

Claudia Pantaleão

**Desenvolvimento de Modelos Murinos de Linfoma T para
Investigar o Impacto da Expressão Gênica Ectópica no
Comportamento *in Vivo* de Linhagens Tumorais**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. João Gustavo Pessini
Amarante-Mendes

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pantaleão, Cláudia.

Desenvolvimento de modelos murinos de linfoma T para investigar o impacto da expressão gênica ectópica no comportamento *in vivo* de linhagens celulares tumorais / Cláudia Pantaleão. -- São Paulo, 2008.

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Modelos experimentais de tumor, imunologia de tumores.

Versão do título para o inglês: Development of T lymphoma murine models to investigate the impact of ectopic gene expression in the *in vivo* behavior of tumor cell lineages.

Descritores: 1. Neoplasias 2. Modelos animais de doenças 3. Linfoma 4. Apoptose 5. Camundongos Endogâmicos 6. Linhagem celular I. Mendes, João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB193/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Claudia Pantaleão.

Título da Tese: Desenvolvimento de modelos murinos de linfoma T para investigar o impacto da expressão gênica ectópica no comportamento *in vivo* de linhagens celulares tumorais .

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Gustavo Amarante-Mendes, por ter me aceitado em seu laboratório, pela liberdade que me deu para conduzir este trabalho, pela oportunidade proporcionada do estágio no exterior e pela paciência em lidar com meu temperamento e humor.

Ao Dr. Seamus J. Martin pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante o estágio “sanduíche”.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. José Alexandre Barbuto, Dr. Niels O. Câmara e Dr. Fernando A. Soares pelas críticas e sugestões.

Ao Dr. Frederico Costa Pinto e Dr. Paulo César Maiorka, pelas sugestões, pela ajuda e incentivo na elucidação da causa da paralisia nos camundongos.

Ao Dr. Roger Chammas pelos ensinamentos científicos e pela receptividade comigo nos cursos e visitas ao seu laboratório.

Ao Prof. Luiz Vicente Rizzo e Dr. Niels O. Câmara pela descontração em meio ao dia a dia sério.

Ao técnico de histologia do Depto de Imunologia Paulo Albe, por sempre atender aos meus pedidos insistentes.

Aos meus amigos de laboratório que sempre estiveram ao meu lado, ajudando nos experimentos, nas discussões e me fazendo rir: Gabi Brumatti, Fabíola, Jackie, Ana Elisa, Moki, Janis, Marcinha, Welbert, Axel, Ricardo, Bruna, Maíra, Júlia, Maria Emília, Lucianas.

Aos técnicos do laboratório pelo auxílio e organização que permitiram que eu fizesse meus experimentos.

Ao pessoal do laboratório do Dr. Carlos Frederico Menck por ajudarem com o seqüenciamento e fotos de células e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia.

Aos alunos, funcionários e docentes do Departamento de Imunologia que, de alguma forma, participaram do meu dia a dia e ajudaram quando precisei.

Aos meus amigos Luciana, Adriana e Marcelo, a quem eu admiro há muito tempo e fazem a diferença na minha vida pessoal e profissional.

Ao meu pai, irmãos (Mau e Juninho), Lúcia, Roosevelt, Rodrigo, Karen, Paulo, Marcela, Jade e Anderson por acreditarem tanto em mim.

Ao meu marido Júnior e minha filha Gabi que, de todos, são as pessoas mais especiais para mim e que, realmente, “seguram a onda”!!!

RESUMO

Pantaleão C. Desenvolvimento de modelos murinos de linfoma t para investigar o impacto da expressão gênica ectópica no comportamento *in vivo* de linhagens tumorais [Tese de doutorado – Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Muitos estudos de câncer têm sido desenvolvidos, mas os mecanismos moleculares da tumorigênese e a resposta imune contra tumores não foi completamente elucidada. RMA é uma linhagem celular mutante derivada de RMA. Ao contrário da última, RMA é deficiente de MHC I e, portanto, é alvo de células NK. O objetivo deste trabalho foi o uso deste par de células para estabelecer modelos murinos que possam ser usados para entender a resposta imune entre células CD8 e NK contra tumor e investigar o efeito da expressão de moléculas antiapoptóticas no comportamento tumoral *in vivo*. Essa abordagem pode prover informações relevantes para o desenvolvimento de novas terapias. Para desenvolver células EGFP, foi usado um vetor retroviral bicistrônico contendo o gene *Egfp*. Para desenvolver os modelos experimentais, camundongos C57BL6 WT foram injetados iv com diferentes números de células e curvas de sobrevivência foram geradas. Os padrões de doença e infiltração tumoral foram observadas por análises macroscópica, microscópica e por detecção de EGFP em tecidos. *In vivo*, células RMA.1 induziram paralisia enquanto RMA-S.*Egfp*, ascite. RMA.*Egfp* infiltrou a medula óssea enquanto RMA-S.*Egfp*, tecidos diferentes como fígado, rins e peritônio, mas não a medula óssea. Os sinais clínicos apareceram após 15 dias da inoculação de $\geq 10^4$ células e a morte, em 30 dias. Números $\leq 10^3$ células não induziram doença nem morte, mas protegeram de ambas quando re-inoculadas 10^6 células RMA.*Egfp*. Camundongos CD4KO e CD8KO paralisaram e morreram antes do que os WT. Células RMA.*BclW.Egfp* foram mais resistentes a apoptose do que células RMA.*Egfp in vitro* e provocaram características clínicas piores: paralisia e morte anteriores, inchaço de membros e hemorragia de fígado e rins.

