia, com implicações significativas no estudo do câncer de um modo geral (PARDAL; CLARKE; MORRISON, 2003).

Na década de setenta, Berard e Dorfman¹ (1974 apud WEISENBURGER; ARMITAGE, 1996) cunharam o termo “linfoma linfocítico de diferenciação intermediária” para descrever um grupo de linfomas não-Hodgkin que não podia ser classificado como de pequenas células clivadas, nem como de pequenas células não-clivadas. Nas biópsias de gânglio, esses tumores eram constituídos por uma mistura de células linfóides pequenas, com núcleos arredondados,

¹ BERARD C.W.; DORFMAN R.F. Histopathology of malignant lymphomas. **Clinics in Haematology**, London, v. 3, p. 39, 1974.

entremeadas por linfócitos com núcleo indentado ou clivado. Assim, o termo “intermediário” foi utilizado para descrever a aparência morfológica desses tumores (TRÜMPER et al., 2004). Na mesma época, um grupo de hematopatologistas europeus descreveu um subtipo de linfoma bastante semelhante, que foi denominado “linfoma centrocítico” (GERARD-MARCHAND et al., 1974). Estudos imunológicos preliminares, seja dos norte-americanos, que adotaram a denominação linfoma linfocítico de diferenciação intermediária, seja dos europeus, que preferiam o nome linfoma centrocítico, revelaram tratar-se de uma neoplasia de imunofenótipo B, cujas células tumorais demonstravam marcação de moderada a intensa para imunoglobulinas monoclonais de superfície (BERARD et al., 1978; TOLKSDORF; STEIN; LENNERT, 1980).

No início da década de oitenta, Weisenburger, Kim e Rappaport (1982) e Palutke et al. (1982) descreveram um subtipo de linfoma folicular caracterizado pela proliferação de células linfóides pequenas e atípicas, que alargavam as zonas do manto em torno de centros germinativos. Weisenburger (WEISENBURGER et al., 1981; WEISENBURGER; KIM; RAPPAPORT, 1982) sugeriu o termo “linfoma da zona do manto” para designar esse subtipo de linfoma não-Hodgkin, que segundo ele representava o correspondente folicular do linfoma linfocítico intermediário difuso.

Em 1992, o *International Lymphoma Study Group* propôs que a denominação “linfoma de células do manto” substituísse todos os outros nomes que vinham sendo empregados até então (BANKS et al., 1992). Em 1994, os aspectos clinicopatológicos, imunofenotípicos e genotípicos do linfoma de células do manto foram definidos num *workshop* de consenso organizado pela *European Task Force on Lymphoma*, em Annecy, França (ZUCCA; STEIN; COIFFIER, 1994). Naquela ocasião, foram reconhecidas não só a grande heterogeneidade morfológica do linfoma de células do manto, mas também a associação recorrente com a translocação cromossômica t(11;14)(q13;q32). Além disso, foi enfatizada a importância da abordagem multifacetada no diagnóstico do linfoma de células do manto pela combinação dos achados morfológicos, imunofenotípicos e genotípicos.

Também em 1994, o *International Lymphoma Study Group* publicou um novo sistema de classificação que pretendia ser “universal” e incorporava todas as novas informações sobre linfomas que haviam surgido nos anos anteriores, procurando acabar com as divergências entre os hematopatologistas europeus e norte-americanos, que historicamente vinham utilizando diferentes esquemas de classificação de linfomas. Esse novo sistema de classificação, que ficou conhecido como REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*), teve o mérito de preconizar o uso rotineiro de métodos imunológicos e genéticos, em associação à análise morfológica, no diagnóstico das neoplasias linfóides. Adicionalmente, reconheceu o linfoma de células do manto como um subtipo específico de linfoma não-Hodgkin caracterizado por exibir imunofenótipo típico, amplo espectro de apresentação do ponto de vista morfológico, e associação recorrente à translocação t(11;14)(q13;q32) e à expressão anômala da ciclina D1 no tecido linfóide (HARRIS et al., 1994).

Em 2001, foi publicada a Classificação de Tumores Hematopoéticos e dos Tecidos Linfóides da Organização Mundial da Saúde (JAFFE et al., 2001). Com relação ao linfoma de células do manto, essa nova classificação adotou integralmente as recomendações da classificação REAL e acrescentou os conhecimentos que haviam surgido acerca da biologia da doença, corroborando que todos os casos de linfoma de células do manto possuem evidência da translocação t(11;14)(q13;q32) ou da expressão anômala da ciclina D1, seja em nível protéico, seja em nível molecular. A classificação da Organização Mundial da Saúde teve ainda a virtude de não se restringir à hematopatologia, incorporando uma breve — porém exemplar — descrição dos principais dados clínicos, epidemiológicos e dos fatores prognósticos de cada subtipo de linfoma (SWERDLOW et al., 2001).

A classificação da Organização Mundial da Saúde reconheceu três formas de apresentação morfológica do linfoma de células do manto: a forma clássica, a forma blastóide e a forma de linfócitos pequenos. A forma clássica exibe destruição arquitetural com proliferação linfóide monomórfica e padrão de acometimento nodular, difuso ou ampliando a zona do manto. Na

forma blastóide, as células assemelham-se a linfoblastos, com cromatina dispersa e um elevado índice mitótico. A forma de linfócitos pequenos caracteriza-se por apresentar linfócitos pequenos, redondos e com cromatina condensada, bastante semelhante àqueles observados no linfoma linfocítico (SWERDLOW et al., 2001).

1.2 Características clínicas e imunofenóticas

O linfoma de células do manto representa 6% dos linfomas não-Hodgkin (A CLINICAL..., 1997) e acomete indivíduos com idade em torno dos 60 anos. Predomina no sexo masculino, com uma relação homem:mulher acima de 2:1 (SWERDLOW et al., 2001), podendo atingir até 6,5:1 (DECAUDIN; SALANOUBAT; CARDE, 2000). A apresentação clínica típica é de um paciente com múltiplos gânglios com tamanho variando de 2 a 5 cm (BARISTA; ROMAGUERA; CABANILLAS, 2001), e os estágios III ou IV da classificação de Ann Arbor são detectados em mais de 70% dos pacientes (CAMPO; RAFFELD; JAFFE, 1999). A presença de esplenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia volumosa são observadas em 55%, 35% e 30% dos pacientes, respectivamente (MOLINA et al., 2000; SWERDLOW; WILLIAMS, 2002). A medula óssea pode estar acometida em mais de três quartos dos pacientes, e o sangue periférico, em mais da metade (CAMPO; RAFFELD; JAFFE, 1999; COHEN et al., 1998). A invasão do trato gastrointestinal (polipose linfomatosa) é descrita em 15% dos casos e do anel de Waldeyer em 10% (SWERDLOW; WILLIAMS, 2002). A mediana de sobrevida dos pacientes portadores do linfoma das células do manto é de três a quatro anos, sendo conhecido como um dos subtipos de pior prognóstico dentre os linfomas não-Hodgkin (ARGATOFF et al., 1997; NORTON et al., 1995; PITTALUGA et al., 1996; ZUCCA et al., 1995). A resposta a qualquer

regime de quimioterapia geralmente é de curta duração, e até recentemente era considerado incurável mesmo com a utilização de regimes agressivos de tratamento (MEUSERS; HENSE, 1999). Nos últimos anos, porém, foram alcançados resultados promissores com protocolos de quimioterapia em altas dosagens, em associação ao transplante de células-tronco hematopoéticas (KHOURI et al., 1998). Outro esquema recentemente proposto com sucesso foi a adoção do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas utilizando regimes de condicionamento não ablativos (KHOURI et al., 2003). Além disso, tem se mostrado eficaz a incorporação da imunoterapia aos esquemas de quimioterapia convencionais e ao transplante autólogo ou alogênico de células-tronco hematopoéticas, por meio da adição dos anticorpos monoclonais anti-CD20 (rituximab) (BERINSTEIN; MANGEL, 2004). No entanto, ainda não estão disponíveis os dados de seguimento de longo prazo dos pacientes que utilizaram essas novas abordagens.

Conforme exposto, a invasão do sangue periférico no linfoma de células do manto é relativamente freqüente, e o desenvolvimento de uma franca fase leucêmica é identificado em cerca de um terço dos casos (ARGATOFF et al., 1997; BOSCH et al., 1998; LETESTU et al., 2004; MARTINEZ-CLIMENT et al., 2001; ORCHARD et al., 2003; WONG et al., 1999). Ainda que controverso, o critério mais aceito para definir a fase leucêmica dos linfomas não-Hodgkin indolentes de imunofenótipo B é a detecção de linfocitose persistente acima de $5 \times 10^9/L$, na ausência de outras doenças que possam justificar esse achado (BENNETT et al., 1989; MARQUES, 1997). O quadro clínico do linfoma de células do manto em fase leucêmica é bastante variável, uma vez que já foram descritas evoluções clínicas tanto indolentes, quanto extremamente desfavoráveis (ARGATOFF et al., 1997; BOSCH et al., 1998; COHEN et al., 1998; DE OLIVEIRA; JAFFE; CATOVSKY, 1989; LETESTU et al., 2004; MARTINEZ-CLIMENT et al., 2001; MOLINA et al., 2000; ORCHARD et al., 2003; VANDENBERGHE et al., 1997; WEISENBURGER et al., 2000; WONG et al., 1999). Até o momento, no entanto, não foram encontrados os fatores que possam justificar essa disparidade.

Do ponto de vista imunofenotípico, o linfoma de células do manto apresenta, tipicamente, a expressão dos antígenos CD5, FMC7, CD79b e CD43; além dos demais marcadores pan-B, como o CD19, CD20, CD22 e CD79a. Caracteristicamente, não exibe os marcadores CD23, CD10, CD25, CD11c e CD103, presentes em outras doenças linfoproliferativas de imunofenótipo B. As imunoglobulinas de superfície costumam ter intensidade de expressão de moderada a acentuada, com freqüente co-expressão dos subtipos IgM e IgD. Ao contrário dos outros linfomas B, há uma tendência particular do linfoma de células do manto em apresentar restrição clonal para cadeias leves do subtipo lambda (CAMPO; RAFFELD; JAFFE, 1999). Não obstante, são inúmeras as exceções ao imunofenótipo típico, e mesmo o antígeno CD5, considerado um marcador consistentemente expresso no linfoma de células do manto, pode estar ausente em até 17% dos casos (LIU et al., 2002; MATUTES et al., 2004).

1.3 A translocação t(11;14)(q13;q32): da patogenia ao diagnóstico

A translocação t(11;14)(q13;q32) foi identificada por citogenética convencional na década de 70 como um evento aparentemente raro nos linfomas não-Hodgkin de imunofenótipo B. A clonagem do seu ponto de quebra, no entanto, só veio a ocorrer em 1984 (TSUJIMOTO et al., 1984). Assim como na maioria dos linfomas de imunofenótipo B, foi observado que o ponto de quebra envolvia o locus do gene da cadeia pesada da imunoglobulina, situado no braço longo do cromossomo 14. Com a translocação, esse gene se une a uma região da banda 11q13, na época conhecida como bcl-1 (*B-cell leukemia/lymphoma 1*) devido ao oncogene que se postulava existir nesse locus. O provável oncogene bcl-1 permaneceu desconhecido até que Motokura et al. (1991)

clonaram o gene a partir de adenomas de paratireóide. As células dos adenomas tinham uma inversão pericêntrica inv(11)(p15q13) que ativava um gene do locus 11q13, batizado de *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis*). Motokura et al. (1991) demonstraram que sua função era codificar uma proteína capaz de ativar o ciclo celular. A clonagem desse gene foi subsequentemente confirmada em vários laboratórios, utilizando-se fungos, células de linfomas ou de neoplasias de cabeça e pescoço. Nesses experimentos, comprovou-se que o gene *PRAD1* codificava uma proteína que exercia sua função durante a fase G1 do ciclo celular, e a essa proteína foi dado o nome de ciclina D1 (*CCND1*) (LEW; DULIC; REED, 1991; ROSENBERG et al., 1991; SCHUURING et al., 1992; WITHERS et al., 1991). Inicialmente, a ciclina D1 foi aceita como provável produto do gene *BCL1* apenas porque não se demonstrou nenhuma outra região codificante entre o ponto de quebra da translocação t(11;14)(q13;q32) e o locus da ciclina D1 (ROSENBERG et al., 1991; WITHERS et al., 1991).

Com o desenvolvimento de sondas de *Southern blot* para os vários possíveis pontos de quebra do locus *BCL1/CCND1* na banda 11q13, identificou-se uma forte associação entre o linfoma de células do manto e a detecção de anormalidades nessa região (WILLIAMS et al., 1993). O uso de múltiplas sondas demonstrou que os pontos de quebra estavam espalhados por uma região de 120 kilobases a montante do primeiro éxon do gene da ciclina D1 e que não ocorriam rupturas na região codificante desse gene (WILLIAMS et al., 1993). Os estudos de *Southern blot* demonstraram que 70% a 80% dos casos de linfoma de células do manto possuíam rearranjos no locus *BCL1/CCND1*; porém, essa técnica tinha sérias limitações do ponto de vista prático e eram necessários vários tipos de sondas para rastrear todos os possíveis pontos de quebra, limitando o seu uso como método de diagnóstico. Pelo mesmo motivo, não houve sucesso nas tentativas de utilização da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), que embora muito mais prática, era ainda mais limitada e identificava apenas 40% a 50% dos casos (LUTHRA; HAI; PUGH, 1995; MOLOT' et al., 1994). O método que conseguiu contornar esses problemas e provou detectar a translocação t(11;14)(q13;q32) em mais de 95% os

casos de linfoma de células do manto foi a técnica de citogenética molecular conhecida como hibridização *in situ* com fluorescência (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), que vem sendo empregada no diagnóstico do linfoma de células do manto em laboratórios com experiência no método até os dias de hoje (KODET et al., 2003; LI et al., 1999; VAANDRAGER et al., 1996).

Como a ciclina D1 não está presente no tecido linfóide normal (SHERR, 1996), a detecção da expressão dessa proteína (DE BOER et al., 1995a; YANG et al., 1994) ou de seu RNA mensageiro (mRNA) (AGUILERA et al., 1998; DE BOER et al., 1995b; UCHIMARU et al., 1997) no tecido linfóide pode ser usada como um marcador diagnóstico do linfoma de células do manto. Nesse contexto, o advento da técnica conhecida como transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time polymerase chain reaction after reverse transcription*, RT-PCR em tempo real) para a quantificação da expressão gênica fez com que esse passasse a ser o método preferido na detecção da expressão do mRNA da ciclina D1 em neoplasias linfóides. Por se tratar de uma técnica simples, rápida, relativamente barata e bastante conveniente para a quantificação do gene da ciclina D1 em diferentes tecidos, foi rapidamente incorporada aos métodos utilizados de rotina na abordagem diagnóstica multifacetada do linfoma de células do manto (BIJWAARD et al., 2001; ROSENWALD et al., 2003; SPECHT et al., 2002; SUZUKI et al., 2001).

1.4 Origem celular e patogênese molecular do linfoma de células do manto

Em termos de origem celular, o linfoma de células do manto é considerado o correspondente neoplásico de uma das etapas da diferenciação dos linfócitos B normais: o linfócito B virgem (*naïve*). A relação do linfoma de células do manto com os linfócitos B virgens

foi inicialmente proposta pelo fato de que ambos ocupam a mesma estrutura histológica: a zona do manto dos folículos linfóides secundários. Além disso, foi ainda na época em que europeus e norte-americanos adotavam diferentes denominações para o linfoma de células do manto que surgiram as primeiras especulações acerca de sua origem celular. Os europeus acreditavam que o linfoma centrocítico era derivado de células do centro germinativo (TOLKSDORF; STEIN; LENNERT, 1980), mas estudos empregando coloração citoquímica com fosfatase alcalina, realizados pelos norte-americanos, sugeriram que o linfoma linfocítico de diferenciação intermediária apresentava padrão de coloração idêntico ao dos linfócitos normais presentes nos folículos linfóides primários e na zona do manto dos folículos linfóides secundários (NANBA et al., 1977).

Recentemente, essa hipótese foi fortalecida tanto pelas semelhanças imunofenotípicas entre o linfoma de células do manto e os linfócitos B virgens (HARRIS et al., 2001), quanto pelos estudos de determinação do status mutacional da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina, cujos resultados demonstraram que os pacientes com linfoma de células do manto tinham essa região em configuração não mutada, ou seja, na mesma configuração das células que não sofreram exposição ao processo de hipermutação somática no centro germinativo, as quais correspondem aos linfócitos B virgens — também denominados linfócitos pré-centro germinativo. Assim, essa foi mais uma forte evidência de que o linfoma de células do manto tem sua origem celular nos linfócitos B virgens (DU et al., 1997; HUMMEL et al., 1994; KUPPERS et al., 1999).

Nos dois últimos anos, entretanto, novos estudos de determinação do status mutacional da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina revelaram que 16% a 34% dos casos de linfoma de células do manto apresentam mutações nesses genes, o que poderia sugerir uma origem celular a partir de linfócitos do próprio centro germinativo (centroblastos e centrócitos), ou mesmo de linfócitos pós-centro germinativo (linfócitos B de memória), para uma parte mensurável dos casos de linfoma de células do manto (CAMACHO et al., 2003; KIENLE et al.,

2003; ORCHARD et al., 2003; WALSH et al., 2003). Todavia, num desses estudos, Walsh et al. (2003) selecionaram, para investigação adicional, cinco pacientes com linfoma de células do manto que apresentavam mutações na região variável da cadeia pesada da imunoglobulina. Nesses pacientes, não foram encontrados processos em andamento de hipermutação somática que pudessem sugerir uma origem celular a partir de linfócitos do centro germinativo. Além disso, foi recentemente demonstrado que, para que ocorra a hipermutação somática, é dispensável a passagem pelo centro germinativo (WELLER et al., 2001; WILLIAM et al., 2002). Como consequência, uma das hipóteses correntes é que os casos de linfoma de células do manto com mutação nos genes da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina correspondam a células precursoras do próprio linfoma, com origem a partir de linfócitos B virgens, que tenham sofrido os processos de hipermutação somática fora do centro germinativo (WALSH et al., 2003). Por fim, Welzel et al. (2001) demonstraram que a recombinação V(D)J — recombinação genética das regiões “variável”, “diversidade” e “juncional” que ocorre no desenvolvimento dos linfócitos B normais — é o mecanismo causador da translocação t(11;14)(q13;q32) na maioria dos casos de linfoma de células do manto. A recombinação V(D)J acontece predominantemente em linfócitos B maduros, mas ainda jovens, ou seja, nos linfócitos B virgens (WELZEL et al., 2001). Portanto, a despeito dos estudos recentes sobre o status mutacional dos genes da cadeia pesada da imunoglobulina, os linfócitos B virgens continuam sendo considerados a origem celular do linfoma de células do manto, pelo menos na grande maioria dos casos.

Em termos de patogênese molecular, postulava-se que a translocação t(11;14)(q13;q32) e a conseqüente hiperexpressão da ciclina D1 fossem os eventos iniciais na transformação maligna do linfoma de células do manto, já que essa alteração genética está presente em todos os casos de linfoma de células do manto e a ciclina D1 não é expressa no tecido linfóide normal. No entanto, o modelo transgênico em camundongos de indução da hiperexpressão do gene da ciclina D1 com controle transcricional pela região promotora do gene da imunoglobulina — portanto idêntico ao rearranjo gênico humano —, não resultou na formação de linfomas, havendo a necessidade da

cooperação do oncogene MYC, em modelos duplo transgênicos, para que ocorresse linfomagenese (BODRUG et al., 1994; LOVEC et al., 1994). Esses experimentos levantaram a possibilidade de que outros eventos genéticos, até então desconhecidos, pudessem preceder a hiperexpressão de ciclina D1 na patogênese do linfoma de células do manto. Outra possibilidade suscitada foi de que alterações subseqüentes à translocação t(11;14)(q13;q32) pudessem agir em sinergia na transformação maligna dos linfócitos B virgens. Essas hipóteses contextualizam-se com várias linhas de evidência sugerindo que a oncogênese é um processo multifásico cujas sucessivas etapas refletem alterações genéticas que conferem vantagens proliferativas e levam à progressiva transformação de células normais em células neoplásicas (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). Assim, inúmeros estudos investigaram o papel de genes que participam da regulação do ciclo celular (p53, p15/p16, p18, p27, MDM2), ou do reparo do DNA (ATM; *Ataxia telangiectasia mutated*), procurando encontrar os mecanismos predominantes na transformação maligna (BERTONI; ZUCCA; COTTER, 2004; SWERDLOW; WILLIAMS, 2002). Nenhum dos genes investigados, no entanto, pôde ser identificado como protagonista com papel de destaque na patogênese do linfoma de células do manto. Mais recentemente, com o desenvolvimento de métodos de estudo da expressão gênica em larga escala, como os *microarrays*, foram detectadas anormalidades em inúmeros outros genes além daqueles relacionados ao ciclo celular e ao reparo do DNA. O conteúdo desses estudos será discutido de maneira detalhada na próxima seção.

1.5 Perfil de expressão gênica

Hofmann et al. (2001) compararam o perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto com o perfil de expressão gênica de gânglios normais, utilizando *microarrays* de oligonucleotídeos (modelo HuGeneFL, com 5.600 genes, fabricado pela Affymetrix). O material genético foi isolado de gânglios de pacientes com linfoma de células do manto e de gânglios hiperplásicos sem neoplasia de indivíduos controle. Nas amostras de linfoma, o RNA total foi extraído de tecido tumoral congelado, isolado por microdissecção. As hibridizações aos *microarrays* foram realizadas com amostras de cinco pacientes com linfoma de células do manto e de quatro indivíduos controle. Os genes com variação de expressão maior do que três vezes na comparação entre os dois grupos, em pelo menos quatro das cinco amostras de tumor analisadas, foram considerados como diferencialmente expressos. Com essa abordagem, identificou-se 92 genes modulados; 50 induzidos e 42 reprimidos no linfoma de células do manto em relação ao tecido linfóide hiperplásico reacional. Os resultados dos experimentos de *microarrays* foram validados por RT-PCR em tempo real. Dentre os genes diferencialmente expressos, 11 foram selecionados e quantificados em 16 amostras de gânglios acometidos por linfoma de células do manto e em 12 amostras de gânglios hiperplásicos. Dos 11 genes selecionados, 10 apresentaram padrões similares de expressão pelos dois métodos. Além de revelar vários genes com expressão aberrante no linfoma de células do manto, o estudo de Hofmann et al. (2001) foi pioneiro em demonstrar a repressão do gene *FADD* (*Fas-associated via death domain*) no linfoma de células do manto. Esse gene participa da via de sinalização do FAS e tem um papel essencial na indução de apoptose mediada pelo gene *FAS* (CHANG; YANG; BALTIMORE, 1999). Além disso, esse estudo demonstrou que outros genes relacionados à apoptose, principalmente aqueles que compõem a via de sinalização do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF), estavam reprimidos no linfoma de células do manto; enquanto o gene *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), um conhecido inibidor da apoptose pela via mitocondrial, estava induzido (HOFMANN et al., 2001).

Ek et al. (2002) também utilizaram *microarrays* de oligonucleotídeos (modelo U95, com 12.700 genes, fabricado pela Affymetrix) para estudar gânglios acometidos por linfoma de células

do manto e cinco subpopulações de linfócitos B normais obtidas de amígdalas: linfócitos B virgens, linfócitos B pré-ativados, centroblastos, centrócitos e linfócitos B de memória. Foram estudados sete casos de linfoma de células do manto, dois dos quais tiveram o tecido ganglionar cortado em pequenos fragmentos e as células linfomatosas foram purificadas. As subpopulações de linfócitos B foram isoladas de quatro indivíduos normais por separação celular ativada por citometria de fluxo. De particular interesse, os linfócitos B virgens foram selecionados pela positividade para o antígeno IgD de membrana e negatividade para o CD23, enquanto os linfócitos B pré-ativados foram isolados pela positividade para ambos os marcadores. Nesse estudo, foi investigada, pelo método de clusterização hierárquica, a homologia entre os padrões de expressão gênica do linfoma de células do manto e das diferentes subpopulações de linfócitos B normais. Quatro casos de linfoma de células do manto demonstraram homologia com os subgrupos de linfócitos B virgens, linfócitos B pré-ativados e linfócitos B de memória (subpopulações extra-centro germinativo), enquanto os outros três casos agruparam-se com os centroblastos e centrócitos, células do centro germinativo. Uma outra estratégia de análise dos dados utilizada nesse estudo foi a comparação do perfil de expressão gênica das amostras de tumores com as amostras das cinco subpopulações de linfócitos B normais, analisadas em conjunto. Foram identificados entre 300 e 400 genes desregulados no linfoma de células do manto, dos quais os autores selecionaram 90 genes — melhor caracterizados do ponto de vista funcional na literatura — para focar sua discussão. Não foi realizada a validação dos resultados por outros métodos de quantificação da expressão gênica. Alguns genes relacionados à indução de metástases (*MMP9*, *NMB*, *ATX* e *CST3*) estavam induzidos apenas nas amostras provenientes de biópsias de gânglio, mas reprimidos nas amostras de células linfomatosas purificadas, sugerindo que as células do estroma do gânglio, mas não as células tumorais, são as verdadeiras responsáveis pela expressão aumentada desses genes. Ainda de interesse, foi demonstrado que alguns genes da família $TGF\beta$ estavam reprimidos no linfoma de células do manto, como os genes *TGF β 2* e *SMAD3*. Os autores concluíram que no linfoma de células do manto ocorrem

alterações nas vias de sinalização relacionadas aos processos de migração, diferenciação e proliferação dos linfócitos B, e que a análise por clusterização hierárquica indicou que pelo menos dois subtipos da doença podem existir (EK et al., 2002).

Rosenwald et al. (2003) estudaram o perfil de expressão gênica de 101 pacientes com linfoma de células do manto utilizando *microarrays* de cDNA (Lymphochip DNA micorarrays, com 12.196 genes). Dos 101 casos, 92 possuíam hiperexpressão do gene da ciclina D1 detectada por RT-PCR em tempo real, enquanto nove casos não apresentaram hiperexpressão da ciclina D1 e foram diagnosticados com base somente nos achados morfológicos e imunofenotípicos. Nesse estudo, o perfil de expressão gênica dos 92 casos de linfoma de células do manto com hiperexpressão da ciclina D1 foi comparado àquele de 20 casos de linfoma linfocítico e de 134 casos de linfoma difuso de grandes células B. Mais de 1.000 genes foram identificados como diferencialmente expressos no linfoma de células do manto (WIESTNER; STAUDT, 2003). Os autores criaram um modelo de predição para o linfoma de células do manto, baseado na expressão dos 42 genes mais discriminatórios, que foi capaz de identificar corretamente 98% dos casos de linfoma de células do manto. Além disso, esse modelo identificou, como pertencentes à mesma categoria, sete dos nove casos que não expressaram o gene da ciclina D1. Desses sete casos, três demonstraram níveis elevados de ciclina D3 ou de ciclina D2, sugerindo uma possível substituição funcional da ciclina D1. O perfil de expressão gênica dos 92 casos com hiperexpressão da ciclina D1 foi também utilizado para identificar 48 genes que estavam mais expressos nos pacientes com pior prognóstico. Desses 48 genes, mais da metade estavam relacionados à proliferação celular e 20 foram selecionados para determinar uma “assinatura genética” quantitativa, cujo resultado foi utilizado para dividir os pacientes em quatro subgrupos (quartis). A mediana de sobrevida do primeiro quartil foi de 6,71 anos; do segundo, 3,28 anos; do terceiro, 2,31 anos; e a do quarto quartil foi de apenas 0,83 anos. Além disso, foi construído um modelo matemático capaz de prever a sobrevida dos pacientes utilizando os valores de expressão de apenas quatro genes — *CDC2*, *ASPM*, *TUBA1* e *CENPF*. Nesse estudo, foi

demonstrado ainda que a deleção do gene *p16^{INK4a}* e a presença de níveis elevados de expressão do mRNA da ciclina D1 também são preditores independentes de uma elevada taxa de proliferação tumoral e se correlacionam com sobrevida mais curta. Os autores concluíram que a assinatura genética de proliferação celular integra múltiplos eventos oncogênicos que afetam a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular e se correlacionam com uma sobrevida mais curta nos pacientes com linfoma de células do manto (ROSENWALD et al., 2003).

Islam et al. (2003) estudaram biópsias de gânglio de nove pacientes com linfoma de células do manto e tecido linfóide proveniente de amígdalas (dois indivíduos) ou gânglios (três indivíduos) sem doença neoplásica. A porcentagem de células com imunofenótipo B foi aferida em alíquotas das amostras de gânglio (58% a 94%) e de tecido linfóide normal (12% a 57%). Nesse trabalho, foram utilizados *microarrays* de oligonucleotídeos (modelo U95Av.2, com mais de 12.500 genes, da Affymetrix). Foi realizada a comparação do perfil de expressão gênica entre pacientes e controles e os genes com diferencial de expressão de três vezes ou mais, em pelo menos cinco das nove amostras de linfoma de células do manto estudadas, foram selecionados para a análise. Os autores destacaram a indução do gene *CNR1* (*Cannabinoid receptor 1*) no linfoma de células do manto, cujos resultados foram confirmados por imunofluorescência e por *immunoblot*; bem como a repressão do gene *RGS13* (*Regulator of G-protein signalling 13*), cujos resultados foram confirmados por RT-PCR convencional. Levantou-se a hipótese, não comprovada, de que os dois genes (*CNR1* e *RGS13*) participam da mesma via de sinalização, e os autores foram cautelosos em sugerir que experimentos adicionais são necessários tanto para esclarecer o papel dos receptores canabinóides, quanto para investigar se essas alterações podem constituir novos alvos terapêuticos no linfoma de células do manto (ISLAM et al., 2003).

Martinez et al. (2003) estudaram biópsias de gânglio de 38 pacientes com linfoma de células do manto e linfócitos B virgens purificados de amígdalas pelos seguintes marcadores de membrana: CD19⁺, CD27⁻ e IgD⁺. Embora não tenha sido informado o número de indivíduos normais que participaram desse estudo, subentende-se que foi utilizada apenas uma amostra

controle, com 84% de pureza pela quantificação por citometria de fluxo. Foram utilizados *microarrays* de cDNA (CNIO OncoChip, com 6386 clones) com 2945 genes conhecidos e 1854 etiquetas de seqüências expressas (*expressed sequence tags*, EST's) passíveis de análise. Foram considerados como diferencialmente expressos os genes induzidos ou reprimidos duas vezes ou mais — em relação à amostra de linfócitos B virgens utilizada para normalização — em pelo menos 50% dos casos de linfoma de células do manto estudados. Por essa análise, identificou-se 233 genes induzidos e 213 reprimidos no linfoma de células do manto. Os autores destacaram a presença de alterações nas vias de sinalização do TNF e do fator nuclear κ B (*nuclear factor kappa B*, NF κ B), ambas relacionadas à apoptose; além da hiperexpressão do receptor da interleucina 10 (*interleucin 10 receptor*, IL10R) e do gene SPARC [*secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)*] (MARTINEZ et al., 2003).

Schmechel et al. (2004) utilizaram *microarrays* de cDNA com 7488 clones ou EST's, sintetizados na Universidade de Washington, EUA, para comparar o perfil de expressão gênica de 18 indivíduos com gânglios reacionais, 21 casos de linfoma folicular, 25 casos de linfoma linfocítico e 13 casos de linfoma de células do manto, todos com material genético extraído de gânglios coletados ao diagnóstico. Nesse estudo, foi realizado *pool* do RNA das amostras de cada grupo e foram feitas múltiplas comparações entre as classes. Entretanto, apenas 23 dos 35 (66%) genes selecionados para validação por RT-PCR em tempo real demonstraram resultados concordantes com aqueles obtidos pelos *microarrays* (SCHMECHEL et al., 2004). Também abordando comparações múltiplas, Thieblemont et al. (2004) utilizaram *microarrays* de cDNA com 6692 clones para estudar biópsias de tecido tumoral de 28 pacientes com linfoma linfocítico, 37 pacientes com linfoma esplênico da zona marginal e 56 pacientes com linfoma de células do manto. Esses autores encontraram um grupo de 154 genes que discriminavam o linfoma de células do manto das demais entidades. A maioria desses genes estava associada ao ciclo celular, ao controle da atividade transcricional e à resistência a drogas (THIEBLEMONT et al., 2004).

Por fim, os *microarrays* também foram utilizados em estudos com outros tipos de desenho experimental, com o objetivo de comparar diferentes subgrupos de pacientes com linfoma de células do manto entre si. Assim, De Vos et al. (2003) compararam o perfil de expressão gênica de pacientes com a forma clássica do linfoma de células do manto com aquele de pacientes com a variante blastóide. Da mesma forma, Ek et al. (2004) compararam o perfil de expressão gênica de pacientes com linfoma de células do manto de elevado índice proliferativo (expressão de Ki-67 maior que 30%), com o perfil de expressão gênica de pacientes com baixo índice proliferativo (expressão de Ki-67 menor do que 10%). Além disso, esses autores compararam casos recidivados com linfomas primários. O desenho experimental dessas duas últimas investigações, no entanto, não é o foco do presente estudo.

As mudanças transcricionais que ocorrem nas sucessivas etapas de diferenciação dos linfócitos B normais também podem fornecer informações relevantes à compreensão dos processos responsáveis pelas alterações genéticas que causam os linfomas (SHAFFER; ROSENWALD; STAUDT, 2002). Nesse contexto, Klein et al. (2003) utilizaram *microarrays* de oligonucleotídeos (modelo U95A, com 12.500 genes, da Affymetrix) para estudar o perfil de expressão gênica de diferentes subpopulações de linfócitos provenientes de amígdalas, correspondentes às diferentes etapas de diferenciação dos linfócitos B. Esses autores optaram por uma estratégia rigorosa de separação das subpopulações de linfócitos B, baseada nas combinações de antígenos de membrana expressas por essas células. Foi observado que os centroblastos e centrócitos possuem um perfil de expressão gênica bastante semelhante, enquanto os linfócitos B virgens têm perfil mais parecido àquele dos linfócitos B de memória. Nesse estudo, os linfócitos B virgens foram caracterizados pela expressão de genes antiapoptóticos e inibidores do ciclo celular. A transição de linfócitos B virgens para centroblastos foi marcada pela indução de um programa de proliferação atípico, que não utilizava o gene *c-Myc*, além da mudança de perfil para genes pró-apoptóticos e diminuição da expressão de receptores de citocinas, de quimiotaxinas e de moléculas de adesão. Shen et al. (2004b) realizaram

estudo semelhante, isolando subpopulações de linfócitos B em amostras provenientes de amígdala e baço, tanto por microdissecção a laser da zona do manto, do centro germinativo e da zona marginal, quanto pelo método de separação celular ativada por citometria de fluxo. Além das comparações entre as diferentes etapas de diferenciação dos linfócitos B, esses autores utilizaram *microarrays* de cDNA (Lymphochip DNA *microarrays*, com 12.196 genes) para comparar o perfil de expressão gênica do material obtido pelas duas técnicas de purificação celular, identificando uma assinatura genética do estroma do tecido linfóide caracterizada pela presença de genes associados aos macrófagos ou à síntese de matriz extracelular, além de genes que influenciam na migração e na sobrevivência dos linfócitos B. Nesse contexto, é relevante salientar que tanto Klein et al. (2003), quanto Shen et al. (2004b) observaram que a transição de linfócitos B virgens para centroblastos cursa com significativas alterações nos genes relacionados à apoptose, com acentuada diminuição da expressão do *BCL2* e indução de vários genes pró-apoptóticos.

Conforme delineado acima, até o momento, a grande maioria das amostras de linfoma de células do manto utilizadas nos estudos de *microarrays* proveio de biópsias de gânglio. Ocorre que o tecido ganglionar é composto por uma mistura de células neoplásicas e de células normais. As células normais, por sua vez, pertencem a diferentes populações celulares que podem estar em vários estágios de diferenciação ou de ativação, com funções distintas, respondendo à doença de modo peculiar e com intensidade variável. O resultado disso é uma amostragem altamente heterogênea, principalmente em termos de expressão gênica. Dessa forma, o perfil de expressão gênica obtido por estudos de *microarrays* com RNA de amostras com essas características constitui uma espécie de “fotografia” dos genes expressos por uma miríade de tipos celulares num dado momento. Tal heterogeneidade dificulta a habilidade de extrair conclusões sobre processos moleculares ocorrendo especificamente nas células tumorais (KING; SINHA, 2001).

Embora cada um dos estudos citados tenha revelado vários genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto em relação ao tecido linfóide normal — cujo material biológico do tecido de referência variou bastante entre os experimentos, e nenhum dos estudos comparativos adotou uma estratégia rigorosa de purificação dos linfócitos B virgens —, até o momento não se sabe quantos desses genes são específicos das células linfomatosas, e qual proporção é dependente das células normais que perfazem o estroma do tumor. Do mesmo modo, não se sabe se a maioria dos genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto é dependente das células linfomatosas *per se*, ou do micro-ambiente do tumor, composto por células do sistema imune que infiltram a neoplasia. Conforme demonstrado em outras neplasias (KING; SINHA, 2001; ZHANG et al., 1997), no linfoma folicular (DAVE et al., 2004), e no próprio linfoma de células do manto (EK et al., 2002), essa distinção é importante e pode revelar genes com papel de destaque como marcadores diagnósticos ou prognósticos. Talvez ainda mais relevante, essa estratégia tem potencial para revelar genes que possam representar novos alvos terapêuticos no linfoma de células do manto, tendo em vista que o prognóstico desse subtipo de linfoma é bastante reservado com os atuais esquemas de tratamento.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- a) Comparar o perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto com o perfil de expressão gênica dos linfócitos B virgens utilizando material genético proveniente de células isoladas com elevado grau de pureza para a hibridização em *microarrays* de oligonucleotídeos;
- b) Dentre os genes diferencialmente expressos nas células do linfoma de células do manto, selecionar 10 genes para validação dos resultados — pela quantificação da expressão desses genes por RT-PCR em tempo real — em amostras não manipuladas de sangue periférico de pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica, também com o objetivo de estender a investigação para um número maior de casos;
- c) Quantificar a expressão dos 10 genes selecionados em pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas de imunofenótipo B e comparar os resultados com aqueles obtidos nos pacientes com linfoma de células do manto;
- d) Investigar a correlação dos resultados das quantificações por RT-PCR em tempo real dos 10 genes selecionados com o prognóstico clínico dos pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica; e
- e) Analisar os resultados dos experimentos dos *microarrays* utilizando um método assistido por computador para a prospecção de dados, visando a identificar vias de sinalização moleculares específicas com padrão aberrante de expressão gênica no linfoma de células do manto.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes e controles

Vinte e um pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica foram incluídos neste estudo. Os pacientes foram diagnosticados no Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Em todos os casos, o diagnóstico foi baseado em dados clínicos, na análise citológica do esfregaço de sangue periférico e na imunofenotipagem das células linfomatosas por citometria de fluxo. A confirmação diagnóstica do linfoma de células do manto por método genético foi feita pela detecção da hiperexpressão do gene da ciclina D1 por RT-PCR em tempo real em amostras de sangue periférico. Não foram incluídos pacientes que tivessem recebido qualquer tipo de tratamento, e todas as amostras foram coletadas ao diagnóstico.

Três grupos de comparação foram utilizados neste estudo. O primeiro foi composto por quatro indivíduos sem doenças neoplásicas que foram submetidos à amigdalectomia. O segundo, por 14 pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas: sete com leucemia linfocítica crônica, três com linfoma folicular e quatro com linfoma esplênico da zona marginal; todos diagnosticados no Laboratório de Hematologia do HC-FMRP-USP. Nesse grupo, as amostras de sangue periférico também foram coletadas ao diagnóstico, somente de pacientes com doença *de novo* e sem tratamento prévio. O terceiro grupo de comparação foi composto por três indivíduos saudáveis, cujo sangue periférico foi coletado e dividido em alíquotas, que foram processadas para obtenção de material genético tanto do sangue periférico total, quanto das frações de células mononucleares e de linfócitos B purificados.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (Anexo A).

3.2 Caracterização dos pacientes e controles

3.2.1 *Pacientes com linfoma de células do manto*

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica que participaram deste estudo são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

O diagnóstico de linfoma de células do manto em fase leucêmica foi realizado mediante análise dos dados clínicos e laboratoriais, revisão das alterações citológicas no sangue periférico e dos resultados da imunofenotipagem das células linfomatosas. Além disso, em todos os pacientes foi detectada evidência da translocação $t(11;14)(q13;q32)$ pela demonstração da hiperexpressão do gene da ciclina D1 por RT-PCR em tempo real.

Na caracterização dos pacientes, foram utilizados dois sistemas de classificação, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O primeiro deles, proposto por Ott et al. (1997) e aperfeiçoado por Orchard et al. (2003) especificamente para a classificação morfológica do linfoma de células do manto em fase leucêmica, interessa à categorização dos casos de acordo com as anormalidades citológicas em esfregaços de sangue periférico. Segundo esse sistema, os casos podem ser classificados em: 1) “forma típica”, quando predominam linfócitos de tamanho médio, com cromatina pontilhada e núcleo indentado; 2) “forma blastóide”, quando mais de 20% das células circulantes são grandes e têm cromatina reticular com um a três nucléolos, ou assumem a aparência de linfoblastos; e 3) “forma de linfócitos pequenos”, quando os linfócitos

são predominantemente pequenos e têm a cromatina condensada, embora alguns possam ter as características da forma típica.

O segundo sistema de classificação utilizado na categorização dos pacientes foi o escore imunofenotípico proposto por Matutes et al. (1994) e aperfeiçoado por Moreau et al. (1997) para o diagnóstico diferencial das doenças linfoproliferativas crônicas. De acordo com esse escore, um ponto é marcado para cada um dos seguintes achados: positividade para o CD5; fraca intensidade de expressão da imunoglobulina de superfície; positividade para o CD23; fraca intensidade de expressão ou negatividade para o CD79b; e negatividade para o FMC7. O critério de positividade adotado neste estudo foi a expressão do antígeno em uma proporção maior ou igual a 30% dos linfócitos. Uma pontuação de 4 ou 5 nesse sistema de escore confirma o diagnóstico de leucemia linfocítica crônica, enquanto pontuações inferiores a 3 sugerem tratar-se de outras doenças linfoproliferativas crônicas de imunofenótipo B (MOREAU et al., 1997).

Tabela 1 - Características dos pacientes com linfoma de células do manto ao diagnóstico

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Hemoglobina (g/L)	Leucócitos ($\times 10^9/L$)	Linfócitos ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	Classificação morfológica ¹
1	M	81	10,8	26,4	19,4	196	Típica
2	M	46	10,8	22,2	17,5	283	Blastóide
3	M	79	13,4	56,3	47,4	99	Linfócitos pequenos
4	M	72	13,7	60,3	47,8	159	Típica
5	M	60	10,9	30,6	13,1	58	Típica
6	M	79	11,4	273,0	256,6	210	Típica
7	M	62	6,1	114,0	103,4	20	Típica
8	M	66	15,0	270,0	189,0	400	Típica
9	M	60	9,2	20,5	16,6	78	Linfócitos pequenos
10	F	81	10,0	155,6	119,8	137	Típica
11	M	34	13,6	142,9	121,3	264	Linfócitos pequenos
12	F	...	...	...	...	...	Blastóide
13	F	81	10,1	9,8	6,7	70	Típica
14	F	64	10,6	73,5	8,5	180	Blastóide
15	M	60	11,4	35,4	30,6	123	Linfócitos pequenos
16	M	71	9,0	40,3	29,1	112	Linfócitos pequenos
17	F	72	8,7	153,5	142,8	62	Blastóide
18	M	61	9,2	12,5	10,1	122	Típica
19	M	60	7,6	100,0	90,0	154	Blastóide
20	F	65	10,0	72,6	36,0	437	Típica
21	M	68	12,2	89,2	73,1	220	Típica

Nota: Sinais convencionais utilizados:

... dado numérico não disponível.

- (1) Classificação morfológica proposta por Ott et al. (1997) e Orchard et al. (2003) para o linfoma de células do manto em fase leucêmica.

Tabela 2 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo dos linfócitos dos pacientes com linfoma de células do manto ao diagnóstico

Paciente	CD19/ CD20	CD19/CD20		FMC7	CD79b		CD23	Cadeias leves			Escore ¹
	(%)	CD5 (%)	e CD5 (%)		(%)	Exp.		κ (%)	λ (%)	Exp.	
1	90,1	93,8	89,8	43,5	86,5	Int.	2,1	3,2	90,7	Forte	1
2	84,7	52,3	41,2	43,1	73,7	Int.	8,8	86,6	18,3	Int.	1
3	96,8	39,7	37,9	63,4	92,1	Int.	20,3	95,5	5,9	Int.	1
4	91,1	97,2	90,9	12,9	86,9	Int.	20,7	91,0	2,7	Int.	2
5	83,2	92,7	82,3	34,8	39,6	Fraca	10,4	2,8	93,6	Forte	2
6	93,1	99,1	92,9	48,3	78,4	Int.	41,2	5,1	97,0	Forte	2
7	94,2	98,0	94,0	42,3	93,6	Int.	3,7	89,6	1,7	Int.	1
8	95,4	96,9	95,4	20,1	97,1	Forte	0,5	2,2	95,4	Forte	2
9	90,7	96,0	89,3	81,7	90,9	Int.	17,9	4,8	88,1	Forte	1
10	91,3	6,3	0,9	37,3	92,6	Int.	4,6	93,1	1,4	Forte	0
11	94,2	12,2	7,4	65,0	63,9	Int.	50,2	2,5	94,5	Int.	1
12	77,8	84,8	76,4	5,2	81,2	Int.	29,8	1,8	81,8	Forte	2
13	62,7	91,4	60,9	13,0	55,1	Int.	3,0	64,0	2,4	Int.	2
14	86,0	34,1	22,3	68,3	86,4	Int.	22,2	86,5	4,9	Forte	1
15	89,0	90,8	88,0	55,0	77,5	Int.	51,6	91,6	4,9	Int.	2
16	89,8	97,6	89,6	2,6	88,4	Int.	2,2	1,0	90,9	Forte	2
17	81,6	92,1	76,3	89,7	5,7	..	6,7	0,1	95,2	Int.	2
18	86,1	95,5	85,8	54,8	87,4	Int.	8,5	87,8	1,2	Int.	1
19	95,0	97,5	93,7	28,4	92,0	Forte	2,8	84,5	3,2	Forte	2
20	91,8	96,5	90,4	15,0	91,5	Int.	6,8	92,8	2,9	Forte	2
21	86,2	94,2	84,0	2,3	90,5	Int.	2,1	93,8	3,3	Int.	2

Nota: Sinais convencionais utilizados:

.. dado não se aplica.

(1) Sistema de escore segundo Matutes et al. (1994) e Moreau et al. (1997).

Exp. indica expressão, significando a intensidade de expressão do antígeno na membrana da célula conforme observada à citometria de fluxo.

Int. indica intermediária, significando intensidade de expressão intermediária do antígeno à citometria de fluxo.

Os regimes de tratamento adotados e a evolução clínica dos pacientes estão demonstrados na Tabela 3. A curva de sobrevida global dos 19 pacientes com dados disponíveis de acompanhamento clínico está representada na Figura 1. A sobrevida global foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito ou da última consulta, e a curva de sobrevida atuarial foi estimada usando o método de Kaplan e Meier.

Tabela 3 - Regimes de tratamento e desfecho clínico dos pacientes com linfoma de células do manto

Paciente	Tratamento ¹	Sobrevida (dias)	Óbito
1	COP (8); clorambucil e prednisona	627	Sim
2	HiperCVAD (4), rituximab e transplante autólogo	666	Não
3	Observação clínica	253	Sim
4	Fludarabina e ciclofosfamida (5)	440	Sim
5	HiperCVAD (4), rituximab e transplante autólogo	337	Não
6	CHOP (6)	174	Não
7	CHOP (3)	99	Sim
8	COP (2)	91	Sim
9	CHOP (6), fludarabina e mitoxantrone (6), radioterapia do baço	1046	Não
10	Clorambucil	90	Sim
11	Fludarabina e ciclofosfamida (5)	919	Não
12	...	...	...
13	Clorambucil	213	Sim
14	COP (1)	8	Sim
15	Fludarabina e mitoxantrone (6)	423	Não
16	Clorambucil e prednisona	166	Sim
17	COP (2)	...	...
18	CHOP-Bleomicina (2)	79	Sim
19	CHOP (7)	163	Sim
20	CHOP (5)	103	Sim
21	CHOP (8); clorambucil e prednisona (5)	339	Sim

Nota: Sinais convencionais utilizados:

... dado não disponível.

- (1) Os números colocados entre parênteses indicam a quantidade de ciclos dos respectivos regimes de quimioterapia. COP indica as drogas ciclofosfamida, vincristina e prednisona; CHOP, as drogas ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona; Hiper-CVAD, as drogas ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato e citarabina.

Figura 1. Curva de sobrevida dos pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica. A curva de sobrevida foi obtida com dados disponíveis de 19 pacientes, usando o método de Kaplan e Meier. A mediana de sobrevida calculada por esse método foi de oito meses.

3.2.2 Indivíduos controle e pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas

As amostras de linfócitos B virgens provieram de amígdalas retiradas de quatro indivíduos submetidos à amidalectomia devido a amigdalites de repetição (um indivíduo), ou devido a apnéia obstrutiva do sono (três indivíduos). Os quatro indivíduos estudados eram do sexo masculino, com idade de dois, cinco, cinco e seis anos.

Os dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas que participaram deste estudo são apresentados nas Tabelas 4 e 5. Todos os pacientes tinham células linfomatosas em circulação ao diagnóstico, detectadas pela análise citológica dos esfregaços de sangue periférico e por imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Tabela 4 - Características dos pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas

Paciente	Diagnóstico ¹	Sexo	Idade (anos)	Hemoglobina (g/L)	Leucócitos ($\times 10^9/L$)	Linfócitos ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)
22	LLC	F	67	14,0	37,8	29,1	171
23	LLC	F	82	17,4	56,6	41,7	353
24	LLC	M	52	15,9	67,5	56,0	147
25	LLC	M	72	15,2	27,4	18,9	270
26	LLC	M	61	13,5	35,0	22,4	257
27	LLC	M	61	11,8	20,5	16,7	153
28	LLC	M	57	14,6	33,8	28,3	108
29	Linfoma folicular	F	63	11,4	25,4	19,8	141
30	Linfoma folicular	M	47	13,9	7,0	2,4	161
31	Linfoma folicular	M	72	9,0	228,0	221,2	70
32	LEZM	M	55	13,9	31,0	21,3	314
33	LEZM	M	61	11,6	9,6	3,6	96
34	LEZM	M	74	11,8	37,2	29,2	232
35	LEZM	M	49	13,1	72,0	58,3	166

(1) LLC indica leucemia linfocítica crônica e LEZM, linfoma esplênico da zona marginal.

Tabela 5 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo dos linfócitos dos pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas

Paciente	CD19/ CD20 (%)	CD5 (%)	CD19/CD20 e CD5 (%)	FMC7 (%)	CD79b		CD23 (%)	Cadeias leves			Escore ¹
					(%)	Exp.		κ (%)	λ (%)	Exp.	
22	90,9	96,7	90,5	22,8	0,7	..	89,2	11,9	2,5	..	5
23	92,9	91,9	87,4	69,2	9,2	..	65,5	9,6	18,2	..	4
24	90,5	94,2	90,2	34,3	2,0	..	86,3	0,7	58,4	Fraca	4
25	83,3	94,6	82,8	3,3	1,9	..	80,8	65,8	2,8	Fraca	5
26	82,8	93,5	82,5	0,9	2,6	..	83,2	71,2	2,7	Fraca	5
27	80,5	89,7	77,6	1,3	7,4	..	78,1	11,3	71,0	Int. ³	4
28	89,2	96,9	88,8	15,5	7,1	..	90,0	0,6	93,1	Int.	4
29	94,1	6,5	3,6	49,4	88,6	Int.	49,4	92,5	4,4	Forte	1
30	25,9	25,9	3,5	13,7	61,4	Int.	24,1	63,9	2,3	Forte	1
31	60,2	4,4	0,4	52,6	83,9	Int.	1,9	4,4	92,8	Forte	0
32	90,1	18,5	12,2	72,7	90,7	Int.	5,4	89,6	2,0	Int.	0
33	38,3	18,7	73,7	69,5	30,7	Fraca	1,4	73,7	32,2	Forte	2
34	83,9	14,4	1,7	60,3	84,2	Int.	27,3	75,8	87,9	Int.	0
35	73,5	77,5	67,9	22,6	66,0	Int.	11,2	69,8	2,1	Forte	2

Nota: Sinais convencionais utilizados:

.. dado não se aplica.

(1) Sistema de escore segundo Matutes et al. (1994) e Moreau et al. (1997).

Exp. indica expressão, significando a intensidade de expressão do antígeno na membrana da célula conforme observada à citometria de fluxo.

Int. indica intermediária, significando intensidade de expressão intermediária do antígeno à citometria de fluxo.

3.3 Linhagem celular e cultura de células

A linhagem celular Granta-519 foi utilizada neste estudo. Essa linhagem foi estabelecida do sangue periférico de um paciente com linfoma de células do manto em fase leucêmica, caracterizando-se por apresentar a translocação t(11;14)(q13;q32) e por hiperexpressar o gene da ciclina D1 (JADAYEL et al., 1997).

As células da linhagem Granta-519 foram cultivadas em meio de cultura com 90% de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*; Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina, penicilina e estreptomicina.

As células foram mantidas em frascos de cultura em incubadora umidificada, a 37°C, com 5% de gás carbônico.

3.4 Purificação de células por separação magnética

3.4.1 Purificação dos linfócitos B virgens

Os linfócitos B virgens foram purificados de amígdalas de pacientes submetidos à amigdalectomia na Disciplina de Otorrinolaringologia do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia da Cabeça e Pescoço da FMRP-USP. Após o esclarecimento do paciente, ou de seu responsável legal, e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, uma das amígdalas era coletada para o estudo e a outra encaminhada para exame anatomopatológico, conforme a rotina da Disciplina de Otorrinolaringologia. Como critério de inclusão, os pacientes deviam estar sem uso de medicações, inclusive corticóides tópicos, por no mínimo 6 meses antes do procedimento cirúrgico.

Imediatamente após a exérese, as amígdalas foram colocadas em meio RPMI 1640 (Gibco, BRL) e mantidas no gelo. As células mononucleares foram desprendidas da arquitetura fibrosa do tecido mediante repetidas injeções de meio RPMI sob pressão, obtendo-se uma suspensão celular que foi centrifugada em gradiente de densidade Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para isolamento das células mononucleares.

Os linfócitos B virgens foram purificados de acordo com a caracterização imunofenotípica atualmente aceita para essa subpopulação de linfócitos B (KLEIN et al., 2003; PASCUAL et al., 1994), utilizando-se os protocolos gentilmente cedidos pelo Dr. Ulf Klein, da

Universidade de Columbia, Nova York, EUA, pelo método de separação celular magnética (*magnetic cell sorting*, MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemanha). Em conformidade com esses protocolos, inicialmente foi realizada a depleção das células com os antígenos de membrana CD10, CD27 e CD14. Na suspensão celular obtida, procedeu-se então à seleção positiva das células com IgD na membrana, que correspondem aos linfócitos B virgens.

Resumidamente, as células mononucleares das amígdalas foram marcadas com anticorpos monoclonais subtipo IgG₁ de camundongo com especificidade anti-CD27 e anti-CD10 [Becton Dickinson (BD), San Jose, CA, EUA]. Depois de lavadas, as células foram marcadas com dois outros anticorpos conjugados a *microbeads* metálicas, um deles com especificidade anti-CD14 e o outro, proveniente de ratos, com especificidade anti-IgG₁ de camundongo. A suspensão foi passada em colunas magnéticas do tipo LD (Miltenyi Biotec), para a depleção das células marcadas. Após essa etapa, a suspensão resultante foi incubada com anticorpos monoclonais anti-IgD conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA); e, em etapa subsequente, as células foram marcadas com anticorpos conjugados com *microbeads* de especificidade anti-FITC (Miltenyi Biotec). A suspensão marcada foi então passada em colunas magnéticas do tipo LS (Miltenyi Biotec), para a seleção positiva da células com IgD na membrana.

Em todas as etapas, as células foram mantidas no gelo ou incubadas com soluções geladas com o objetivo de minimizar possíveis alterações no perfil de expressão gênica secundárias a alterações de temperatura.

3.4.2 Purificação das células linfomatosas do sangue periférico

Após o esclarecimento do paciente e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, cerca de 20 mL de sangue periférico foram coletados de seis pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica. A fração de células mononucleares foi isolada por centrifugação em gradiente de densidade Histopaque-1077, e a purificação das células linfomatosas foi realizada usando o CD19 MultSort Kit (Miltenyi Biotec), em colunas magnéticas do tipo LS, de acordo com as orientações do fabricante.

Também nesse caso, as amostras foram mantidas no gelo ou incubadas em soluções geladas em todas as etapas.

3.5 Citometria de fluxo

Os estudos de imunofenotipagem foram realizados por citometria de fluxo de duas cores, num citômetro de fluxo FACScan (BD), equipado com laser de argônio de 488 nm. O software Cell Quest (BD) foi utilizado para aquisição e análise dos eventos.

3.5.1 Imunofenotipagem das doenças linfoproliferativas crônicas ao diagnóstico

Todos os 21 casos de linfoma de células do manto, os sete casos de leucemia linfocítica crônica, os três casos de linfoma folicular e os quatro casos de linfoma esplênico da zona marginal investigados neste estudo foram analisados por citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais diretamente conjugados com fluorocromos, contendo as seguintes combinações antigênicas em cada tubo: CD19 ou CD20-FITC e CD5-ficoeritrina (PE,

phycoerythrin); FMC7-FITC e CD79b-PE; CD2-FITC e CD23-PE; capa-FITC e lambda-PE; além de imunoglobulinas subtipo IgG₁ de camundongo, de especificidade irrelevante, conjugadas com FITC e PE, e usadas para a quantificação da marcação inespecífica. Todos os anticorpos monoclonais foram fabricados pela BD ou pela BD Pharmingen.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade e colocadas em tubos contendo 1×10^6 células, suspensas em 100 μ L de salina tamponada. As células foram incubadas com 5 μ L de cada um dos anticorpos monoclonais e mantidas no escuro, a 4°C, por 20 minutos. Após a incubação, foram suspensas em salina tamponada, soro bovino fetal a 2% e azida sódica a 0,1%. Após centrifugação, as células foram novamente suspensas em salina tamponada e formol a 1%, e levadas para análise. Nos casos em que houve contaminação residual com hemácias, as células foram suspensas em solução de lise FACS Lysing Solution (BD), em diluição 1:10, durante 10 minutos, na etapa após a marcação com os anticorpos monoclonais.

Para a análise por citometria de fluxo, a janela de leitura (*gate*) foi selecionada nos eventos com a relação “tamanho das células” versus “complexidade interna” ($FSC \times SSC$) compatível com linfócitos. Todos os tubos foram analisados coletando-se dados de 10.000 eventos (linfócitos).

3.5.2 Grau de pureza das amostras isoladas por separação celular magnética

As sucessivas etapas de isolamento dos linfócitos B virgens descritas na seção 4.4.2 foram conferidas por citometria de fluxo utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais: IgD-FITC, CD38-PE, CD27-PE, CD10-PE, CD3-FITC, além de anticorpos do subtipo IgG₁ conjugados com FITC e PE, de especificidade irrelevante. A Figura 2 mostra a expressão dos antígenos

IgD×CD38 e IgD×CD27, conforme observadas à citometria de fluxo, nas células mononucleares de amígdalas em diferentes etapas da separação dos linfócitos B virgens.

Figura 2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das sucessivas etapas de purificação dos linfócitos B virgens por separação celular magnética. Amostras de células de cada etapa da separação celular magnética foram analisadas por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais IgD-FITC, CD38-PE e CD27-PE. Os gráficos representativos dos experimentos de purificação das células de uma das amígdalas utilizadas neste estudo estão demonstrados aqui. (A) *Dot plot* das células mononucleares obtidas por centrifugação em gradiente de densidade. (B) *Dot plot* da suspensão celular resultante da depleção das células com os antígenos de membrana CD27, CD10 e CD14. (C) *Dot plot* dos linfócitos B virgens obtidos por seleção positiva pelo antígeno de membrana IgD.

O grau de pureza das células do linfoma de células do manto purificadas por seleção positiva em colunas magnéticas foi confirmado pela marcação com anticorpos monoclonais CD19-FITC e CD5-PE.

3.6 Extração do RNA

O RNA total foi extraído de sangue periférico recém-coletado na maioria das amostras utilizadas neste estudo, conforme pode ser observado na Tabela 6. Em nove amostras, no entanto, o RNA foi extraído de células mononucleares criopreservadas a -80°C, em RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal e 10% de dimetilsulfóxido.

O RNA foi extraído de sangue total, de células mononucleares do sangue periférico isoladas por centrifugação em gradiente de densidade, e, no caso dos pacientes com linfoma de células do manto e dos linfócitos B virgens, também de células purificadas por separação celular magnética (Tabela 6).

Além disso, o RNA total foi extraído de amostras de sangue periférico de três voluntários saudáveis; tanto do sangue total, quanto da fração mononuclear e de linfócitos B purificados pelo mesmo método usado para a purificação das células linfomatosas (CD19 MultSort Kit; Miltenyi Biotec).

Para a extração do RNA da linhagem celular Granta-519, as células foram coletadas por centrifugação a 4°C e lavadas duas vezes em salina tamponada.

Em todos os casos, o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em conformidade com as orientações do fabricante.

3.7 Experimentos com *microarrays* de oligonucleotídeos

Para a realização dos experimentos de análise da expressão gênica, foram utilizados *microarrays* comerciais Amersham CodeLink UniSet Human I (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), contendo 10.000 genes. Esses experimentos foram realizados no laboratório da Amersham Biosciences, em Chandler, AZ, EUA.

Tabela 6 - Material biológico utilizado para o isolamento de RNA

Amostra	Diagnóstico ¹	Células frescas	Células congeladas	Sangue total	Células mononucleares	Células purificadas
1	LCM	X		X		X
2	LCM	X		X		X
3	LCM	X		X		X
4	LCM	X		X		X
5	LCM	X		X		X
6	LCM	X		X		X
7	LCM	X			X	
8	LCM	X			X	
9	LCM	X			X	
10	LCM	X			X	
11	LCM	X			X	
12	LCM		X		X	
13	LCM		X		X	
14	LCM	X			X	
15	LCM	X		X		
16	LCM		X		X	
17	LCM		X		X	
18	LCM		X		X	
19	LCM		X		X	
20	LCM		X		X	
21	LCM		X		X	
22	LLC	X			X	
23	LLC	X			X	
24	LLC	X			X	
25	LLC	X			X	
26	LLC	X			X	
27	LLC	X			X	
28	LLC	X		X		
29	Linfoma folicular	X			X	
30	Linfoma folicular	X		X		
31	Linfoma folicular	X		X		
32	LEZM	X			X	
33	LEZM	X		X		
34	LEZM		X		X	
35	LEZM	X		X		
36	Linfócitos B virgens	X				X
37	Linfócitos B virgens	X				X
38	Linfócitos B virgens	X				X
39	Linfócitos B virgens	X				X
40	Indivíduo saudável 1	X		X		
41	Indivíduo saudável 2	X		X		
42	Indivíduo saudável 3	X		X		
43	Indivíduo saudável 1	X			X	
44	Indivíduo saudável 2	X			X	
45	Indivíduo saudável 3	X			X	
46	Indivíduo saudável 1	X				X
47	Indivíduo saudável 2	X				X
48	Indivíduo saudável 3	X				X

(1) LCM indica linfoma de células do manto; LLC, leucemia linfocítica crônica; LEZM, linfoma esplênico da zona marginal.

Após tratamento com DNase e purificação com o kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA), a qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A concentração do RNA foi quantificada por espectrofotometria, e 2 µg foram utilizados para gerar RNA complementar (cRNA) biotilado, com o CodeLink Expression Assay Reagent Kit (Amersham Biosciences), de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, o RNA total, juntamente com pequenas quantidades de RNA bacteriano usados como controle, foram submetidos à transcrição reversa com *primers* T7 oligo(dT), seguida pela síntese da segunda fita de DNA complementar (cDNA), e purificação do cDNA dupla-fita em colunas QIAquick (Qiagen). A partir do cDNA dupla-fita, foi gerado cRNA marcado com biotina, por meio de uma reação de transcrição *in vitro* utilizando RNA polimerase T7 e biotina-11-UTP (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA). O cRNA marcado com biotina foi purificado com o kit RNeasy e quantificado por espectrofotometria. Dez microgramas de cRNA foram fragmentados por aquecimento a 94°C, durante 20 minutos, numa solução tampão contendo magnésio. O cRNA fragmentado foi então injetado nas microcâmaras das lâminas de *microarrays* para hibridização durante 18 horas, a 37°C, num *shaker* a 300 rpm. Após a hibridização, os *microarrays* foram incubados com um conjugado cianina-5-estreptavidina (Cy5-Streptavidin conjugate; Amersham Biosciences), e, após as lavagens para conferir especificidade ao sinal e secagem rápida em centrífuga, a intensidade de fluorescência da cianina-5 nas lâminas de *microarrays* foi detectada num scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). As imagens obtidas foram analisadas e quantificadas com o software CodeLink Expression Analysis (Amersham Biosciences). Os valores de expressão foram normalizados pela mediana dos valores de todos os genes da plataforma, e os resultados foram exportados para planilhas do software Microsoft Excel.

3.8 RT-PCR em tempo real

Para a realização dos estudos de PCR quantitativo em tempo real, foi realizada a transcrição reversa com 2 µg de RNA total, usando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram seguidas as orientações do fabricante, apenas com a adição de um inibidor da RNase (rRNasin; Promega, Madison, WI, EUA), conforme sugerido por Levy (2003).

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas pelo método TaqMan, num aparelho ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos intercalados com anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. As reações foram preparadas em duplicata, num volume final de 20 µL, usando uma quantidade de cDNA correspondente a 20 ng de RNA (LEVY, 2003). Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas duplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos.

Para a quantificação do gene da ciclina D1, foi desenhada uma sonda MGB marcada com 6-FAM, juntamente com *primers* sequência-específicos: sonda, 5'-TCGCAGACCTCCAGCA-3'; *primers*: 5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3'; 5'-CCTCCTCCTCGCACTTCTGTT-3' (Assay-by-Design; Applied Biosystems).

A análise quantitativa por RT-PCR em tempo real dos outros genes investigados neste estudo foi realizada utilizando sondas e *primers* comercialmente disponíveis (Assay-by-Design; Applied Biosystems). A quantificação foi feita comparando-se os valores de expressão obtidos com curvas-padrão desenhadas pela diluição seriada do cDNA da linhagem celular Granta-519. O fator de normalização foi a média geométrica do gene *PGK1* (*phosphoglycerate kinase*) e do gene *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) de cada amostra (TaqMan PDARs; Applied

Biosystems). Esses dois genes foram previamente selecionados em estudo independente como os melhores controles endógenos para normalização dos dados de RT-PCR em tempo real dentre 11 genes testados em diferentes subtipos de linfomas não-Hodgkin (LOSSOS et al., 2003). Os valores de expressão gênica obtidos nos experimentos foram novamente normalizados pelo resultado da quantificação na linhagem Granta-519, que serviu como calibrador de todas as amostras.

3.9 Análise dos dados

A análise dos dados dos *microarrays* de oligonucleotídeos foi realizada com o programa VectorXpression (Informax, Bethesda, MD, EUA).

As análises estatísticas deste estudo foram realizadas com software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e os testes estatísticos utilizados estão indicados na seção “Resultados”.

O software PathwayAssist (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para a mineração de dados, com o objetivo de identificar as principais vias de sinalização com padrão de expressão aberrante no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens.

4 RESULTADOS

4.1 Genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto

Os experimentos com *microarrays* foram realizados com amostras obtidas de três pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica (identificados como 1, 2 e 3 na Tabela 1) e de três indivíduos controle. Em ambos os grupos, o RNA foi extraído de amostras com mais de 95% de pureza. Os experimentos foram realizados em duplicatas, obtendo-se seis hibridizações com células linfomatosas e seis hibridizações com linfócitos B virgens.

A reprodutibilidade dos dados dos experimentos com *microarrays* pode ser verificada pela realização de experimentos simultâneos com o material genético de um mesmo indivíduo, num procedimento conhecido como “duplicatas técnicas”. Isso permite o cálculo de coeficientes de variação para os valores de expressão gênica obtidos de cada indivíduo, conforme pode ser observado na Figura 3. No presente estudo, obtivemos coeficientes de variação médios de apenas 8,27% e 8,51%, com desvios padrão de 0,80% e 0,52%, nas duplicatas dos grupos de linfoma de células do manto e de linfócitos B virgens, respectivamente.

Além disso, o uso de duplicatas técnicas possibilita o cálculo da menor razão de expressão passível de detecção, que deve ser distinguida do “ruído” da plataforma. O nível de ruído da plataforma é obtido pela divisão do valor de expressão dos genes de uma hibridização, pelo valor de expressão dos genes de sua duplicata técnica. Todas as duplicatas técnicas deste estudo, tanto do linfoma de células do manto quanto dos linfócitos B virgens, resultaram em razões de expressão de até 1,3 vezes em 95% dos genes da plataforma. Dessa forma, como 95% dos genes tiveram uma variação de expressão até 1,3 vezes, esse valor foi considerado o nível de ruído da

plataforma. Portanto, diferenças de expressão acima desse valor entre diferentes indivíduos têm elevada probabilidade de representar variabilidade biológica real.

Figura 3. Análise da reprodutibilidade dos experimentos de *microarrays*. (A) Representação gráfica dos coeficientes de variação dos dados de *microarrays* obtidos pela realização de experimentos em duplicatas técnicas com RNA obtido de células linfomatosas purificadas de um paciente com linfoma de células do manto. (B) *Scatter plot* dos valores de expressão obtidos nas replicatas técnicas. O coeficiente de correlação de Pearson para todos os pontos é demonstrado na figura.

Como foram utilizadas 12 lâminas de *microarrays* no presente estudo, foram obtidos 12 valores de expressão para cada um dos genes da plataforma. Optou-se por excluir da análise todos os genes em que um ou mais dos 12 resultados de expressão estivessem faltando. Após essa filtragem inicial, foram calculadas as médias dos valores das duplicatas técnicas. As médias obtidas em cada caso de linfoma de células do manto foram então comparadas às médias de cada um dos três indivíduos normais, realizando-se, para cada gene, nove comparações ao todo. Os genes com resultado maior do que 3,00 ou menor do que 0,33 em todas as nove comparações possíveis foram selecionados como diferencialmente expressos. Dessa forma, identificamos 106 genes modulados no linfoma de células do manto; 63 induzidos (Tabela 7) e 43 reprimidos (Tabela 8).

A variação de expressão de cada gene corresponde à média dos resultados das seis hibridizações do linfoma de células do manto, dividida pela média das seis hibridizações dos linfócitos B virgens. Com o objetivo de uniformizar os resultados, os valores correspondentes às variações dos genes reprimidos foram transformados no seu inverso e multiplicados por -1,

utilizando-se a seguinte fórmula: $y = (1/x) \times (-1)$; na qual “x” é um número entre 0 e 1 correspondente à variação dos genes reprimidos.

A classificação pelo Gene Ontology dos 63 genes induzidos no linfoma de células do manto deu origem a 185 registros de categorias de genes (um gene pode pertencer a várias categorias). Desses 185 registros, as categorias denominadas metabolismo de ácidos nucleicos (9%), transdução de sinais (8%), ligação ao DNA (7%), proliferação celular (5%) e atividade de receptores transmembrana (4%) foram as mais frequentes, excetuando-se os genes não classificados (17%). Por outro lado, os 43 genes reprimidos originaram 133 registros, cujas categorias mais frequentes foram: transdução de sinais (16%), resposta a estímulos bióticos (11%), metabolismo de ácidos nucleicos (8%) e resposta a patógenos (7%), exceto pelos genes não classificados (23%).

Tabela 7 - Genes induzidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens (continua)

Acesso ¹	Gene	Descrição	Lócus	Variação
NM_022802	<i>CTBP2</i>	<i>C-terminal binding protein 2</i>	10q26.13	190,9
NM_018584	<i>PRO1489</i>	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>	1p36.13	119,4
NM_024829	<i>FLJ22662</i>	<i>Hypothetical protein FLJ22662</i>	12p13.31	71,9
NM_007283	<i>MGLL</i>	<i>Monoglyceride lipase</i>	3q21.3	71,9
AL137513	<i>LOC150568</i>	<i>Hypothetical protein LOC150568</i>	2q12.2	62,3
NM_030594	<i>CPEB1</i>	<i>Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1</i>	15q25.1	40,8
NM_003202	<i>TCF7</i>	<i>Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)</i>	5q31.1	37,3
NM_025176	<i>KLA00980</i>	<i>KLA00980 protein</i>	20p11.22-p11.1	34,6
NM_013427	<i>ARHGAP6</i>	<i>Rho GTPase activating protein 6</i>	Xp22.3	34,4
AJ272267	<i>CHDH</i>	<i>Choline dehydrogenase</i>	3p21.1	32,9
NM_000632	<i>ITGAM</i>	<i>Integrin, alpha M (CD11b)</i>	16p11.2	25,1
M80899	<i>AHNAK</i>	<i>AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)</i>	11q12-q13	23,6
NM_006209	<i>ENPP2</i>	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)</i>	8q24.1	22,8
NM_003890	<i>FCGBP</i>	<i>Fc fragment of IgG binding protein</i>	19q13.1	22,7
NM_001346	<i>DGKG</i>	<i>Diacylglycerol kinase, gamma 90kDa</i>	3q27-q28	18,8
NM_000305	<i>PON2</i>	<i>Paraoxonase 2</i>	7q21.3	17,6
NM_016629	<i>LOC51323</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>	6p21.1-12.2	16,6
NM_001888	<i>CRYM</i>	<i>Crystallin, mu</i>	16p13.11-p12.3	16,5
NM_001106	<i>ACVR2B</i>	<i>Activin A receptor, type IIB</i>	3p22	16,3
NM_017784	<i>OSBPL10</i>	<i>Oxysterol binding protein-like 10</i>	3p22.3	15,2
NM_003114	<i>SPAG1</i>	<i>Sperm associated antigen 1</i>	8q22	14,8
NM_031366	<i>COL4A3</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)</i>	2q36-q37	13,9
AF155117	<i>KIF21A</i>	<i>Kinesin family member 21A</i>	12q12	12,4
BC005097	<i>CYFIP1</i>	<i>Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1</i>	15q11	11,9
NM_001202	<i>BMP4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	14q22-q23	11,8
D79994	<i>ANKRD15</i>	<i>Ankyrin repeat domain 15</i>	9p24.2	11,7
NM_014811	<i>KLA00649</i>	<i>KLA00649 gene product</i>	9q34.3	11,3
NM_014246	<i>CELSR1</i>	<i>Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)</i>	22q13.3	11,0

Tabela 7 - Genes induzidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens

				(conclusão)
BF033013	...	601455990F1 <i>Homo sapiens</i> cDNA, 5' end	...	10,6
NM_002926	<i>RGS12</i>	<i>Regulator of G-protein signalling 12</i>	4p16.3	10,2
NM_005077	<i>TLE1</i>	<i>Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)</i>	9q21.32	9,9
NM_005086	<i>SSPN</i>	<i>Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)</i>	12p11.2	9,9
NM_001242	<i>TNFRSF7</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7</i>	12p13	9,8
NM_016229	<i>LOC51700</i>	<i>Cytochrome b5 reductase b5R.2</i>	11p15.3	9,5
NM_017773	<i>FLJ20340</i>	<i>Hypothetical protein FLJ20340</i>	1q32.1	9,5
AF216077	<i>COL27A1</i>	<i>Collagen, type XXVII, alpha 1</i>	9q33.1	8,4
NM_004838	<i>HOMER-3</i>	<i>Homer homolog 3 (Drosophila)</i>	19p13.11	8,3
N28741	...	yx67e09.r1 <i>Homo sapiens</i> cDNA, 5' end	...	8,2
D13264	<i>MSR1</i>	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>	8p22	8,1
NM_003713	<i>PPAP2B</i>	<i>Phosphatidic acid phosphatase type 2B</i>	1pter-p22.1	7,6
NM_015642	<i>ZNF288</i>	<i>Zinc finger protein 288</i>	3q13.2	6,8
AB028641	<i>SOX11</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 11</i>	2p25	6,8
D86961	<i>LHFPL2</i>	<i>Lipoma HMGIC fusion partner-like 2</i>	5q13.3	6,7
NM_019114	<i>EHM2</i>	<i>Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B</i>	9q22.1-q22.3	6,4
NM_007250	<i>KLF8</i>	<i>Kruppel-like factor 8</i>	Xp11.21	6,2
NM_004289	<i>NFE2L3</i>	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3</i>	7p15-p14	6,2
NM_017793	<i>RPP25</i>	<i>RNase P protein subunit p25</i>	15q22.33	6,0
NM_004987	<i>LIMS1</i>	<i>LIM and senescent cell antigen-like domains 1</i>	2q12.2	5,8
NM_016073	<i>CGI-142</i>	<i>Hepatoma-derived growth factor, related protein 3</i>	15q11.2	5,8
NM_020322	<i>ACCN3</i>	<i>Amiloride-sensitive cation channel 3</i>	7q35	5,7
AL161952	<i>GLUL</i>	<i>Glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)</i>	1q31	5,7
AI654054	<i>CDC14B</i>	<i>CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)</i>	9q22.32	5,5
NM_021874	<i>CDC25B</i>	<i>Cell division cycle 25B</i>	20p13	5,3
NM_004833	<i>AIM2</i>	<i>Absent in melanoma 2</i>	1q22	5,3
NM_003199	<i>TCF4</i>	<i>Transcription factor 4 (TCF4), mRNA.</i>	18q21.1	5,2
AB020689	<i>KIAA0882</i>	<i>KIAA0882 protein</i>	4q31.1	5,0
NM_033308	<i>ABCA7</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7</i>	19p13.3	5,0
NM_001456	<i>FLNA</i>	<i>Filamin A, alpha (actin binding protein 280)</i>	Xq28	4,8
NM_000417	<i>IL2RA</i>	<i>Interleukin 2 receptor, alpha</i>	10p15-p14	4,7
AB002301	<i>KIAA0303</i>	<i>KIAA0303 protein</i>	5q12.3	4,6
NM_000889	<i>ITGB7</i>	<i>Integrin, beta 7</i>	12q13.13	4,5
NM_001924	<i>GADD45A</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	1p31.2-p31.1	4,2
NM_000382	<i>ALDH3A2</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2</i>	17p11.2	4,1

Nota: Sinais convencionais utilizados:

... dado não disponível.

(1) Indica o número de acesso no Entrez Nucleotide.

Tabela 8 - Genes reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens

Acesso ¹	Gene	Descrição	Lócus	Varição ²
AW369811	...	<i>IL0-BT0168-091199-139-e05 Homo sapiens cDNA</i>	...	-42,9
NM_006746	<i>SCML1</i>	<i>Sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)</i>	Xp22.2-p22.1	-35,2
NM_002526	<i>NT5</i>	<i>5'-nucleotidase, ecto (CD73)</i>	6q14-q21	-31,6
NM_003037	<i>SLAM</i>	<i>Signaling lymphocytic activation molecule family member 1</i>	1q22-q23	-29,5
NM_003107	<i>SOX4</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 4</i>	6p22.3	-22,3
NM_000869	<i>HTR3A</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A</i>	11q23.1-q23.2	-19,2
NM_002928	<i>RGS16</i>	<i>Regulator of G-protein signalling 16</i>	1q25-q31	-15,3
NM_007210	<i>GALNT6</i>	<i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6)</i>	12q13	-14,9
NM_004794	<i>RAB33A</i>	<i>RAB33A, member RAS oncogene family</i>	Xq26.1	-14,6
NM_017702	<i>FLJ20186</i>	<i>Hypothetical protein FLJ20186</i>	16q24.3	-13,2
NM_021798	<i>IL21R</i>	<i>Interleukin 21 receptor</i>	16p11	-12,3
AI375884	...	<i>tc14a01.x1 Homo sapiens cDNA, 3' end</i>	...	-12,1
AK023042	<i>LASS6</i>	<i>LAG1 longevity assurance homolog 6 (S. cerevisiae)</i>	2q31.1	-11,3
NM_032466	<i>ASPH</i>	<i>Aspartate beta-hydroxylase</i>	8q12.1	-10,9
D42043	<i>RAFTLIN</i>	<i>Raft-linking protein</i>	3p25.1	-10,7
NM_004669	<i>CLIC3</i>	<i>Chloride intracellular channel 3</i>	9q34.3	-10,3
NM_001877	<i>CR2</i>	<i>Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2</i>	1q32	-9,5
NM_003567	<i>BCAR3</i>	<i>Breast cancer anti-estrogen resistance 3</i>	1p22.1	-9,5
NM_003596	<i>TPST1</i>	<i>Tyrosylprotein sulfotransferase 1</i>	7q36.3	-9,4
AL163207	<i>NRIP1</i>	<i>Nuclear receptor interacting protein 1</i>	21q11.2	-8,2
NM_003151	<i>STAT4</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>	2q32.2-q32.3	-8,1
NM_025106	<i>SSB1</i>	<i>SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1</i>	1p36.22	-8,0
NM_004233	<i>CD83</i>	<i>CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)</i>	6p23	-7,7
AB011182	<i>SPG20</i>	<i>Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome)</i>	13q13.1	-7,6
NM_001901	<i>CTGF</i>	<i>Connective tissue growth factor</i>	6q23.1	-7,4
AB020677	<i>KLAA0870</i>	<i>KLAA0870 protein</i>	8q24.3	-7,3
NM_001874	<i>CPM</i>	<i>Carboxypeptidase M</i>	12q15	-7,2
NM_018478	<i>C20orf35</i>	<i>Chromosome 20 open reading frame 35</i>	20q13.11	-6,9
NM_000270	<i>NP</i>	<i>Nucleoside phosphorylase</i>	14q13.1	-6,8
AB037722	<i>NEDL2</i>	<i>NEDD4-related E3 ubiquitin ligase NEDL2</i>	2q33.1	-6,6
NM_016246	<i>LOC51171</i>	<i>Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 10</i>	19q13.33	-6,6
NM_000156	<i>AMT</i>	<i>Guanidinoacetate N-methyltransferase</i>	19p13.3	-6,6
AK026960	<i>SPRY1</i>	<i>Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)</i>	4q28.1	-6,5
NM_012189	<i>FSP-2</i>	<i>Calcium-binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (fibrous sheathin 2)</i>	18q11.2	-6,1
NM_000478	<i>ALPL</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/ bone/ kidney</i>	1p36.1-p34	-6,1
NM_013390	<i>TMEM2</i>	<i>Transmembrane protein 2</i>	9q13-q21	-6,0
AW963062	...	<i>EST375135 Homo sapiens cDNA</i>	...	-5,4
AB014553	<i>ICOSL</i>	<i>Inducible T-cell co-stimulator ligand</i>	21q22.3	-5,0
NM_002506	<i>NGFB</i>	<i>Nerve growth factor, beta polypeptide</i>	1p13.1	-4,6
BC013184	<i>HLA-DPB1</i>	<i>Similar to major histocompatibility complex, class II, DP beta 1, clone MGC:17212</i>	6p21.3	-4,4
NM_002984	<i>CCL4</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>	17q12	-4,1
NM_000901	<i>NR3C2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2</i>	4q31.1	-4,0
NM_022304	<i>HRH2</i>	<i>Histamine receptor H2</i>	5q35.3	-3,7

Nota: Sinais convencionais utilizados:

... dado não disponível.

(1) Indica o número de acesso no Entrez Nucleotide.

(2) O sinal negativo indica os genes reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens.

4.2 Validação dos resultados dos *microarrays*

Com o objetivo de validar os resultados de expressão gênica obtidos pelos *microarrays* usando um método alternativo de quantificação da expressão gênica e estender a análise para um número maior de pacientes, arbitrariamente selecionamos 10 genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto e quantificamos sua expressão por RT-PCR em tempo real. Essa quantificação foi realizada tanto em amostras de sangue periférico não purificado dos 21 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica, quanto em amostras de células linfomatosas purificadas provenientes de seis desses 21 pacientes (identificados como 1P a 6P na Tabela 9). A expressão dos 10 genes selecionados também foi quantificada em amostras de sangue periférico de 14 pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas, e em linfócitos B virgens purificados de amígdalas de quatro indivíduos normais.

A Figura 3 sumariza os dados obtidos por RT-PCR em tempo real para o gene da ciclina D1 e para os 10 genes selecionados para validação. A Figura 4 mostra a comparação das razões de expressão obtidas pelos experimentos de *microarrays* com aquelas obtidas por RT-PCR em tempo real. Apenas um dos 10 genes selecionados (*Toll-like receptor 1*, *TLR1*, locus 4p14, acesso NM_003263) possuía diferencial de expressão menor do que três vezes, conforme avaliado pelos *microarrays* (2,4 vezes; $p < 0,001$). Mesmo para esse gene, no entanto, houve boa correlação entre os resultados obtidos pelos *microarrays* e por RT-PCR em tempo real. Todos os resultados obtidos nos experimentos de RT-PCR em tempo real estão arrolados nas Tabelas 9 a 11.

Os dois métodos detectaram um padrão similar de expressão para os seis genes induzidos e para três dos quatro genes reprimidos que foram validados. Apenas a expressão do gene *CCL4* em amostras não purificadas de sangue periférico não corroborou os resultados obtidos pelos *microarrays*. Para investigar essa discrepância, as quantificações do gene *CCL4* obtidas por RT-PCR em tempo real nas amostras de células linfomatosas purificadas dos pacientes 1P a 6P foram

comparadas com aquelas obtidas nas amostras sangue periférico total desses mesmos pacientes. A média de expressão do gene *CCL4* nas amostras de sangue total foi 4,2 vezes maior que nas células linfomatosas purificadas, confirmando que a expressão aumentada desse gene no sangue periférico não é dependente das células do linfoma de células do manto, mas pode ser explicada por sua indução nos linfócitos T ativados e monócitos do sangue periférico (LIPES et al., 1988).

Figura 4. Resultados de RT-PCR em tempo real de 11 genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Os experimentos foram realizados em linfócitos B virgens (n=4), células purificadas do linfoma de células do manto (LCM CD19, n=6) e amostras não purificadas de sangue periférico de pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica (LCM SP, n=21). A expressão dos genes foi quantificada por RT-PCR em tempo real, como a expressão relativa do gene de interesse normalizada pela média geométrica dos genes *GAPDH* e *PGK1*. Os valores de expressão obtidos foram comparados com curvas-padrão obtidas por diluições seriadas de cDNA da linhagem celular Granta-519, que foi também usada como calibrador para fazer uma segunda normalização de todas as amostras. As colunas representam a média dos valores de expressão de cada grupo e as barras indicam o erro padrão da média.

Figura 5. Correlação entre os resultados de quantificação da expressão gênica obtidos por RT-PCR em tempo real e por *microarrays* de oligonucleotídeos para 10 genes selecionados para validação. As variações de expressão foram determinadas por RT-PCR em tempo real em amostras de sangue periférico de pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica (LCM SP; n=21) e em amostras de células linfomatosas purificadas (LCM CD19; n=6), ambas normalizadas pela média de expressão nos linfócitos B virgens (n=4). Nos resultados dos *microarrays*, as variações de expressão foram obtidas em hibridizações em duplicata realizadas com células linfomatosas purificadas e com linfócitos B virgens de três indivíduos em cada grupo. A expressão do gene *CCL4* nas amostras de sangue periférico foi o único resultado divergente na comparação entre os dois métodos. No entanto, essa aparente discrepância somente ocorreu porque a expressão do gene *CCL4* é induzida nos linfócitos T ativados e nos monócitos do sangue periférico.

Com o objetivo de verificar se havia diferença de expressão nas amostras de células linfomatosas purificadas em relação às amostras de sangue total, realizamos o teste de Wilcoxon para amostras pareadas nos casos em que estavam disponíveis os resultados tanto do sangue total quanto das células purificadas (amostras 1 a 6, e 1P a 6P). Apenas os genes ciclina D1 ($p=0,03$), *ITGB7* ($p=0,03$) e *CCL4* ($p=0,03$) apresentaram diferença significativa, predominando um valor de expressão maior nas amostras purificadas para os genes ciclina D1 e *ITGB7*, e menor no caso do gene *CCL4*, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Os valores de expressão obtidos para os 11 genes quantificados por RT-PCR em tempo real nas amostras não purificadas de sangue periférico dos pacientes com linfoma de células do

manto foram também comparados com os valores obtidos nas amostras de sangue periférico dos pacientes com leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular e linfoma esplênico da zona marginal, cujas quantificações podem ser observadas na Tabela 10. Para isso, os pacientes foram divididos em dois grupos, o primeiro incluindo os pacientes com linfoma de células do manto e o segundo, todos os pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas. Na comparação entre os grupos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, identificando-se diferença significativa apenas para os genes *TLR1* ($p=0,01$) e *GALNT6* ($p=0,03$), além da já esperada diferença no gene ciclina D1 ($p<0,0001$), que foi utilizado na confirmação diagnóstica dos casos de linfoma de células do manto. Em todos os três genes, os valores de expressão observados foram maiores no linfoma de células do manto do que nas doenças linfoproliferativas crônicas.

Ainda que os resultados de vários dos genes estudados mantenham certa homogeneidade nos diferentes subgrupos de doenças linfoproliferativas crônicas, e ainda que pareça haver algumas diferenças significativas na comparação entre os subgrupos no caso de alguns dos genes quantificados, conforme pode ser observado na Tabela 10, o pequeno número de pacientes estudados não permite que sejam aplicados testes estatísticos ou que se chegue a conclusões mais ambiciosas tendo por base apenas esses resultados. O objetivo da quantificação desses genes, no entanto, foi apenas fazer um *screening* da expressão dos genes selecionados para validação nas doenças linfoproliferativas crônicas que participam do diagnóstico diferencial do linfoma de células do manto.

Também com o objetivo de estabelecer um referencial para a expressão de todos os genes quantificados, selecionamos três indivíduos saudáveis e quantificamos a expressão dos 10 genes selecionados tanto no sangue periférico total, quanto na fração de células mononucleares e em linfócitos B purificados por separação celular magnética. Os resultados desses experimentos estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 9 - Resultados dos experimentos de RT-PCR em tempo real nos pacientes com linfoma de células do manto

Amostra ¹	Ciclina D1	TCF7	ARHGAP6	MGLL	COL4A3	CDC25B	ITGB7	CCL4	TLR1	IL21R	GALNT6
1	2,296	2,583	11,279	0,956	57,430	12,992	6,186	0,439	13,387	0,203	1,501
1P	3,129	1,340	9,753	0,327	62,190	18,338	8,335	0,038	2,136	0,116	0,170
2	1,050	7,399	9,454	0,341	55,586	10,256	6,451	0,491	10,974	0,239	0,963
2P	3,511	7,294	16,034	0,190	91,429	11,790	25,002	0,018	7,425	0,613	0,783
3	4,048	8,912	131,589	1,489	224,008	15,607	19,882	0,723	15,306	0,378	1,959
3P	6,767	12,543	165,801	0,580	170,031	17,863	47,071	0,112	11,468	0,318	0,356
4	1,781	5,053	3,169	0,379	59,371	19,404	10,563	0,399	3,374	0,272	1,204
4P	3,293	0,564	0,579	0,067	309,181	16,979	25,023	0,004	3,822	0,245	1,346
5	2,651	4,592	9,803	1,152	13,352	4,073	4,889	1,416	7,980	0,517	1,070
5P	7,182	12,282	17,660	0,601	25,430	12,185	6,619	0,480	9,540	1,836	0,784
6	3,899	45,895	13,402	0,114	161,589	13,408	10,260	0,916	10,399	0,609	0,920
6P	4,357	35,371	18,740	0,158	143,775	12,452	10,858	0,387	9,130	0,822	1,806
7	2,306	1,428	4,102	0,664	127,865	14,289	5,548	0,399	16,632	0,326	1,365
8	1,864	1,897	2,807	0,558	1,786	27,604	9,106	0,084	1,389	0,083	0,402
9	8,508	23,321	7,935	4,371	283,689	8,330	2,061	1,298	8,340	8,636	1,739
10	3,077	0,624	0,176	0,145	23,655	2,158	4,594	0,091	4,488	0,086	0,305
11	5,053	1,769	0,080	0,060	48,563	7,951	6,996	0,018	11,051	0,421	2,386
12	3,696	4,194	0,338	0,276	147,230	12,846	2,651	4,710	5,226	6,041	11,093
13	0,771	43,114	1,496	2,647	29,111	3,757	2,149	2,193	2,705	1,376	2,911
14	0,540	2,060	0,840	1,125	73,459	2,780	1,292	0,372	4,264	0,311	1,135
15	3,077	2,153	2,772	1,438	3,718	4,229	6,949	1,055	7,848	0,393	1,081
16	3,941	4,895	3,426	0,962	126,754	20,081	5,607	1,711	3,721	0,178	1,705
17	39,811	47,949	6,994	4,376	391,689	92,533	8,638	0,733	10,188	1,724	3,564
18	0,498	1,488	1,462	0,979	86,741	1,256	0,872	0,279	6,817	0,483	0,776
19	1,114	3,737	2,889	1,399	26,432	12,591	3,149	1,994	2,937	0,795	0,981
20	8,607	21,024	9,656	1,203	205,257	20,179	11,659	5,919	4,591	0,260	0,782
21	0,363	3,798	3,972	4,797	15,399	2,617	1,834	0,203	0,865	0,520	2,796

(1) As amostras identificadas com a letra P referem-se às amostras de células linfomatosas purificadas dos pacientes 1 a 6.

Tabela 10 - Resultados dos experimentos de RT-PCR em tempo real nos pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas

Amostra	Ciclina D1	TCF7	ARHGAP6	MGLL	COL4A3	CDC25B	ITGB7	CCL4	TLR1	IL21R	GALNT6
Leucemia linfocítica crônica											
22	0,017	12,676	10,305	0,151	79,269	18,294	5,673	0,462	2,225	0,861	0,819
23	0,008	11,354	18,479	1,450	0,353	13,069	8,762	0,365	5,232	1,150	1,213
24	0,016	2,702	23,505	0,761	0,099	15,791	7,184	0,202	7,179	0,577	0,978
25	0,005	22,559	35,701	1,353	15,802	21,614	6,741	0,803	5,220	0,869	1,481
26	0,009	16,975	28,889	0,630	59,896	10,688	20,886	0,752	0,489	0,233	1,165
27	0,003	7,324	16,836	1,171	67,807	12,509	12,631	0,452	3,173	0,501	1,387
28	0,012	8,110	6,782	0,868	111,803	27,719	5,873	0,333	6,532	0,796	0,649
Linfoma folicular											
29	0,001	1,474	1,802	0,304	13,494	0,593	3,722	0,180	1,975	0,092	0,502
30	0,002	6,111	2,345	0,368	2,761	1,841	2,556	3,728	1,757	0,365	1,669
31	0,010	0,113	0,341	0,168	3,736	0,379	3,193	0,198	1,136	0,082	0,537
Linfoma esplênico da zona marginal											
32	0,002	3,927	6,489	0,421	37,245	1,692	3,999	1,062	3,503	0,263	0,590
33	0,005	3,549	4,140	0,408	31,508	1,508	1,647	0,135	1,987	0,136	0,523
34	0,006	1,640	3,754	0,127	106,028	3,369	6,718	0,166	3,867	0,213	0,684
35	0,040	1,742	0,920	0,102	26,588	5,507	6,946	0,149	4,848	0,066	0,452

Tabela 11 - Resultados dos experimentos de RT-PCR em tempo real nos indivíduos controle

Amostra	Ciclina D1	TCF7	ARHGAP6	MGLL	COL4A3	CDC25B	ITGB7	CCL4	TLR1	IL21R	GALNT6
Linfócitos B virgens provenientes de amígdalas											
36	0,029	0,022	0,059	0,035	1,417	1,858	2,200	0,135	3,227	2,345	15,527
37	0,016	0,025	0,112	0,043	0,278	0,958	1,635	0,093	3,133	2,078	8,792
38	0,042	0,056	0,191	0,040	5,251	1,893	2,114	0,182	13,076	4,414	16,032
39	0,035	0,047	0,157	0,037	9,363	2,559	2,969	0,380	16,986	6,902	20,451
Sangue periférico de indivíduos saudáveis											
40	0,001	15,071	18,570	1,942	1,720	5,905	2,678	3,152	18,073	0,322	3,997
41	0,001	17,428	26,994	1,077	3,204	7,797	2,627	1,930	21,703	0,279	2,815
42	0,001	20,162	24,203	1,117	5,035	9,755	4,856	2,212	3,334	0,970	4,572
Fração mononuclear do sangue periférico de indivíduos saudáveis											
43	0,001	16,360	14,972	1,578	1,881	7,643	2,397	1,436	7,087	0,383	3,377
44	0,001	11,004	21,956	0,902	1,641	6,181	2,981	1,747	22,261	0,332	3,462
45	0,011	3,353	13,260	0,370	116,469	10,775	8,293	0,091	5,617	1,207	3,761
Linfócitos B purificados do sangue periférico de indivíduos saudáveis											
46	0,007	4,806	48,151	3,062	50,308	6,644	3,137	0,734	6,355	1,386	4,384
47	0,001	25,351	24,074	1,415	4,332	10,288	3,908	1,023	5,158	0,592	2,331
48	0,010	2,569	6,001	0,381	41,536	7,547	6,050	0,158	4,870	1,593	5,082

Por fim, de posse das informações de segmento clínico de 19 dos 21 pacientes com linfoma de células do manto, investigamos a relação da quantificação por RT-PCR em tempo real da expressão dos genes validados com o prognóstico dos pacientes. Para isso, os valores de expressão de cada um dos genes nos 19 pacientes foram ordenados em ordem crescente e a mediana dos valores foi encontrada. O caso correspondente ao valor da mediana foi excluído da análise e a sobrevida dos nove pacientes com valores de expressão acima da mediana foi comparada com aquela dos nove pacientes com valores de expressão abaixo da mediana. Dos 11 genes analisados, apenas o gene *TLR1* apresentou diferença significativa ($p < 0,004$) na comparação das curvas de sobrevida de Kaplan e Meier pelo teste *log-rank*, conforme pode ser observado na Figura 6. Não houve diferença significativa entre os dois grupos determinados pela expressão do *TLR1* com relação à idade dos pacientes ou ao número de linfócitos no sangue periférico ao diagnóstico — variáveis que demonstraram ter valor prognóstico em outros estudos. No presente estudo, no entanto, nenhuma dessas duas variáveis clínicas correlacionou-se com o prognóstico dos pacientes.

Figura 6. Comparação das curvas de sobrevida de Kaplan e Meier dos pacientes com expressão de *TLR1* abaixo e acima da mediana dos valores de expressão determinados pela quantificação por RT-PCR em tempo real. Os valores de expressão do gene *TLR1* dos 19 pacientes com dados disponíveis de seguimento clínico foram classificados em ordem crescente e os nove casos com valores de expressão abaixo da mediana foram comparados com os nove casos com valores acima da mediana. No primeiro grupo, a mediana de sobrevida foi menor que seis meses, enquanto no segundo, foi de 21 meses.

4.3 Vias de sinalização com expressão aberrante no linfoma de células do manto

Uma vez que todos os genes diferencialmente expressos identificados nos experimentos de *microarrays* tiveram seus resultados validados por RT-PCR em tempo real, optamos por realizar um outro tipo de análise dos resultados, com o objetivo de identificar grupos de genes funcionalmente relacionados por meio de vias de sinalização molecular cuja expressão estivesse anormal no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Para isso, utilizamos uma técnica de prospecção de dados auxiliada por computador, com o software PathwayAssist. Nessa análise, consideramos como diferencialmente expressos todos os genes com variação de expressão de 1,5 vezes ou mais, e com nível descritivo menor do que 0,01 no teste *t* não pareado, admitindo variâncias iguais nos dois grupos.

Os principais genes e vias de sinalização com expressão aberrante identificados por essa análise estão demonstrados na Tabela 12. Vários genes das duas principais vias moleculares relacionadas à apoptose estavam expressos de maneira aberrante no linfoma de células do manto, sobretudo os genes da superfamília TNF. Além disso, vários genes das vias de sinalização PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT*), WNT e TGF β (*Transforming growth factor β*), cujos resultados também estão demonstrados na Tabela 12, foram identificados como anormalmente expressos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Esses resultados serão discutidos de maneira mais detalhada na próxima seção.

Tabela 12 - Genes de vias de sinalização com expressão aberrante no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens¹

Acesso ²	Gene	Descrição	Lócus	Varição ³
Genes de vias de sinalização relacionadas à apoptose				
NM_000633	<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2, transcript variant alpha</i>	18q21.3	4,5
NM_001226	<i>CASP6</i>	<i>Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease</i>	4q25	2,3*
NM_003879	<i>CFLAR</i>	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	2q33-q34	1,6
NM_003809	<i>TNFSF12</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12</i>	17p13	-1,5*
NM_003808	<i>TNFSF13</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13</i>	17p13.1	-1,6
NM_033292	<i>CASP1</i>	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)</i>	11q23	-1,6*
NM_004347	<i>CASP5</i>	<i>Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease</i>	11q22.2-q22.3	-1,9*
NM_003810	<i>TNFSF10</i>	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>	3q26	-2,7*
NM_000595	<i>LT4</i>	<i>Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>	6p21.3	-2,9*
NM_001196	<i>BID</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	22q11.1	-3,8
NM_002546	<i>TNFRSF11B</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)</i>	8q24	-4,3*
Genes da via de sinalização PI3K/AKT1				
NM_006218	<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	3q26.3	3,1*
NM_002611	<i>PDK2</i>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2</i>	17q23.3	2,7*
NM_002613	<i>PDPK1</i>	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>	16p13.3	2,0
NM_005163	<i>AKT1</i>	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	14q32.32	1,7*
NM_003952	<i>RPS6KB2</i>	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 70kD, polypeptide 2</i>	11q12.2	1,7
NM_001455	<i>FOXO3A</i>	<i>Forkhead box O3A</i>	6q21	1,5*
AF086924	<i>PPP2R2C</i>	<i>Protein phosphatase 2A1 B gamma subunit IMYPNO1</i>	4p16	-1,6*
NM_002610	<i>PDK1</i>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein</i>	2q31.1	-2,3*
Genes da via de sinalização WNT				
NM_002335	<i>LRP5</i>	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>	11q13.4	6,7
NM_001894	<i>CSNK1E</i>	<i>Casein kinase 1, epsilon</i>	22q13.1	3,5*
NM_003507	<i>FZD7</i>	<i>Frizzled homolog 7 (Drosophila)</i>	2q33	3,0*
NM_004423	<i>DVL3</i>	<i>Dishevelled, dsb homolog 3 (Drosophila)</i>	3q27	2,4*
NM_004380	<i>CREBBP</i>	<i>CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)</i>	16p13.3	2,4*
AF009674	<i>AXIN1</i>	<i>Axin, partial cds</i>	16p13.3	2,2*
NM_000038	<i>APC</i>	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>	5q21-q22	1,8
NM_012242	<i>DKK1</i>	<i>Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)</i>	10q11.2	-3,1
Genes da via de sinalização do TGFβ				
NM_001106	<i>ACVR2B</i>	<i>Activin A receptor, type IIB</i>	3p22	16,3*
NM_001202	<i>BMP4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	14q22-q23	11,8*
NM_003244	<i>TGIF</i>	<i>TGFβ-induced factor (TALE family homeobox)</i>	18p11.3	4,0
NM_005901	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)</i>	18q21.1	3,4*
NM_001616	<i>ACVR2</i>	<i>Activin A receptor, type II</i>	2q22.2-q23.3	2,9
NM_001105	<i>ACVR1</i>	<i>Activin A receptor, type I</i>	2q23-q24	2,5*
NM_005585	<i>SMAD6</i>	<i>SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)</i>	15q21-q22	-1,7

- (1) Os genes foram selecionados por apresentarem uma variação de expressão de 1,5 vezes ou mais no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens, com $p < 0,01$.
- (2) Indica o número de acesso no Entrez Nucleotide.
- (3) O sinal negativo indica os genes reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens.
- (*) $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto em nível celular, mediante uma abordagem “tumor versus normal”, com material biológico coletado apenas de pacientes com doença em fase leucêmica para isolar as células linfomatosas com elevado grau de pureza. O material biológico de referência utilizado na comparação foram os linfócitos B virgens, os quais correspondem à etapa de diferenciação dos linfócitos B normais que dá origem ao linfoma de células do manto. Os linfócitos B virgens também foram isolados com elevado grau de pureza por um rigoroso protocolo de purificação, de acordo com o conhecimento atual do imunofenótipo dessa subpopulação de linfócitos B.

Os 21 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica investigados neste estudo tiveram o diagnóstico confirmado por método genético, conforme descreve a atual classificação da Organização Mundial da Saúde (SWERDLOW et al., 2001), e tinham um perfil clínico, epidemiológico e laboratorial bastante típico dos pacientes com essa neoplasia. A mediana de idade dos pacientes foi de 66 anos, com variação de 34 a 81 anos; e a relação homem:mulher foi de 2,5:1. A mediana das contagens de linfócitos em circulação no sangue periférico foi de $41,7 \times 10^9/L$, variando de $6,7$ a $256,6 \times 10^9/L$; e a análise citológica dos esfregaços de sangue periférico revelou que 11 casos (52%) representavam a forma típica da doença; 5 casos (24%), a forma blastóide; e os outros 5 casos (24%), a forma de linfócitos pequenos. Orchard et al. (2003) estudaram 80 pacientes com linfoma de células do manto com linfócitos caracterizados pela presença da translocação $t(11;14)(q13;q32)$ em circulação no sangue periférico. A média de idade dos pacientes daquele estudo foi de 63,9 anos, e a relação homem:mulher foi de 2,2:1. A mediana das contagens de linfócitos no sangue periférico foi de $13,0 \times 10^9/L$, com variação de $1,2$ a $426,0 \times 10^9/L$. A análise citológica dos linfócitos revelou que 56 casos (70%) representavam a forma

típica; 8 casos (10%), a forma blastóide; e os outros 16 casos (20%), a forma de linfócitos pequenos. Letestu et al. (2004) também investigaram 65 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica e observaram uma mediana de idade de 66 anos, com uma relação homem:mulher de 3:1. A mediana das contagens de linfócitos do sangue periférico naquele estudo foi de $19,25 \times 10^9/L$.

Do ponto de vista imunofenotípico, 12 dos 21 pacientes (57%) do presente estudo apresentaram um imunofenótipo compatível com 2 pontos segundo o sistema de escore proposto por Matutes et al. (1994) e aperfeiçoado por Moreau et al. (1997). Oito pacientes (38%) exibiram um imunofenótipo compatível com 1 ponto e apenas um paciente (5%) apresentou um escore nulo, sendo este o único paciente cujos linfócitos neoplásicos não apresentaram positividade para o antígeno CD5. O fenótipo típico dos pacientes que participaram deste estudo foi representado pela co-expressão dos antígenos CD19 (ou CD20) e CD5; co-expressão dos antígenos FMC7 e CD79b, este último com intensidade intermediária; negatividade para o CD23; e restrição da cadeia leve capa na membrana (57% dos casos), com intensidade variando de intermediária a elevada. Esses dados, de certa forma, contrastam com o estudo de Orchard et al. (2003), no qual 81% dos casos tiveram escore de 1 ponto e somente 19%, escore de 2 pontos. Essas divergências certamente não se devem a diferenças no método utilizado em cada um dos estudos, uma vez que foram adotados exatamente os mesmos critérios em ambas as investigações, inclusive o limiar de positividade, fixado em 30% ou mais das células linfóides. Além disso, em nossos pacientes foi observado o predomínio da cadeia leve capa, em contraste com os achados da literatura, que relatam o predomínio da restrição de cadeias leve do subtipo lambda no linfoma de células do manto (CAMPO; RAFFELD; JAFFE, 1999).

Os regimes de tratamento utilizados nos 19 pacientes com informações disponíveis de seguimento clínico foram extremamente heterogêneos, variando desde a simples observação clínica, ou o uso de monoterapia com clorambucil, até o emprego de regimes de quimioterapia em altas dosagens seguidos por transplante autólogo. A maioria dos pacientes, no entanto,

recebeu tratamento quimioterápico com esquema CHOP, ou com esquemas CHOP-símile. A mediana de sobrevida dos 19 pacientes foi de apenas 253 dias, ou seja, pouco mais de oito meses, variando de menos de um mês até 35 meses. Wong et al. (1999) descreveram oito pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica cuja sobrevida média foi de apenas 13 meses, variando de 1,5 a 37 meses. Molina et al. (2000) também relataram oito casos de linfoma de células do manto em fase leucêmica com esplenomegalia proeminente, cuja mediana de sobrevida foi de oito meses, variando de dois a 60 meses. Esses dados contrastam com observações mais recentes em pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica. Orchard et al. (2003) estudaram 80 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica, os quais foram divididos em dois grupos: um composto por 43 pacientes com gânglios maiores do que 2 cm de diâmetro, denominado grupo “nodal”; e o outro composto por 37 pacientes sem acometimento ganglionar, denominado grupo “não-nodal”. A mediana de sobrevida do grupo nodal foi de 30 meses, enquanto a do grupo não-nodal foi de 79 meses. Esses autores concluíram que o grupo não-nodal é extremamente heterogêneo, pois ainda que alguns pacientes tenham doença clinicamente agressiva, outros têm doença bastante indolente e, ou não necessitam de tratamento, ou este pode ser postergado por vários meses após o diagnóstico. Por outro lado, Letestu et al. (2004), utilizando abordagem semelhante, observaram uma mediana de sobrevida de 29 meses em 32 casos com doença nodal, e de 41 meses em 28 casos com doença não-nodal, uma diferença que não foi estatisticamente significativa. A evolução clínica dos pacientes do nosso estudo é muito mais parecida com os relatos de Wong et al. (1999) e Molina et al. (2000), do que com os estudos mais recentes. Essas discrepâncias em termos de prognóstico não podem ser explicadas por diferenças na idade dos pacientes, uma vez que a mediana de idade situou-se na sétima década de vida em todos os estudos citados. Tampouco pode ser explicada por diferenças nos esquemas de tratamento empregados, já que em todos os estudos os pacientes foram tratados de maneira heterogênea, com diferentes protocolos de quimioterapia, mas com predomínio absoluto da utilização de regimes CHOP-símile. Uma explicação plausível para a mediana de

sobrevida observada no presente estudo é o fato de que obtivemos uma casuística relativamente pequena, embora maior do que aquelas relatadas por Wong et al. (1999) e Molina et al. (2000), com as quais nossos dados mais se assemelharam. É bastante provável que, se ampliássemos o número de pacientes deste estudo, iríamos obter uma mediana de sobrevida maior, dado que cinco (26%) dos 19 pacientes tiveram um desfecho extremamente desfavorável, evoluindo para óbito em menos de 100 dias após o diagnóstico. Além disso, uma outra explicação para a curta sobrevida dos pacientes deste estudo, em especial daqueles que evoluíram rapidamente para o óbito, é o diagnóstico tardio — quando a massa tumoral já está bastante grande —, tão comumente observado na nossa população de pacientes do sistema público de saúde.

Os três pacientes cujo material biológico foi utilizado para os estudos de expressão gênica em larga escala tinham um perfil clínico, laboratorial e imunofenotípico bastante semelhante aos demais. Para a realização dos experimentos com os *microarrays*, optamos pela utilização de uma plataforma comercial que conta com um sofisticado sistema de controle de qualidade na fabricação, e com um ótimo perfil de sensibilidade e especificidade, conforme demonstrado em estudos independentes (RAMAKRISHNAN et al., 2002; SENDERA et al., 2002; TAN et al., 2003; YAUK et al., 2004). Os experimentos foram realizados pelo método de duplicatas técnicas com o objetivo de verificar a qualidade e a reprodutibilidade dos dados de expressão obtidos. Assim, como as hibridizações foram realizadas com material genético de um mesmo indivíduo em duas lâminas de *microarrays*, foram obtidos dois valores de expressão para cada gene, o que possibilitou o cálculo não só de seus respectivos coeficientes de variação, mas também da razão entre os valores de expressão nas duas hibridizações. Dessa forma, observamos que 95% dos genes da plataforma tinham uma razão entre os valores de expressão de até 1,3 em todas as duplicatas técnicas avaliadas, tanto do linfoma de células do manto, quanto dos linfócitos B virgens. Isso significa que variações de expressão abaixo desse valor não devem ser consideradas relevantes na comparação entre as amostras de tumor e as amostras normais. Variações de

expressão acima desse valor, por outro lado, têm grande probabilidade de ter real significado biológico.

Conforme exposto, poderíamos ter utilizado um valor mínimo de detecção pouco acima de 1,3. Mesmo assim, optamos por fixar uma variação de expressão maior do que três vezes em todas as nove comparações “tumor versus normal” possíveis como critério para considerar um dado gene como diferencialmente expresso. Com isso, visamos a obter dados mais confiáveis, pois seria muito mais provável a identificação apenas de genes realmente modulados nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Por meio dessa estratégia, revelamos 106 genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto, sendo que 63 deles estavam induzidos e 46 estavam reprimidos. A grande maioria dos genes identificados não havia sido descrita nos estudos anteriores de análise da expressão gênica em larga escala do linfoma de células do manto.

A validação dos resultados de experimentos de *microarrays* é um tema controverso. Enquanto alguns autores advogam que é indispensável a confirmação dos resultados por outro método de análise da expressão gênica, ou até mesmo preferem verificar a expressão das proteínas originadas pelos genes diferencialmente expressos, outros autores questionam a necessidade de experimentos confirmatórios (ROCKETT, 2003). Em recente revisão sobre a abordagem de neoplasias hematológicas por métodos genômicos, Ebert e Golub (2004) ressaltaram que a validação científica dos experimentos de *microarrays* somente ocorre quando resultados semelhantes são obtidos em experimentos realizados por investigadores de diferentes instituições, preferencialmente utilizando tipos alternativos de *microarrays*. Não obstante, a abordagem por nós adotada difere de estudos prévios no sentido em que privilegiamos o estudo da expressão gênica em nível celular, o que impossibilitou comparações diretas que pudessem substituir os métodos convencionais de validação. Para a confirmação dos resultados dos nossos experimentos com *microarrays*, optamos pela utilização de um outro método de quantificação da expressão gênica, o RT-PCR em tempo real, em conformidade com o que vem sendo sugerido

por vários grupos com experiência em métodos genômicos (CHUAQUI et al., 2002; LOCKHART; WINZELER, 2000; ROCKETT, 2003). Assim, arbitrariamente selecionamos 10 genes para validação, nove deles dentre os 106 genes com variação de expressão maior do que três vezes, e apenas um gene (*TLR1*) com diferencial de expressão abaixo desse valor nos experimentos de *microarrays*. Dos 10 genes selecionados, seis estavam induzidos no linfoma de células do manto e quatro estavam reprimidos. Para a realização dos experimentos de RT-PCR em tempo real foram utilizadas tanto amostras de células purificadas, quanto amostras de sangue periférico não purificado, visando a estender a análise para um número maior de pacientes e utilizar amostras o mais próximo possível da realidade dos laboratórios clínicos. Além disso, com o objetivo de investigar se os genes diferencialmente expressos no linfoma de células do manto também estão alterados nas doenças que fazem parte de seu diagnóstico diferencial, optamos por quantificar a expressão dos genes selecionados para validação não só em pacientes com linfoma de células do manto, mas também em pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas ao diagnóstico. Os resultados dos experimentos de *microarrays* foram confirmados em todos os genes selecionados para validação, exceto pelo gene *CCL4*, cujo resultado foi divergente apenas nas amostras não purificadas de sangue periférico, pelo fato de que esse gene é induzido em monócitos e linfócitos T ativados presentes em abundância no sangue periférico, conforme demonstrado previamente por Lipes et al. (1988).

Na comparação dos 11 genes quantificados por RT-PCR em tempo real entre as amostras de sangue total e as células linfomatosas purificadas, apenas os genes ciclina D1, *ITGB7* e *CCL4* apresentaram diferença estatisticamente significativa. Nessa comparação, observou-se que o gene *ITGB7*, induzido no linfoma de células do manto de acordo com os resultados dos *microarrays*, apresentou valores de expressão maiores na quantificação das amostras purificadas. Por outro lado, o gene *CCL4*, reprimido no linfoma de células do manto, apresentou valores de expressão ainda menores nas amostras purificadas. Essas observações dão suporte à hipótese de que as células tumorais são as verdadeiras responsáveis pelas diferenças na expressão gênica observadas.

Quando se fez o mesmo tipo de comparação entre os casos de linfoma de células do manto e de doenças linfoproliferativas crônicas, observou-se que apenas três dentre os 11 genes quantificados apresentaram diferença significativa: ciclina D1, *GALNT6* e *TLR1*. Nesse caso, é válido ressaltar que os dois últimos genes, ambos reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens, estão ainda mais suprimidos nas outras doenças linfoproliferativas crônicas.

O gene *GALNT6* foi recentemente caracterizado como um homólogo do gene *GALNT3*, cuja perda de expressão é uma característica de tumores pancreáticos agressivos (BENNETT et al., 1999). Essa família de genes é conhecida por realizar a glicosilação de proteínas, mas seu componente mais recentemente descrito, o gene *GALNT6*, ainda não é bem conhecido do ponto de vista funcional e não existem estudos prévios demonstrando sua participação na patogênese de linfomas, ou mesmo de outros tipos de câncer.

O gene *TLR1*, reprimido no linfoma de células do manto, foi o único dentre os genes validados com variação de expressão menor do que três vezes nos experimentos de *microarrays* — estava reprimido 2,4 vezes no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Curiosamente, esse gene foi também o único cuja quantificação da expressão no sangue periférico, conforme analisada por RT-PCR em tempo real, correlacionou-se com a sobrevida dos pacientes, indicando um possível valor prognóstico para esse gene no linfoma de células do manto. Os pacientes com valores de expressão do gene *TLR1* acima da mediana tiveram uma sobrevida significativamente maior do que aqueles com valores de expressão abaixo da mediana, sugerindo que a expressão desse gene pode ter um efeito protetor nos pacientes com linfoma de células do manto. A proteína codificada pelo gene *TLR1* pertence a uma família de proteínas conhecidas como *Toll-like receptors*, as quais têm papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata. Em linfócitos B, já foi demonstrado que alguns subtipos de TLRs têm a função de interligar a resposta imune inata com a resposta imune adaptativa (BOURKE et al., 2003). Pode-se especular que a expressão aumentada do gene *TLR1*

em alguns pacientes com linfoma de células do manto seja consequência de uma resposta imune mais eficaz nesse subgrupo, e isso poderia justificar a tendência de maior sobrevida desses pacientes. É relevante notar que não houve diferença significativa na idade, nem no número de linfócitos no sangue periférico entre os dois subgrupos de pacientes determinados pela expressão do gene *TLR1*. Todavia, dentre os 19 pacientes investigados, os dois que foram submetidos ao regime de tratamento mais agressivo — com consolidação com transplante autólogo — estavam no subgrupo com expressão do gene *TLR1* acima da mediana. Por isso, estudos com uma casuística maior são necessários para estabelecer o papel do gene *TLR1* na determinação do prognóstico dos pacientes com linfoma de células do manto. Vale salientar que a abordagem utilizada no presente estudo foi bastante semelhante àquela adotada por Lossos et al. (2004), que recentemente desenvolveram um modelo matemático, baseado na quantificação de apenas seis genes por RT-PCR em tempo real, para prever a sobrevida de pacientes com linfoma difuso de grandes células B.

Como todos os genes diferencialmente expressos identificados pelos experimentos de *microarrays* foram confirmados pela quantificação por RT-PCR em tempo real, optamos por analisar os resultados dos *microarray* por um outro método, com o objetivo de identificar grupos de genes com expressão aberrante no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens que estivessem funcionalmente relacionados por meio de vias de sinalização molecular. Para a realização dessa análise, utilizamos uma técnica de prospecção de dados auxiliada por computador, com o software PathwayAssist, considerando como diferencialmente expressos todos os genes com variação de expressão de 1,5 vezes ou mais, e com nível descritivo menor do que 0,01. Dessa forma, identificamos, como aberrantemente expressos, vários genes relacionados à apoptose (Figura 7) e às vias de sinalização PI3K/AKT, WNT e TGF β .

Figura 7. Vias de sinalização da apoptose. (A) A apoptose pode ser iniciada por duas vias de sinalização distintas: a via mitocondrial, ou intrínseca, e a via dos receptores de morte celular, também conhecida com via do TNF ou via extrínseca. As duas vias são interligadas pela proteína BID, que pode amplificar o sinal apoptótico. (B) O gene *CFLAR*, de atividade antiapoptótica, revelou-se induzido no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens, enquanto vários genes da via do TNF e o gene *BID*, pró-apoptóticos, revelaram-se reprimidos. Adaptado de Igney e Krammer (2002).

Um dos genes identificados por essa análise, o gene *BCL2*, codifica uma proteína que é potente inibidora da apoptose pela via mitocondrial. Todas as células nucleadas necessitam da proteção por pelo menos um dos homólogos *BCL2*, e os genes dessa família regulam a homeostase tissular. Recentemente, foi demonstrado que a expressão da proteína *BCL2* tem boa correlação com os níveis de mRNA em linfócitos B normais ou neoplásicos (SHEN et al., 2004a). A hiperexpressão do *BCL2* pelas células tumorais torna-as refratárias a diversos agentes quimioterápicos e à irradiação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e a resistência a drogas é frequentemente acompanhada pelo aumento da expressão do *BCL2*. Ademais, o potencial oncogênico da hiperexpressão do *BCL2* já foi demonstrado em vários modelos transgênicos em camundongos. Os transgênicos *BCL2* dão origem a neoplasias de linfócitos B e seu início de

maneira estocástica sugere a necessidade da aquisição de eventos genéticos adicionais. Em particular, a co-expressão do gene *MYC* tem efeito sinérgico na aceleração da linfomagenese (STRASSER et al., 1990). Essa interação, que já foi observada também *in vivo* em tumores de mama e de pâncreas, revela uma forte cooperação entre as alterações genéticas que ocasionam proliferação celular e aquelas relacionadas à inibição da apoptose. Provavelmente a interação desses dois genes reflete a capacidade do *BCL2* em inibir a apoptose ocasionada pelo *MYC* em condições sub-ótimas de crescimento celular, em associação à habilidade do *MYC* em sobrepujar o retardo na entrada do ciclo celular ocasionado pelo *BCL2* (CORY; ADAMS, 2002). Nesse contexto, é válido ressaltar que, no linfoma de células do manto, tanto alterações em mecanismos de proliferação celular (ROSENWALD et al., 2003) — inclusive com a identificação da hiperexpressão do gene *MYC* como um fator de mau prognóstico (NAGY et al., 2003) —, quanto a inibição da apoptose pela via do *BCL2* foram previamente demonstradas (HOFMANN et al., 2001), particularmente pelos experimentos com *microarrays*. Assim, o achado de uma expressão 4,5 vezes maior do gene *BCL2* nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens nos experimentos do presente estudo corrobora resultados anteriores e serve como validação externa de nossos resultados. Um outro gene pertencente à família do *BCL2*, o gene *BID* (*BH3 interacting domain death agonist*), demonstrou estar reprimido no linfoma de células do manto, com diminuição de expressão de 3,8 vezes em relação aos linfócitos B virgens. Esse gene tem uma participação importante na indução da apoptose porque seu papel é fazer a integração da via extrínseca (receptores de morte celular da superfamília TNF) com a via intrínseca (mitocondrial), podendo ser usado para a ampliação do sinal apoptótico. Além disso, enquanto em alguns tipos celulares apenas a ativação da via extrínseca é suficiente para desencadear a apoptose, em outros é indispensável a coativação da via intrínseca por meio da proteína BID (IGNEY; KRAMMER, 2002; LOWE; CEPERO; EVAN, 2004).

Nossos resultados também evidenciaram a expressão aberrante de vários genes da via extrínseca da apoptose. Os genes responsáveis por alguns dos ligantes que atuam na iniciação da

apoptose pela via do TNF estavam reprimidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. É o caso, por exemplo, dos genes *TNFSF12* (*TWEAK*), *TNFSF13* (*APRIL*), *TNFSF10* (*TRAIL*) e *LTA*. Do mesmo modo, um dos receptores dessa família, o *TNFRSF11B* (*OPG*), também estava reprimido. Por outro lado, o gene *CFLAR* (*FLIP*), um potente inibidor da apoptose pela via extrínseca (THOME; TSCHOPP, 2001), teve sua expressão induzida. Por fim, os genes que codificam a caspase 1 (*CASP1*) e a caspase 5 (*CASP5*), proteínas executoras da apoptose, estavam ambos reprimidos no linfoma de células do manto; enquanto o gene da caspase 6 (*CASP6*) estava induzido. Quase todas essas alterações apontam no sentido de um fenômeno de evasão da apoptose no linfoma de células do manto. Com efeito, alterações correlatas na via extrínseca da apoptose já haviam sido sugeridas por outros grupos que estudaram o perfil de expressão gênica do linfoma de células do manto utilizando *microarrays* (HOFMANN et al., 2001; MARTINEZ et al., 2003).

As alterações nos mecanismos relacionados à apoptose, tanto da via mitocondrial quanto da via do TNF, tornam-se ainda mais relevantes quando analisadas no contexto de estudos recentes sobre o perfil de expressão gênica das sucessivas etapas de diferenciação dos linfócitos B. Klein et al. (2003) e Shen et al. (2004b) observaram que a transição de linfócitos B virgens para centroblastos, do ponto de vista de mudanças na expressão de genes relacionados à apoptose, é caracterizada pela indução de genes pró-apoptóticos de ambas as vias (*BIK*, *FAS/CD95*), além de marcante repressão de genes antiapoptóticos, sobretudo do *BCL2*, nas células do centro germinativo. Assim, em ambos os estudos, os linfócitos B virgens foram caracterizados pela repressão de genes pró-apoptóticos e pela indução do *BCL2* em relação aos centroblastos. Como, no presente estudo, realizamos uma comparação “tumor versus normal” utilizando como referência os linfócitos B virgens — inclusive com o mesmo método descrito por Klein et al. (2003) para a purificação dessa subpopulação —, é lícito supor que as alterações observadas nos genes relacionados à apoptose sejam realmente consequência da transformação maligna, haja

vista que, nas células do linfoma de células do manto, acentua-se tanto a repressão de genes pró-apoptóticos da via do TNF quanto a indução do gene *BCL2* em relação aos linfócitos B virgens.

Figura 8. Via de sinalização PIK3/AKT. Após a ativação da célula pelos “sinais de sobrevivência”, o gene PIK3 (composto pelas subunidades p85 e p110) produz PIP₃ a partir de PIP₂, recrutando as proteínas AKT, PDK1 e PDK2 para a membrana celular. As quinases PDK1 e PDK2 irão fosforilar a proteína AKT, a qual, por sua vez, ativará os alvos celulares da via PI3K/AKT. As proteínas em negrito estão com seus respectivos genes ativados no linfoma de células do manto, enquanto a PDK1, em vermelho, está com seu gene reprimido. PIP₂: Fosfatidilinositol (4,5)P₂. PIP₃: Fosfatidilinositol (3,4,5)P₃. Adaptado de Vivanco e Sawyers (2002).

Uma vez caracterizada a tendência à evasão da apoptose no linfoma de células do manto, torna-se relevante identificar quais os possíveis mecanismos que ocasionam esse fenômeno nas células tumorais. Nesse contexto, a observação de que vários genes da via de sinalização PI3K/AKT também estavam aberrantemente expressos no linfoma de células do manto mereceu atenção mais cuidadosa (Figura 8). Dentre os vários mecanismos que regulam a apoptose, existe um, conhecido como “morte por abandono”, que é reflexo da necessidade das células por sinais de sobrevivência. A presença dos sinais de sobrevivência — que incluem fatores de crescimento, citocinas e hormônios, entre outros estímulos — mantém ativa a via PI3K/AKT, que irá inibir a

apoptose. Os sinais de sobrevivência ativam o gene *PI3K* (*Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*), que recruta as quinases AKT, PDK1 (*PtdInsP3-dependent kinase 1*) e PDK2 (*PtdInsP3-dependent kinase 2*) para a membrana celular. No complexo formado, a PDK1 e PDK2 ativam a proteína AKT por fosforilação. Uma vez ativada, a AKT irá fosforilar e inibir a proteína pró-apoptótica BAD, da via intrínseca da apoptose, além de inativar alguns genes pró-apoptóticos da via extrínseca, como o *FASL* (*Fas ligand*), por exemplo. Ademais, ocorre ativação das proteínas-quinase mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) e RS6K (*Ribosomal p70 protein S6 kinase*), que podem estimular a proliferação celular. A regulação da via PI3K/AKT é exercida pelo gene supressor de tumor *PTEN* [*Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)*] e por outras fosfatases lipídicas, dentre elas a PPP2A (*Protein phosphatase 2A*) (BJORNSTI; HOUGHTON, 2004; IGNEY; KRAMMER, 2002; LUO; MANNING; CANTLEY, 2003; VIVANCO; SAWYERS, 2002).

A maioria das neoplasias é independente dos sinais de sobrevivência que protegem as células normais da morte por abandono, e isso ocorre por alterações na via do PI3K/AKT. Vários oncogenes aumentam a atividade do PI3K e sua subunidade catalítica já foi demonstrada estar ativada, por exemplo, em tumores de ovário. A proteína PTEN, o antagonista celular do PI3K, está frequentemente deletada em tumores avançados, e mutações desse gene já foram observadas em vários tipos de câncer. Além disso, a proteína AKT, uma serina/treonina-quinase que é responsável por mediar a ação dos sinais de sobrevivência, está hiperexpressa em várias neoplasias. Todas essas alterações ocasionam a ativação constitutiva dos sinais de sobrevivência que conferem resistência à morte por abandono e aumentam a tendência das células tumorais à evasão da apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002). Nesse contexto, foi notório o fato de que a maioria das alterações observadas nos genes da via de sinalização PI3K/AKT nas células do linfoma de células do manto em nossos experimentos de *microarrays* apontava no sentido de uma ativação dessa via. Assim, é possível que um dos fatores subjacentes à inibição da apoptose no linfoma de células do manto seja a ativação constitutiva da via PI3K/AKT, a exemplo do que

ocorre em outros tumores. Com efeito, Kawamata et al. (2004), em estudo recente, demonstraram que o agente SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) bloqueia a via de sinalização AKT/mTOR e reduz os níveis de ciclina D1 em linhagens celulares de linfoma de células do manto. Além disso, Witzig et al. (2004), num estudo clínico controlado fase II, demonstraram substancial atividade anti-tumoral do fármaco CCI-779 — uma droga inibe a via de sinalização PI3K por meio da proteína mTOR — como monoterapia em pacientes com linfoma de células do manto recidivado.

Um dos alvos da via de sinalização PI3K/AKT é a enzima GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), cuja fosforilação causa sua inativação. A enzima GSK3 desempenha papéis em vários processos celulares importantes, como proliferação e diferenciação. Embora não estejam completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais a GSK3 participa na transformação maligna, provavelmente incluem a modulação da ciclina D1. A GSK3 fosforila a ciclina D1 num sítio que promove sua degradação pela via da ubiquitina-proteassoma, de forma que a via PI3K/AKT, por fosforilar e inativar a GSK3, estabiliza a ciclina D1. Um outro alvo da atividade de fosforilação da enzima GSK3 é a β -catenina. Em seu estado não fosforilado, a β -catenina liga-se aos fatores de transcrição LEF/TCF (*Lymphoid enhancer binding factor / T-cell factor*), ativando-os. Esses fatores de transcrição têm, dentre seus alvos, a ciclina D1, cuja transcrição é estimulada. Quando a enzima GSK3 não está inibida, ocorre a fosforilação da β -catenina, ocasionando sua degradação pela via da ubiquitina-proteassoma, o que reduz a transcrição dos genes-alvo mediada pelos fatores LEF/TCF (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). A expressão de β -catenina correlaciona-se com a de ciclina D1 em tumores de mama, sugerindo que esse é um importante mecanismo desregulado nessas neoplasias (LIN et al., 2000). Adicionalmente, as proteínas GSK3 e β -catenina existem em forma de complexos multiméricos com pelo menos duas outras proteínas, AXIN e APC (*Adenomatous polyposis coli*), que são essenciais para os mecanismos de fosforilação e degradação da β -catenina, além da proteína CSNK1 (*Casein kinase 1*), que também participa ativamente desse processo. Mutações que inativam as proteínas AXIN e APC estão

associadas à patogênese de neoplasias. Assim, a ativação da via PI3K/AKT, por inativar a enzima GSK3, promove a estabilização da β -catenina e, dessa forma, provoca sua migração para o núcleo das células, aumentando a transcrição dos genes-alvo do complexo TCF/LEF, incluindo a ciclina D1 (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Alguns dos genes acima citados, *AXIN*, *APC*, *CSNK1* e a própria β -catenina, fazem parte da via de sinalização do WNT, que adiante será descrita em detalhes (Figura 9).

Figura 9. Via de sinalização do WNT. (A) Na ausência de atividade da via WNT, a β -catenina é degradada e os genes-alvo permanecem reprimidos. (B) Quando a via de sinalização do WNT é ativada, ocorre o recrutamento do complexo AXIN-APC-GSK3 à membrana e a degradação da β -catenina pela via da ubiquitina-proteassoma é reduzida. Com a acumulação da β -catenina no citoplasma, essa proteína migra para o núcleo e ativa os fatores de transcrição do complexo TCF/LEF, dentre os quais o gene *TCF7*. Os genes em negrito estão induzidos no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens, enquanto o gene *DKK1* (um antagonista da via), em vermelho, está reprimido. Adaptado de Moon et al. (2004).

WNTs são glicoproteínas ricas em resíduos de cisteína que, quando secretadas, agem como ligantes de curta duração para ativar localmente seus receptores. Vários genes da via de

sinalização WNT demonstraram estar aberrantemente expressos nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. Nessa via, os ligantes interagem com membros da família de receptores FZD (*Fri ζ zled*) e com as proteínas transmembrana LRP 5 e 6 (*LDL-receptor-related proteins*), ativando a proteína DVL (*Dishevelled*), que recruta o complexo composto por AXIN-APC-GSK3 citado anteriormente. Esse complexo, após o recrutamento, fica ancorado aos receptores do WNT na membrana e a atividade de fosforilação realizada pelas enzimas GSK3 e CSNK1 é inibida, levando à acumulação de β -catenina, a qual irá para o núcleo ativar os fatores de transcrição TCF/LEF. Por outro lado, quando não ocorre a ativação dos receptores da via WNT, não se forma o complexo AXIN-APC-GSK3 e as enzimas GSK3 e CSNK1 ficam livres para fosforilar e eliminar a β -catenina pela via da ubiquitina-proteassoma (MOON et al., 2004). Os resultados dos nossos experimentos de *microarrays* demonstraram que existe um aumento significativo nos transcritos de vários componentes da via de sinalização WNT nas células do linfoma de células do manto em comparação aos linfócitos B virgens: *LRP5*, *CSNK1*, *FZD7*, *DVL3*, *CREBBP*, *AXIN* e *APC*; bem como a repressão de um dos antagonistas da via, o *DKK1*. Adicionalmente, a expressão do gene *TCF7* — um dos componentes do complexo TCF/LEF que atua na ativação da transcrição dos genes-alvo da via WNT — foi quantificada por RT-PCR em tempo real, tendo sido confirmado que esse gene está extremamente hiperexpresso no sangue periférico de pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica. Nesse contexto, é relevante mencionar que Lu et al. (2004), em estudo recente, foram pioneiros em relatar a ativação da via de sinalização WNT na leucemia linfocítica crônica, uma doença semelhante em muitos aspectos ao linfoma de células do manto. Esses autores concluíram que a via WNT pode contribuir de modo significativo no fenômeno de evasão da apoptose que ocorre na leucemia linfocítica crônica.

A análise auxiliada por computador dos nossos resultados de *microarrays* também identificou vários genes da superfamília TGF β que estavam expressos de forma aberrante nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. A superfamília TGF β

compreende tanto os genes da própria família TGF β , quanto as BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), as activinas, as nodals, entre outras. Os membros da superfamília TGF β ligam-se aos seus receptores específicos, mas com alguma sobreposição de utilização de receptores dentre os diversos ligantes, pois o número de receptores é menor do que o de ligantes. O complexo funcional dos receptores da superfamília TGF β na membrana celular consiste de dois receptores do “tipo II” e dois receptores do “tipo I”, os quais têm atividade serina/treonina-quinase (Figura 10). Na ausência dos ligantes, os receptores tipo I e tipo II existem como monodímeros na superfície celular. Quando os ligantes ativam os receptores do tipo II, ocorre a formação de um complexo tetramérico com os receptores do tipo I, que serão fosforilados e ativados. Os receptores do tipo I irão então fosforilar os segundo-mensageiros da via TGF β , as proteínas SMADs. A SMAD2 e a SMAD3 são fosforiladas e, no citoplasma, interagem com a SMAD4, formando um complexo que irá migrar para o núcleo das células para ativar a transcrição dos genes-alvo da via TGF β . A ativação da SMAD2 e SMAD3 pelos receptores tipo I pode ser inibida pelas proteínas reguladoras dessa via de sinalização, a SMAD6 e a SMAD7 (DERYINCK; ZHANG, 2003; MIYAZONO; SUZUKI; IMAMURA, 2003; SIEGEL; MASSAGUE, 2003; CHEN et al., 2002).

A expressão dos genes dos receptores da activina do tipo I, tipo II e tipo IIB estava aumentada de maneira significativa nas células do linfoma de células do manto em nossos experimentos. Também o gene *SMAD2*, que funciona como segundo-mensageiro dessa via, estava com sua expressão aumentada; enquanto o gene *SMAD6*, correspondente a uma SMAD inibitória, estava reprimido nas células linfomatosas. Além disso, também estavam aumentadas a expressão do gene *BMP4*, que se liga a seus receptores específicos da via do TGF β , e do gene *TGIF*, que atua como co-ativador ou co-repressor na transcrição dos genes-alvo da via do TGF β dependendo do contexto intra-celular, mas cujo aumento da expressão correlaciona-se com a ativação da via do TGF β principalmente pela via das activinas (CHEN et al., 2003). Em suma,

todas as alterações observadas na expressão dos genes da superfamília $TGF\beta$ apontam no sentido de uma ativação dessa via de sinalização no linfoma de células do manto.

Figura 10. Via de sinalização do $TGF\beta$. (A) Mecanismo geral de ativação dos receptores da superfamília $TGF\beta$. Na membrana celular, a interação ligante-receptor induz a fosforilação dos segundo-mensageiros dessa via, as SMADs 2 e 3, também conhecidas como R-SMADs. As R-SMADs irão interagir com a SMAD4 no citoplasma e migrar para o núcleo, onde regulam a transcrição dos genes-alvo da via pela interação com coativadores ou repressores. (B) Representação dos genes da superfamília $TGF\beta$ expressos de maneira aberrante no linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens. As elipses azuis representam os genes induzidos e a elipse vermelha, o único gene reprimido dessa via. Os valores no interior das elipses representam as variações de expressão dos respectivos genes. Adaptado de Derynck e Zhang (2003).

A via do $TGF\beta$ é conhecida por ter um duplo papel no câncer. Em tecidos normais, sua ativação induz uma resposta antiproliferativa e pró-apoptótica, agindo como supressora na tumorigênese inicial. No câncer avançado, por outro lado, ocorre a perda de resposta aos estímulos inibitórios da via do $TGF\beta$, que pode ser utilizada como um fator de progressão tumoral, induzindo imunossupressão, angiogênese, transdiferenciação epitelial-mesenquimal, e aumento do potencial metastático (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000; CHEN et al., 2002; DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; SIEGEL; MASSAGUE, 2003). Nesse contexto, dois estudos bastante recentes são boas evidências, ainda que de forma indireta, de um possível papel da ativação da via do $TGF\beta$ no linfoma de células do manto. Jung et al. (2004), estudando linhagens celulares de leucemias e linfomas, observaram que o $TGF\beta 1$ inibe a apoptose mediada

pelo gene *FAS*, tanto pela diminuição dos receptores de morte celular da via extrínseca da apoptose, quanto pela indução da expressão do *FLIP* (*CFLAR*), um potente inibidor da via extrínseca da apoptose que foi identificado com hiperexpressão no linfoma de células do manto no presente estudo. Além disso, Deane et al. (2004), utilizando um modelo de fígado duplo transgênico ciclina D1/TGF β em camundongos, observaram um aumento significativo na formação de tumores em relação aos modelos uni-transgênicos.

Por fim, este estudo comparativo do perfil de expressão gênica das células do linfoma de células do manto em relação a os linfócitos B virgens revelou a expressão aberrante de vários genes das vias de sinalização PI3K/AKT, WNT e TGF β como possíveis mecanismos subjacentes à evasão da apoptose que ocorre no linfoma de células do manto. Esses resultados correspondem a alterações do perfil de expressão gênica em nível celular, sem a interferência de células normais do estroma ganglionar, e adicionam informações originais à patogênese dessa neoplasia. Investigações adicionais dessas vias de sinalização como candidatas a novas abordagens terapêuticas poderão levar ao desenvolvimento de drogas mais eficazes no tratamento do linfoma de células do manto.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- a) O perfil de expressão gênica determinado por *microarrays* de oligonucleotídeos revelou que 106 genes apresentam uma variação de expressão maior do que três vezes nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens, sendo 63 genes induzidos e 43 reprimidos;
- b) Os resultados obtidos pelos *microarrays* foram confirmados pela quantificação por RT-PCR em tempo real dos 10 genes selecionados para validação em amostras de sangue periférico de 21 pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica;
- c) Na comparação dos 10 genes quantificados por RT-PCR em tempo real entre os pacientes com linfoma de células do manto e os pacientes com outras doenças linfoproliferativas crônicas, apenas os genes *TLR1* e *GALNT6* apresentaram diferença de expressão significativa, exibindo valores mais elevados no linfoma de células do manto do que nas doenças linfoproliferativas crônicas;
- d) Valores elevados de expressão do gene *TLR1* na quantificação por RT-PCR em tempo real demonstraram correlação significativa com sobrevida mais longa nos pacientes com linfoma de células do manto em fase leucêmica; e
- e) A análise auxiliada por computador dos resultados dos experimentos de *microarrays* revelou que vários genes relacionados à apoptose e às vias de sinalização PI3K/AKT, WNT e TGF β estão expressos de maneira aberrante nas células do linfoma de células do manto em relação aos linfócitos B virgens.

REFERÊNCIAS*

A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. **Blood**, Washington DC, v. 89, p. 3909-3918, jun. 1997.

AGUILERA, N.S.; BIJWAARD, K.E.; DUNCAN, B.; KRAFFT, A.E.; CHU, W.S.; ABBONDANZO, S.L.; LICHY, J.H.; TAUBENBERGER, J.K. Differential expression of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. **American Journal of Pathology**, Bethesda, MD, v. 153, p. 1969-1976, dez. 1998.

ARGATOFF, L.H.; CONNORS, J.M.; KLASA, R.J.; HORSMAN, D.E.; GASCOYNE, R.D. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. **Blood**, Washington DC, v. 89, p. 2067-2078, mar. 1997.

BANKS, P.M.; CHAN, J.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; GATTER, K.; GROGAN, T.M.; HARRIS, N.L.; ISAACSON, P.G.; JAFFE, E.S. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v. 16, p. 637-640, jul. 1992.

BARISTA, I.; ROMAGUERA, J.E.; CABANILLAS, F. Mantle-cell lymphoma. **The Lancet Oncology**, London, v. 2, p. 141-148, mar. 2001.

BENNETT, E.P.; HASSAN, H.; MANDEL, U.; HOLLINGSWORTH, M.A.; AKISAWA, N.; IKEMATSU, Y.; MERKX, G.; VAN KESSEL, A.G.; OLOFSSON, S.; CLAUSEN, H. Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, MD, v. 274, p. 25362-25370, set. 1999.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, p. 567-584, jun. 1989.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERARD, C.W.; JAFFE, E.S.; BRAYLAN, R.C.; MANN, R.B.; NANBA, K. Immunologic aspects and pathology of the malignant lymphomas. **Cancer**, New York, v. 42, p. 911-921, ago. 1978.

BERINSTEIN, N.L.; MANGEL, J. Integrating monoclonal antibodies into the management of mantle cell lymphoma. **Seminars in Oncology**, New York, v. 31, p. 2-6, fev. 2004.

BERTONI, F.; ZUCCA, E.; COTTER, F.E. Molecular basis of mantle cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 124, p. 130-140, jan. 2004.

BIJWAARD, K.E.; AGUILERA, N.S.; MONCZAK, Y.; TRUDEL, M.; TAUBENBERGER, J.K.; LICHY, J.H. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for cyclin D1 expression: utility in the diagnosis of mantle cell lymphoma. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 47, p. 195-201, fev. 2001.

BJORNSTI, M.A.; HOUGHTON, P.J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 4, p. 335-348, maio 2004.

BLOBE, G.C.; SCHIEMANN, W.P.; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, p. 1350-1358, maio 2000.

BODRUG, S.E.; WARNER, B.J.; BATH, M.L.; LINDEMAN, G.J.; HARRIS, A.W.; ADAMS, J.M. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. **The EMBO Journal**, Eynsham, Oxford, England, v. 13, p. 2124-2130, maio 1994.

BOSCH, F.; LOPEZ-GUILLERMO, A.; CAMPO, E.; RIBERA, J.M.; CONDE, E.; PIRIS, M.A.; VALLESPI, T.; WOESSNER, S.; MONTSERRAT, E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. **Cancer**, New York, v. 82, p. 567-575, fev. 1998.

BOURKE, E.; BOSISIO, D.; GOLAY, J.; POLENTARUTTI, N.; MANTOVANI, A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. **Blood**, Washington DC, v. 102, p. 956-963, ago. 2003.

CAMACHO, F.I.; ALGARA, P.; RODRIGUEZ, A.; RUIZ-BALLESTEROS, E.; MOLLEJO, M.; MARTINEZ, N.; MARTINEZ-CLIMENT, J.A.; GONZALEZ, M.; MATEO, M.; CALEO, A.; SANCHEZ-BEATO, M.; MENARGUEZ, J.; GARCIA-CONDE, J.; SOLE, F.; CAMPO, E.; PIRIS, M.A. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. **Blood**, Washington DC, v. 101, p. 4042-4046, maio 2003.

CAMPO, E.; RAFFELD, M.; JAFFE, E.S. Mantle-cell lymphoma. **Seminars in Hematology**, New York, v. 36, p. 115-127, abr. 1999.

CHANG, H.Y.; YANG, X.; BALTIMORE, D. Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 96, p. 1252-1256, fev. 1999.

CHEN, F.; OGAWA, K.; NAGARAJAN, R.P.; ZHANG, M.; KUANG, C.; CHEN, Y. Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. **Biochemical Journal**, London, v. 371, p. 257-263, abr. 2003.

CHEN, Y.G.; LUI, H.M.; LIN, S.L.; LEE, J.M.; YING, S.Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. **Experimental Biology and Medicine**, Maiowood, NJ, v. 227, p. 75-87, fev. 2002.

CHUAQUI, R.F.; BONNER, R.F.; BEST, C.J.; GILLESPIE, J.W.; FLAIG, M.J.; HEWITT, S.M.; PHILLIPS, J.L.; KRIZMAN, D.B.; TANGREA, M.A.; AHRAM, M.; LINEHAN, W.M.; KNEZEVIC, V.; EMMERT-BUCK, M.R. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nature Genetics**, New York, v. 32 Suppl, p. 509-514, dez. 2002.

COHEN, P.L.; KURTIN, P.J.; DONOVAN, K.A.; HANSON, C.A. Bone marrow and peripheral blood involvement in mantle cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 101, p. 302-310, maio 1998.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, p. 647-656, set. 2002.

DAVE, S.S.; WRIGHT, G.; TAN, B.; ROSENWALD, A.; GASCOYNE, R.D.; CHAN, W.C.; FISHER, R.I.; BRAZIEL, R.M.; RIMSZA, L.M.; GROGAN, T.M.; MILLER, T.P.; LEBLANC, M.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; LYNCH, J.C.; VOSE, J.; ARMITAGE, J.O.; SMELAND, E.B.; KVALOY, S.; HOLTE, H.; DELABIE, J.; CONNORS, J.M.; LANSDORP, P.M.; OUYANG, Q.; LISTER, T.A.; DAVIES, A.J.; NORTON, A.J.; MULLER-HERMELINK, H.K.; OTT, G.; CAMPO, E.; MONTSERRAT, E.; WILSON, W.H.; JAFFE, E.S.; SIMON, R.; YANG, L.; POWELL, J.; ZHAO, H.; GOLDSCHMIDT, N.; CHIORAZZI, M.; STAUDT, L.M. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 351, p. 2159-2169, nov. 2004.

DE BOER, C.J.; SCHUURING, E.; DREEF, E.; PETERS, G.; BARTEK, J.; KLUIN, P.M.; VAN KRIEKEN, J.H. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. **Blood**, Washington DC, v. 86, p. 2715-2723, out. 1995a.

DE BOER, C.J.; VAN KRIEKEN, J.H.; KLUIN-NELEMANS, H.C.; KLUIN, P.M.; SCHUURING, E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. **Oncogene**, Basingstoke, Hampshire, UK, v. 10, p. 1833-1840, maio 1995b.

DE OLIVEIRA, M.S.; JAFFE, E.S.; CATOVSKY, D. Leukaemic phase of mantle zone (intermediate) lymphoma: its characterisation in 11 cases. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, p. 962-972, set. 1989.

DE VOS, S.; KRUG, U.; HOFMANN, W.K.; PINKUS, G.S.; SWERDLOW, S.H.; WACHSMAN, W.; GROGAN, T.M.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and MCL-BV. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v. 12, p. 35-43, mar. 2003.

DEANE, N.G.; LEE, H.; HAMAAMEN, J.; RULEY, A.; WASHINGTON, M.K.; LAFLEUR, B.; THORGEIRSSON, S.S.; PRICE, R.; BEAUCHAMP, R.D. Enhanced tumor formation in cyclin D1 x transforming growth factor beta1 double transgenic mice with characterization by magnetic resonance imaging. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 1315-1322, fev. 2004.

DECAUDIN, D.; SALANOUBAT, C.; CARDE, P. Is mantle cell lymphoma a sex-related disease? **Leukemia & Lymphoma**, London, v. 37, p. 181-184, mar. 2000.

DERYNCK, R.; AKHURST, R.J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**, New York, v. 29, p. 117-129, out. 2001.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**, London, v. 425, p. 577-584, out. 2003.

DU, M.Q.; DISS, T.C.; XU, C.F.; WOTHERSPOON, A.C.; ISAACSON, P.G.; PAN, L.X. Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 96, p. 124-131, jan. 1997.

EBERT, B.L.; GOLUB, T.R. Genomic approaches to hematologic malignancies. **Blood**, Washington DC, v. 104, p. 923-932, ago. 2004.

EK, S.; BJORCK, E.; PORWITT-MACDONALD, A.; NORDENSKJOLD, M.; BORREBAECK, C.A. Increased expression of Ki-67 in mantle cell lymphoma is associated with de-regulation of several cell cycle regulatory components, as identified by global gene expression analysis. **Haematologica**, Pavia, v. 89, p. 686-695, jun. 2004.

EK, S.; HOGERKORP, C.M.; DICTOR, M.; EHINGER, M.; BORREBAECK, C.A. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth

regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. **Cancer Research**, Chicago, v. 62, p. 4398-4405, ago. 2002.

GERARD-MARCHAND, R.; HAMBLIN, I.; LENNERT, K.; RILKE, F.; STANSFELD, A.G.; VAN UNNIK, J.A.M. Letter: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. **Lancet**, London, v. 2, p. 406-408, ago. 1974.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, MA, v. 100, p. 57-70, jan. 2000.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, Washington DC, v. 84, p. 1361-1392, set. 1994.

HARRIS, N.L.; STEIN, H.; COUPLAND, S.E.; HUMMEL, M.; FAVERA, R.D.; PASQUALUCCI, L.; CHAN, W.C. New approaches to lymphoma diagnosis. **Hematology (The American Society of Hematology Education Program)**, Washington DC, p. 194-220, 2001.

HOFMANN, W.K.; DE, V.S.; TSUKASAKI, K.; WACHSMAN, W.; PINKUS, G.S.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. **Blood**, Washington DC, v. 98, p. 787-794, ago. 2001.

HUMMEL, M.; TAMARU, J.; KALVELAGE, B.; STEIN, H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. **Blood**, Washington DC, v. 84, p. 403-407, jul. 1994.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, p. 277-288, abr. 2002.

ISLAM, T.C.; ASPLUND, A.C.; LINDVALL, J.M.; NYGREN, L.; LIDEN, J.; KIMBY, E.; CHRISTENSSON, B.; SMITH, C.I.; SANDER, B. High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. **Leukemia**, London, v. 17, p. 1880-1890, set. 2003.

JADAYEL, D.M.; LUKAS, J.; NACHEVA, E.; BARTKOVA, J.; STRANKS, G.; DE SCHOUWER, P.J.; LENS, D.; BARTEK, J.; DYER, M.J.; KRUGER, A.R.; CATOVSKY, D. Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). **Leukemia**, London, v. 11, p. 64-72, jan. 1997.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 1. ed. Lyon: IARC, 2001. 352 p.

JUNG, Y.J.; KIM, J.Y.; PARK, J.H. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, Greece, v. 13, p. 99-104, jan. 2004.

KAWAMATA, N.; KOEFFLER, H.P. Mantle cell lymphoma: SAHA blocks Akt/mTOR and reduces cyclin D1 protein level by affecting translation (Abstract 3293). **Blood**, Washington DC, v. 104, p. 900a, nov. 2004.

KHOURI, I.F.; LEE, M.S.; SALIBA, R.M.; JUN, G.; FAYAD, L.; YOUNES, A.; PRO, B.; ACHOLONU, S.; MCLAUGHLIN, P.; KATZ, R.L.; CHAMPLIN, R.E. Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, VA, v. 21, p. 4407-4412, dez. 2003.

KHOURI, I.F.; ROMAGUERA, J.; KANTARJIAN, H.; PALMER, J.L.; PUGH, W.C.; KORBLING, M.; HAGEMEISTER, F.; SAMUELS, B.; RODRIGUEZ, A.; GIRALT, S.; YOUNES, A.; PRZEPIORKA, D.; CLAXTON, D.; CABANILLAS, F.; CHAMPLIN, R. Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 16, p. 3803-3809, dez. 1998.

KIENLE, D.; KROBER, A.; KATZENBERGER, T.; OTT, G.; LEUPOLT, E.; BARTH, T.F.; MOLLER, P.; BENNER, A.; HABERMANN, A.; MULLER-HERMELINK, H.K.; BENTZ, M.; LICHTER, P.; DOHNER, H.; STILGENBAUER, S. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. **Blood**, Washington DC, v. 102, p. 3003-3009, out. 2003.

KING, H.C.; SINHA, A.A. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 286, p. 2280-2288, nov. 2001.

KLEIN, U.; TU, Y.; STOLOVITZKY, G.A.; KELLER, J.L.; HADDAD, J., JR.; MILJKOVIC, V.; CATTORETTI, G.; CALIFANO, A.; LA-FAVERA, R. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 100, p. 2639-2644, mar. 2003.

KODET, R.; MRHALOVA, M.; KRSKOVA, L.; SOUKUP, J.; CAMPR, V.; NESKUDLA, T.; SZEPE, P.; PLANK, L. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 442, p. 538-547, jun. 2003.

KUPPERS, R.; KLEIN, U.; HANSMANN, M.L.; RAJEWSKY, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, p. 1520-1529, nov. 1999.

LETESTU, R.; UGO, V.; VALENSI, F.; RADFORD-WEISS, I.; NATAF, J.; LEVY, V.; GRIBBEN, J.G.; TROUSSARD, X.; JCHENBAUM-CYMBALISTA, F. Prognostic impact of p27KIP1 expression in cyclin D1 positive lymphoproliferative disorders. **Leukemia**, London, v. 18, p. 953-961, maio 2004.

LEVY, R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. **Leukemia**, London, v. 17, p. 796-797, abr. 2003.

LEW, D.J.; DULIC, V.; REED, S.I. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. **Cell**, Cambridge, MA, v. 66, p. 1197-1206, set. 1991.

LI, J.Y.; GAILLARD, F.; MOREAU, A.; HAROUSSEAU, J.L.; LABOISSE, C.; MILPIED, N.; BATAILLE, R.; VET-LOISEAU, H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. **American Journal of Pathology**, Bethesda, MD, v. 154, p. 1449-1452, maio 1999.

LIN, S.Y.; XIA, W.; WANG, J.C.; KWONG, K.Y.; SPOHN, B.; WEN, Y.; PESTELL, R.G.; HUNG, M.C. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 97, p. 4262-4266, abr. 2000.

LIPES, M.A.; NAPOLITANO, M.; JEANG, K.T.; CHANG, N.T.; LEONARD, W.J. Identification, cloning, and characterization of an immune activation gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 85, p. 9704-9708, dez. 1988.

LIU, Z.; DONG, H.Y.; GORCZYCA, W.; TSANG, P.; COHEN, P.; STEPHENSON, C.F.; BERGER, C.S.; WU, C.D.; WEISBERGER, J. CD5- mantle cell lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 118, p. 216-224, ago. 2002.

LOCKHART, D.J.; WINZELER, E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**, London, v. 405, p. 827-836, jun. 2000.

LOSSOS, I.S.; CZERWINSKI, D.K.; ALIZADEH, A.A.; WECHSER, M.A.; TIBSHIRANI, R.; BOTSTEIN, D.; LEVY, R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, p. 1828-1837, abr. 2004.

LOSSOS, I.S.; CZERWINSKI, D.K.; WECHSER, M.A.; LEVY, R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. **Leukemia**, London, v. 17, p. 789-795, abr. 2003.

LOVEC, H.; GRZESCHICZEK, A.; KOWALSKI, M.B.; MOROY, T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. **The EMBO Journal**, Eynsham, Oxford, England, v. 13, p. 3487-3495, ago. 1994.

LOWE, S.W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, London, v. 432, p. 307-315, nov. 2004.

LU, D.; ZHAO, Y.; TAWATAO, R.; COTTAM, H.B.; SEN, M.; LEONI, L.M.; KIPPS, T.J.; CORR, M.; CARSON, D.A. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 101, p. 3118-3123, mar. 2004.

LUO, J.; MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**, Cambridge, MA, v. 4, p. 257-262, out. 2003.

LUTHRA, R.; HAI, S.; PUGH, W.C. Polymerase chain reaction detection of the t(11;14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v. 4, p. 4-7, mar. 1995.

MARQUES, M.G.A. **Caracterização clínica, morfológica e imunofenotípica da fase leucêmica de linfomas não-Hodgkin**. 1997. 141 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

MARTINEZ, N.; CAMACHO, F.I.; ALGARA, P.; RODRIGUEZ, A.; DOPAZO, A.; RUIZ-BALLESTEROS, E.; MARTIN, P.; MARTINEZ-CLIMENT, J.A.; GARCIA-CONDE, J.; MENARGUEZ, J.; SOLANO, F.; MOLLEJO, M.; PIRIS, M.A. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. **Cancer Research**, Chicago, v. 63, p. 8226-8232, dez. 2003.

MARTINEZ-CLIMENT, J.A.; VIZCARRA, E.; SANCHEZ, D.; BLESÁ, D.; MARUGAN, I.; BENET, I.; SOLE, F.; RUBIO-MOSCARDO, F.; TEROL, M.J.; CLIMENT, J.; SARSOTTI, E.; TORMO, M.; ANDREU, E.; SALIDO, M.; RUIZ, M.A.; PROSPER, F.; SIEBERT, R.; DYER, M.J.; GARCIA-CONDE, J. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. **Blood**, Washington DC, v. 98, p. 3479-3482, dez. 2001.

MATUTES, E.; OWUSU-ANKOMAH, K.; MORILLA, R.; GARCIA, M.J.; HOULIHAN, A.; QUE, T.H.; CATOVSKY, D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. **Leukemia**, London, v. 8, p. 1640-1645, out. 1994.

MATUTES, E.; PARRY-JONES, N.; BRITO-BABAPULLE, V.; WOTHERSPOON, A.; MORILLA, R.; ATKINSON, S.; ELNENAEI, M.O.; JAIN, P.; GIUSTOLISI, G.M.; A'HERN, R.P.; CATOVSKY, D. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. **Leukemia & Lymphoma**, London, v. 45, p. 2007-2015, out. 2004.

MEUSERS, P.; HENSE, J. Management of mantle cell lymphoma. **Annals of Hematology**, Berlin, v. 78, p. 485-494, nov. 1999.

MIYAZONO, K.; SUZUKI, H.; IMAMURA, T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. **Cancer Science**, Tokyo, v. 94, p. 230-234, mar. 2003.

MOLINA, T.J.; DELMER, A.; CYMBALISTA, F.; LE TOURNEAU, A.; PERROT, J.Y.; RAMOND, S.; MARIE, J.P.; AUDOUIN, J.; ZITTOUN, R.; DIEBOLD, J. Mantle cell lymphoma, in leukaemic phase with prominent splenomegaly. A report of eight cases with similar clinical presentation and aggressive outcome. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 437, p. 591-598, dez. 2000.

MOLOT, R.J.; MEEKER, T.C.; WITTWER, C.T.; PERKINS, S.L.; SEGAL, G.H.; MASI, A.S.; BRAYLAN, R.C.; KJELDSBERG, C.R. Antigen expression and polymerase chain reaction amplification of mantle cell lymphomas. **Blood**, Washington DC, v. 83, p. 1626-1631, mar. 1994.

MOON, R.T.; KOHN, A.D.; DE FERRARI, G.V.; KAYKAS, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 691-701, set. 2004.

MOREAU, E.J.; MATUTES, E.; A'HERN, R.P.; MORILLA, A.M.; MORILLA, R.M.; OWUSU-ANKOMAH, K.A.; SEON, B.K.; CATOVSKY, D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 108, p. 378-382, out. 1997.

MOTOKURA, T.; BLOOM, T.; KIM, H.G.; JUPPNER, H.; RUDERMAN, J.V.; KRONENBERG, H.M.; ARNOLD, A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. **Nature**, London, v. 350, p. 512-515, abr. 1991.

NAGY, B.; LUNDAN, T.; LARRAMENDY, M.L.; AALTO, Y.; ZHU, Y.; NIINI, T.; EDGREN, H.; FERRER, A.; VILPO, J.; ELONEN, E.; VETTENRANTA, K.; FRANSSILA, K.; KNUUTILA, S. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 120, p. 434-441, fev. 2003.

NANBA, K.; JAFFE, E.S.; BRAYLAN, R.C.; SOBAN, E.J.; BERARD, C.W. Alkaline phosphatase-positive malignant lymphoma. A subtype of B-cell lymphomas. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 68, p. 535-542, nov. 1977.

NICHOLSON, K.M.; ANDERSON, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell Signaling**, Oxford, NY, v. 14, p. 381-395, maio 2002.

NORTON, A.J.; MATTHEWS, J.; PAPPAS, V.; SHAMASH, J.; LOVE, S.; ROHATINER, A.Z.; LISTER, T.A. Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. **Annals of Oncology**, London, v. 6, p. 249-256, mar. 1995.

ORCHARD, J.; GARAND, R.; DAVIS, Z.; BABBAGE, G.; SAHOTA, S.; MATUTES, E.; CATOVSKY, D.; THOMAS, P.W.; VET-LOISEAU, H.; OSCIER, D. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. **Blood**, Washington DC, v. 101, p. 4975-4981, jun. 2003.

OTT, G.; KALLA, J.; OTT, M.M.; SCHRYEN, B.; KATZENBERGER, T.; MULLER, J.G.; MULLER-HERMELINK, H.K. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. **Blood**, Washington DC, v. 89, p. 1421-1429, fev. 1997.

PALUTKE, M.; EISENBERG, L.; MIRCHANDANI, I.; TABACZKA, P.; HUSAIN, M. Malignant lymphoma of small cleaved lymphocytes of the follicular mantle zone. **Blood**, Washington DC, v. 59, p. 317-322, fev. 1982.

PARDAL, R.; CLARKE, M.F.; MORRISON, S.J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 3, p. 895-902, dez. 2003.

PASCUAL, V.; LIU, Y.J.; MAGALSKI, A.; DE, B.O.; BANCHEREAU, J.; CAPRA, J.D. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 329-339, jul. 1994.

PITTALUGA, S.; BIJNENS, L.; TEODOROVIC, I.; HAGENBEEK, A.; MEERWALDT, J.H.; SOMERS, R.; THOMAS, J.; NOORDIJK, E.M.; DE WOLF-PEETERS, C. Clinical analysis of 670 cases in two trials of the European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group subtyped according to the Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: a comparison with the Working Formulation. **Blood**, Washington DC, v. 87, p. 4358-4367, maio 1996.

RAMAKRISHNAN, R.; DORRIS, D.; LUBLINSKY, A.; NGUYEN, A.; DOMANUS, M.; PROKHOROVA, A.; GIESER, L.; TOUMA, E.; LOCKNER, R.; TATA, M.; ZHU, X.; PATTERSON, M.; SHIPPY, R.; SENDERA, T.J.; MAZUMDER, A. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, p. e30, abr. 2002.

ROCKETT, J.C. To confirm or not to confirm (microarray data) — that is the question. **Drug Discovery Today**, Kidlington, Oxford, UK, v. 8, p. 343, abr. 2003.

ROSENBERG, C.L.; WONG, E.; PETTY, E.M.; BALE, A.E.; TSUJIMOTO, Y.; HARRIS, N.L.; ARNOLD, A. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 88, p. 9638-9642, nov. 1991.

ROSENWALD, A.; WRIGHT, G.; WIESTNER, A.; CHAN, W.C.; CONNORS, J.M.; CAMPO, E.; GASCOYNE, R.D.; GROGAN, T.M.; MULLER-HERMELINK, H.K.; SMELAND, E.B.; CHIORAZZI, M.; GILTNANE, J.M.; HURT, E.M.; ZHAO, H.; AVERETT, L.; HENRICKSON, S.; YANG, L.; POWELL, J.; WILSON, W.H.; JAFFE, E.S.; SIMON, R.; KLAUSNER, R.D.; MONTSERRAT, E.; BOSCH, F.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; SANGER, W.G.; DAVE, B.J.; LYNCH, J.C.; VOSE, J.; ARMITAGE, J.O.; FISHER, R.I.; MILLER, T.P.; LEBLANC, M.; OTT, G.; KVALOY, S.; HOLTE, H.; DELABIE, J.; STAUDT, L.M. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. **Cancer Cell**, Cambridge, MA, v. 3, p. 185-197, fev. 2003.

SCHMECHEL, S.C.; LEVASSEUR, R.J.; YANG, K.H.; KOEHLER, K.M.; KUSSICK, S.J.; SABATH, D.E. Identification of genes whose expression patterns differ in benign lymphoid tissue and follicular, mantle cell, and small lymphocytic lymphoma. **Leukemia**, London, v. 18, p. 841-855, abr. 2004.

SCHUURING, E.; VERHOEVEN, E.; MOOI, W.J.; MICHALIDES, R.J. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. **Oncogene**, Basingstoke, Hampshire, UK, v. 7, p. 355-361, fev. 1992.

SENDERA, T.J.; DORRIS, D.; RAMAKRISHNAN, R.; NGUYEN, A.; TRAKAS, D.; MAZUMDER, A. Expression profiling with oligonucleotide arrays: technologies and applications for neurobiology. **Neurochemical Research**, New York, v. 27, p. 1005-1026, out. 2002.

SHAFFER, A.L.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L.M. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 2, p. 920-932, dez. 2002.

SHEN, Y.; IQBAL, J.; HUANG, J.Z.; ZHOU, G.; CHAN, W.C. BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. **Blood**, Washington DC, v. 104, p. 2936-2939, nov. 2004a.

SHEN, Y.; IQBAL, J.; XIAO, L.; LYNCH, R.C.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L.M.; SHERMAN, S.; DYBKAER, K.; ZHOU, G.; EUDY, J.D.; DELABIE, J.; MCKEITHAN, T.W.; CHAN, W.C. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. **BMC Immunology**, London, v. 5, p. 1-17, set. 2004b.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, Washington DC, v. 274, p. 1672-1677, dez. 1996.

SIEGEL, P.M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 3, p. 807-821, nov. 2003.

SPECHT, K.; KREMER, M.; MULLER, U.; DIRNHOFER, S.; ROSEMAN, M.; HOFER, H.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEND, F. Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections. **Clinical Cancer Research**, Denville, NJ, v. 8, p. 2902-2911, set. 2002.

STRASSER, A.; HARRIS, A.W.; BATH, M.L.; CORY, S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. **Nature**, London, v. 348, p. 331-333, nov. 1990.

SUZUKI, R.; TAKEMURA, K.; TSUTSUMI, M.; NAKAMURA, S.; HAMAJIMA, N.; SETO, M. Detection of cyclin D1 overexpression by real-time reverse-transcriptase-mediated quantitative polymerase chain reaction for the diagnosis of mantle cell lymphoma. **American Journal of Pathology**, Bethesda, MD, v. 159, p. 425-429, ago. 2001.

SWERDLOW, S.H.; BERGER, F.; ISAACSON, P.G.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; NATHWANI, B.N.; PIRIS, M.A.; HARRIS, N.L. Mantle cell lymphoma. In: JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. **Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 1. ed. Lyon: IARC, 2001. p. 168-170.

SWERDLOW, S.H.; WILLIAMS, M.E. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. **Human Pathology**, Philadelphia, PA, v. 33, p. 7-20, jan. 2002.

TAN, P.K.; DOWNEY, T.J.; SPITZNAGEL, E.L., JR.; XU, P.; FU, D.; DIMITROV, D.S.; LEMPICKI, R.A.; RAAKA, B.M.; CAM, M.C. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, p. 5676-5684, out. 2003.

THIEBLEMONT, C.; NASSER, V.; FELMAN, P.; LEROY, K.; GAZZO, S.; CALLET-BAUCHU, E.; LORIOD, B.; GRANJEAUD, S.; GAULARD, P.; HAIOUN, C.; TRAVERSE-GLEHEN, A.; BASEGGIO, L.; BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; MAGRANGEAS, F.; MINVIELLE, S.; VET-LOISEAU, H.; SALLES, G.; COIFFIER, B.; BERGER, F.; HOULGATTE, R. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. **Blood**, Washington DC, v. 103, p. 2727-2737, abr. 2004.

THOME, M.; TSCHOPP, J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 1, p. 50-58, out. 2001.

TOLKSDORF, G.; STEIN, H.; LENNERT, K. Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal-centre cells with cleaved nuclei (centrocytes). **British Journal of Cancer**, London, v. 41, p. 168-182, fev. 1980.

TRÜMPER, L.H.; BRITTINGER, G.; KIEHL, V.; HARRIS, N.L. Non-Hodgkin's lymphoma: a history of classification and clinical observations. In: MAUCH, P. M.; ARMITAGE, J. O.; COIFFIER, B.; DALLA-FAVERA, R.; HARRIS, N. L. **Non-Hodgkin's Lymphomas**. 1. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2004. cap. 1, p. 3-28.

TSUJIMOTO, Y.; YUNIS, J.; ONORATO-SHOWE, L.; ERIKSON, J.; NOWELL, P.C.; CROCE, C.M. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. **Science**, Washington DC, v. 224, p. 1403-1406, jun. 1984.

UCHIMARU, K.; TANIGUCHI, T.; YOSHIKAWA, M.; ASANO, S.; ARNOLD, A.; FUJITA, T.; MOTOKURA, T. Detection of cyclin D1 (bcl-1, PRAD1) overexpression by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay in t(11;14)(q13;q32)-bearing B-cell malignancies and/or mantle cell lymphoma. **Blood**, Washington DC, v. 89, p. 965-974, fev. 1997.

VAANDRAGER, J.W.; SCHUURING, E.; ZWIKSTRA, E.; DE BOER, C.J.; KLEIVERDA, K.K.; VAN KRIEKEN, J.H.; KLUIN-NELEMANS, H.C.; VAN OMMEN, G.J.; RAAP, A.K.; KLUIN, P.M. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. **Blood**, Washington DC, v. 88, p. 1177-1182, ago. 1996.

VANDENBERGHE, E.; DE WOLF-PEETERS, C.; VAUGHAN, H.G.; VAUGHAN, H.B.; PITTALUGA, S.; ANDERSON, L.; LINCH, D.C. The clinical outcome of 65 cases of mantle cell lymphoma initially treated with non-intensive therapy by the British National Lymphoma Investigation Group. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 99, p. 842-847, dez. 1997.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, p. 489-501, jul. 2002.

WALSH, S.H.; THORSELIUS, M.; JOHNSON, A.; SODERBERG, O.; JERKEMAN, M.; BJORCK, E.; ERIKSSON, I.; THUNBERG, U.; LANDGREN, O.; EHINGER, M.; LOFVENBERG, E.; WALLMAN, K.; ENBLAD, G.; SANDER, B.; PORWIT-MACDONALD, A.; DICTOR, M.; OLOFSSON, T.; SUNDSTROM, C.; ROOS, G.; ROSENQUIST, R. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. **Blood**, Washington DC, v. 101, p. 4047-4054, maio 2003.

WEISENBURGER, D.D.; ARMITAGE, J.O. Mantle cell lymphoma — an entity comes of age. **Blood**, Washington DC, v. 87, p. 4483-4494, jun. 1996.

WEISENBURGER, D.D.; KIM, H.; RAPPAPORT, H. Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. **Cancer**, New York, v. 49, p. 1429-1438, abr. 1982.

WEISENBURGER, D.D.; NATHWANI, B.N.; DIAMOND, L.W.; WINBERG, C.D.; RAPPAPORT, H. Malignant lymphoma, intermediate lymphocytic type: a clinicopathologic study of 42 cases. **Cancer**, New York, v. 48, p. 1415-1425, set. 1981.

WEISENBURGER, D.D.; VOSE, J.M.; GREINER, T.C.; LYNCH, J.C.; CHAN, W.C.; BIERMAN, P.J.; DAVE, B.J.; SANGER, W.G.; ARMITAGE, J.O. Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. **American Journal of Hematology**, New York, v. 64, p. 190-196, jul. 2000.

WELLER, S.; FAILI, A.; GARCIA, C.; BRAUN, M.C.; LE DEIST, F.F.; SAINT BASILE, G.G.; HERMINE, O.; FISCHER, A.; REYNAUD, C.A.; WEILL, J.C. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 98, p. 1166-1170, jan. 2001.

WELZEL, N.; LE, T.; MARCULESCU, R.; MITTERBAUER, G.; CHOTT, A.; POTT, C.; KNEBA, M.; DU, M.Q.; KUSEC, R.; DRACH, J.; RADERER, M.; MANNHALTER, C.; LECHNER, K.; NADEL, B.; JAEGER, U. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. **Cancer Research**, Chicago, v. 61, p. 1629-1636, fev. 2001.

WIESTNER, A.; STAUDT, L.M. Towards molecular diagnosis and targeted therapy of lymphoid malignancies. **Seminars in Hematology**, New York, v. 40, p. 296-307, out. 2003.

WILLIAM, J.; EULER, C.; CHRISTENSEN, S.; SHLOMCHIK, M.J. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. **Science**, Washington DC, v. 297, p. 2066-2070, set. 2002.

WILLIAMS, M.E.; SWERDLOW, S.H.; ROSENBERG, C.L.; ARNOLD, A. Chromosome 11 translocation breakpoints at the PRAD1/cyclin D1 gene locus in centrocytic lymphoma. **Leukemia**, London, v. 7, p. 241-245, fev. 1993.

WITHERS, D.A.; HARVEY, R.C.; FAUST, J.B.; MELNYK, O.; CAREY, K.; MEEKER, T.C. Characterization of a candidate bcl-1 gene. **Molecular and Cellular Biology**, Washington DC, v. 11, p. 4846-4853, out. 1991.

WITZIG, T.; GEYER, S.; GHOBRIAL, I.; INWARDS, D.; FONSECA, R.; KAUFMANN, S.; KURTIN, P.; COLGAN, J.; MORICE, W.; ALBERTS, S.; SALIM, M.; ROWLAND, K.; DAKHIL, S.; MORTON, R.; STELLA, P. Anti-tumor activity of single-agent CCI-779 for

relapsed mantle cell lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group (Abstract 129). **Blood**, Washington DC, v. 104, p. 40a, nov. 2004.

WONG, K.F.; CHAN, J.K.; SO, J.C.; YU, P.H. Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. **Cancer**, New York, v. 86, p. 850-857, set. 1999.

YANG, W.I.; ZUKERBERG, L.R.; MOTOKURA, T.; ARNOLD, A.; HARRIS, N.L. Cyclin D1 (Bcl-1, PRAD1) protein expression in low-grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. **American Journal of Pathology**, Bethesda, MD, v. 145, p. 86-96, jul. 1994.

YAUK, C.L.; BERNDT, M.L.; WILLIAMS, A.; DOUGLAS, G.R. Comprehensive comparison of six microarray technologies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. e124, ago. 2004.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V.E.; KERN, S.E.; HRUBAN, R.H.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, Washington DC, v. 276, p. 1268-1272, maio 1997.

ZUCCA, E.; ROGGERO, E.; PINOTTI, G.; PEDRINIS, E.; CAPPELLA, C.; VENCO, A.; CAVALLI, F. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. **Annals of Oncology**, London, v. 6, p. 257-262, mar. 1995.

ZUCCA, E.; STEIN, H.; COIFFIER, B. European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). **Annals of Oncology**, London, v. 5, p. 507-511, jul. 1994.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 04 de dezembro de 2002

Ofício nº 3461/2002
CEP/SPC

PROCESSO HCRP nº 7096/2002

Prezado Doutor:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 145ª Reunião Ordinária realizada em 02/12/2002 **analisou e aprovou as recomendações solicitadas em parecer nº 1568/2002 pela CONEP**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DO LINFOMA DAS CÉLULAS DO MANTO”**.

Solicitamos apresentação de relatório ao término da pesquisa para que seja informado à CONEP.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
DR. EDGAR GIL RIZZATTI
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Hematologia

ANEXO B

Resumo apresentado sob a forma de pôster no *9th Congress of the European Hematology Association*, em Genebra, Suíça, no dia 11 de junho de 2004, quando foi agraciado com um *Travel Award*.

The Hematology Journal (2004) 5, S1–S88

© 2004 The European Hematology Association All rights reserved 1466-4580/04

www.nature.com/thj

002 COMPARISON OF GENE EXPRESSION PROFILING BETWEEN MANTLE CELL LYMPHOMA IN LEUKEMIC PHASE AND NORMAL NA VE B-CELLS WITH OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS

E.G. Rizzatti¹, A.G. Araújo¹, M.H. Tavella², A.B. Garcia¹, D.A.P. Gallo¹, R. Proto-Siqueira², O.K. Okamoto³, R.P. Falco¹, M.A. Zago²

¹School of Medicine of Ribeiro Preto, RIBEIRO PRETO, Brazil

²CTC, RIBEIRO PRETO, Brazil

³IEP-HIAE, S O PAULO, Brazil

Mantle cell lymphoma (MCL) is a distinctive subtype of B-cell lymphoma characterized by recurrent association with the t(11;14)(q13;32) and consequent ectopic overexpression of cyclin D1 in the tumor cells. Clinically, the disease is predominantly disseminated at diagnosis and a frank leukemic phase is detected in one fourth of patients. Median survival of MCL is short (about 36 months) and to date no specific treatment is available. Ontogenetically, MCL is considered the malignant counterpart of pregerminal center nave B-cells. Although the overexpression of cyclin D1 plays a pivotal role on the pathogenesis of MCL, studies with transgenic mice have shown that this is not sufficient, by itself, to cause lymphoma. In addition, a growing number of distinct genetic and biological alterations have been associated with MCL and a better understanding of the molecular genetics of this disease may provide insights towards a potentially curable therapy. To address this issue, we compared the gene expression profile of MCL and na ve B-cells using oligonucleotide microarrays representing 10.000 genes. MCL cells and normal nave B-cells (IgD+CD38CD27-) were highly purified, by magnetic activated cell sorting, from the peripheral blood of patients with MCL in leukemic phase and from tonsils, respectively (purity > 95% in all samples). Three patients were selected from each group and experiments were performed in replicates using the Amersham CodeLink Human UniSet I Bioarray. Microarrays were scanned on GenePix 4000B Array Scanner. Spot finding, data extraction and normalization were performed with the CodeLink Expression Analysis software and data mining with Vector Xpression, Informax. After filtering for poor spots, data from replicates were averaged and genes displaying at least three-fold differences in expression between MCL and na ve B-cells, in all nine possible comparisons, were identified. According to these criteria, a total of 106 differentially expressed genes were found in MCL cells: 63 overexpressed and 43 underexpressed. Gene Ontology classification of the 63 overexpressed genes in MCL originated 185 records, with nucleic acid metabolism (9%), signal transduction (8%), DNA binding (7%), cell proliferation (5%) and transmembrane receptor activity (4%) as the most common categories after unclassified genes (17%). The 43 underexpressed genes originated 133 records, with signal transduction (16%), response to biotic stimulus (11%), nucleic acid metabolism (8%) and response to pathogen (7%) as the most common categories after unclassified genes (23%). For validation purposes, differential expression of seven selected genes was confirmed by TaqMan real-time RT-PCR in non-purified peripheral blood samples from 25 patients with MCL in leukemic phase, compared with purified tonsil nave B-cells, purified peripheral blood B-cells and total peripheral blood. Data on large scale gene expression of MCL have been obtained mainly with cDNA microarray studies of tumor lymph nodes and results have favored a predominant expression of proliferation genes. The present study represents a different strategy which emphasizes disease at the cellular level, revealing that the nucleic acid metabolism and signal transduction categories of genes are also significantly modulated in MCL.

ANEXO C

Resumo apresentado sob a forma de apresentação oral no HEMO 2004, Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, em São Paulo, SP, no dia 5 de novembro de 2004, quando foi agraciado com o prêmio “Michel Jamra” de melhor trabalho em Hematologia Geral.

Rev. bras. hematol. hemoter., novembro 2004;26, suplemento 2: 1-166

321

Perfil de expressão gênica do Linfoma de Células do Manto revela a expressão aberrante de genes da superfamília TGF β

EG Rizzatti¹, RA Panepucci², R Proto-Siqueira², WT Anselmo-Lima², OK Okamoto³, RP Falcão¹, MA Zago²

¹FMRP, Depto. de Clínica Médica

²FMRP, CTC

³IEP-HIAE

O linfoma de células do manto (LCM) é associado à t(11;14) (q13;q32) e à expressão ectópica da ciclina D1. Os pacientes com LCM apresentam-se com doença avançada ao diagnóstico e uma franca fase leucêmica (FL) é observada em 1/4 dos casos. O LCM tem sua origem celular em linfócitos B virgens (LBV) que sofreram transformação maligna. A expressão da ciclina D1 não é suficiente para a linfomagenese por si só, embora seja indispensável à patogênese do LCM, e a elucidação das alterações moleculares adicionais poderia dar subsídios a novas abordagens terapêuticas. Com esse objetivo, nós comparamos o perfil de expressão gênica do LCM com o perfil de expressão gênica dos LBV, usando *microarrays* de oligonucleotídeos. Células linfomatosas e LBV (IgD+CD38 $\pm$ CD27-) foram purificados em colunas imunomagnéticas a partir do sangue periférico (SP) de pacientes com LCM em FL e de amídalas de pacientes normais, respectivamente (pureza > 95%). Três indivíduos foram selecionados em cada grupo e os experimentos foram realizados em duplicatas usando *microarrays* Code Link Human UniSet I com 10.000 genes. Dentre os genes modulados no LCM, 10 (6 induzidos e 4 reprimidos) foram selecionados para validação por RT-PCR em tempo real (TaqMan) em amostras de SP de 21 pacientes com LCM em FL, com resultados concordantes em todos os genes validados. A análise dos resultados dos *microarrays* revelou a expressão aberrante de vários genes da via do TGF- β no LCM ($p < 0,01$): ACVR1 (razão LCM/LBV = 2,5); ACVR2 (2,9); ACVR2B (16,3); BMP4 (11,8); TGIF (4,0) e SMAD2 (3,4). A ativação dessa via induz uma resposta antiproliferativa e pró-apoptótica, agindo como supressora na tumorigênese inicial. No câncer avançado, porém, ocorre perda de resposta aos estímulos inibitórios e a via do TGF- β pode ser usada como fator de progressão tumoral, induzindo imunossupressão, angiogênese e metástases. Ademais, o modelo de fígado duplo transgênico ciclina D1/TGF- β demonstrou aumento na formação de tumores em relação aos modelos uni-transgênicos (Deane et al. Cancer Res. 2004;64:1315). Nossos resultados adicionam uma informação original à patogênese molecular do LCM e apontam a via de sinalização do TGF- β como um potencial alvo para novas abordagens terapêuticas.

ANEXO D

Resumo apresentado sob a forma de pôster no *46th Annual Meeting of the American Society of Hematology*, em San Diego, EUA, no dia 5 de dezembro de 2004.

Abstract# 2048

Poster Board #-Session: 261-II

Gene Expression Profiling of Mantle Cell Lymphoma in the Leukemic Phase Reveals Aberrant Expression of Genes from the TGF- β Signaling Pathway. Edgar G. Rizzatti*,^{1,2} Rodrigo A. Panepucci*,^{1,2} Rodrigo Proto-Siqueira*,^{1,2} Wilma T. Anselmo-Lima*,³ Oswaldo K. Okamoto*,⁴ Roberto P. Falcao,^{1,2} Marco A. Zago*,^{1,2} ¹*Department of Clinical Medicine at Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil;* ²*Center for Research on Cell-Based Therapy, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil;* ³*Department of Otorhinolaryngology at Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil;* ⁴*IEP, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil.*

Mantle cell lymphoma (MCL) is a distinctive subtype of B-cell lymphoma associated with the t(11;14)(q13;32) and consequent ectopic overexpression of cyclin D1 in the tumor cells. Disease is predominantly disseminated at diagnosis and a frank leukemic phase is detected in one fourth of patients. Ontogenetically, MCL is considered the malignant counterpart of pre-germinal-center naive B-cells. Although the overexpression of cyclin D1 plays a pivotal role on the pathogenesis of MCL, studies with transgenic mice have shown that it is not sufficient by itself to cause lymphoma, and a better understanding of the molecular genetics of this disease may provide insights toward a potentially curable therapy. To address this issue, we compared the gene expression profile of MCL and normal naive B-cells using oligonucleotide microarrays representing 10,000 genes. MCL cells and naive B-cells (IgD+CD38 $\pm$ CD27-) were highly purified, by magnetic activated cell sorting, from the peripheral blood of patients with MCL in the leukemic phase and from tonsils of normal controls, respectively (purity > 95% in all samples). Three individuals were selected for each group and experiments were performed in replicates using the Amersham CodeLink Human UniSet I Bioarrays. For validation purposes, the expression of 10 selected genes (6 overexpressed and 4 underexpressed in lymphoma cells) was quantified by TaqMan real-time RT-PCR in non-purified peripheral blood samples from 25 patients with MCL in the leukemic phase and compared with normal naive B-cells, with fully concordant results. Data mining from our microarray results revealed an aberrant expression of several genes from the TGF- β signaling pathway in MCL ($p < 0.01$): ACVR1 (fold change = 2.5), ACVR2 (2.9), ACVR2B (16.3), BMP4 (11.8), TGIF (4.0), Smad2 (3.4) and Smad6 (0.6). Except for TGIF and Smad6, all other genes induce the TGF- β signaling pathway. Although TGIF was overexpressed, it depends on the relative levels of Smad co-repressors or co-activators to exert its inhibitory activity; whereas Smad6, which is also an inhibitory mediator, was underexpressed. The activin receptors ACVR1, ACVR2 and ACVR2B are receptors of the TGF- β superfamily, which consists of TGF- β , activins, bone morphogenic proteins (BMPs) and others. Upon ligand binding, activin receptors induce anti-proliferative and pro-apoptotic responses, acting as tumor suppressors in early tumorigenesis. In advanced cancer, however, there is a loss of growth-inhibitory responsiveness downstream the core TGF- β signaling pathway, and it may be used as a tumor-progression factor by inducing immune suppression, angiogenesis, epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased potential for metastasis. Interestingly, the cyclin D1/TGF- β double transgenic liver model in mice (Deane et al. Cancer Res. 2004; 64:1315) showed enhanced tumor formation when compared with its single transgenic littermates. Our results suggest an activation of the TGF- β signaling pathway in MCL, and point toward potential new therapeutic targets for this yet incurable lymphoma.