Palavras-chave: Neoplasia; Linfoma; Modelo Experimental; C57BL6; linhagens celulares RMA e RMA-S; BCLW; Apoptose.

ABSTRACT

Pantaleão C. Development of t lymphoma murine models to investigate the impact of ectopic gene expression in tumor cell lines behaviour *in vivo* [PhD Thesis – Immunology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Many cancer studies have been developed, however the molecular mechanisms of tumorigenesis and immune responses to tumor is not completely elucidated. RMA-S cells are a mutant lymphoma line derived from RMA cells. In contrast to the latter, RMA-S are deficient in MHC I and, therefore, are targets for NK cells. Our aims were use these pair of cells to establish mouse models that can be used to understand CD8T *vs* NK cell immune responses to tumors and investigate the effect of expression of antiapoptotic molecules in tumor behavior *in vivo*. The combination of these approaches should provide relevant information for the development of novel immunotherapy. To develop EGFP cells we used a bicistronic retroviral vector containing *Egfp* gene. To develop the experimental models, WT C57BL/6 mice were iv injected with different cell numbers and survival curves were produced. In addition, clinical features and tumor spread was observed by macroscopy, microscopy and EGFP detection of tumor cell analysis in tissues. When injected *in vivo*, RMA-*Egfp* cells induced progressive paralysis while RMA-S-*Egfp* promoted ascites. RMA-*Egfp* cells infiltrated the bone marrow, while RMA-S-*Egfp* were found in different tissues such as liver, kidney and the peritoneum cavity, but were not found in bone marrow. The symptoms appeared 15 days post injection of $\geq 10^4$ cells and the death was 30 days. Numbers of $\leq 10^3$ cells do not induced pathology or death, but protected to paralysis and death when re-injected 10^6 RMA-*Egfp* cells. CD4KO and CD8KO mice showed paralysis and death earlier than WT mice. RMA-*BclW.Egfp* cells were more resistant to apoptosis than RMA-*Egfp in vitro* and induced worse clinical features *in vivo*: earlier paralysis and death, swelling of members, haemorrhagia of liver and kidneys.

Key words: Neoplasia; Lymphoma; Experimental Model; C57BL6; RMA and RMA-S cell lines; BCLW; Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Bcl2 - *B cell lymphoma* (linfoma de célula B)
- BH1, 2 e 3 - *Bcl2 homology* (homologia com *Bcl2*)
- BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)
- CD- *Cluster of Differentiation* (Grupo de Diferenciação)
- CTL - *Cytotoxic T Lymphocytes* (Linfócitos T Citotóxicos)
- CXCR – *Chemokine Receptor* (Receptor de quimiocina)
- Cy – *Cyanine dye* (Corante Cianina)
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO- *Dimetilsulfoxido*
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxiribonucleico)
- EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic*
- EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*
- EMS – *Etilmetilsulfonato*
- FACS - *Fluorescent Activated Cell Sorting*
- FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)
- GFP – *Green Fluorescent Protein*
- H&E – *Hematoxylin and Eosin* (Hematoxilina e eosina)
- HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico)
- HFS- *Hypotonic Fluorescent Solution* (Solução Hipotônica Fluorescente)
- HTLV-1 - *Human T cell Leukemia Virus Type - 1* (Vírus tipo 1 da leucemia de célula T humana)
- ICAM-1 - *Intercellular Adhesion Molecule -1* (Molécula de Adesão Intercelular 1)
- IFN- γ - *Interferon- γ*
- IL-12 – *Interleukin-12* (Interleucina-12)
- INCA - *Instituto Nacional do Câncer*
- IRES – *Internal Ribosome Entry Site* (Sítio interno de entrada de ribossomo)
- kDa - Kilo Daltons
- KO – *Knockout* (nocauteado)
- LB - Luria Bertani
- MCS – *Multiple Cloning Site* (Sítio de Clonagem Múltipla)
- MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MMP2 – *Matrix Metaloproteinase-2* (Metaloproteinase de Matriz - 2)
NCI - *National Cancer Institute*
NK – *Natural Killer*
PBS- *Phosphate Buffered Saline*
PCR- *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia de polimerase)
PE – *Phycoeritrin* (Ficoeritrina)
PI – *Propidium Iodide* (Iodeto de Propídeo)
PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfatidil Inositol-3 Quinase)
PSGL-1 – *P-selectin Glycoprotein Ligand-1* (Glicoproteína Ligante de P-selectina)
PVDF - *Polyvinylidene Fluoride* (Difluorido Polividileno)
REAL – *Revised European American Lymphoma Classification*
RPMI – *Culture Cell Medium developed by Moore et al at Roswell Park Memorial Institute*
SBF - Soro Bovino Fetal
SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS)
TAE - *Tris Acetate EDTA*
TAP-2 - *Transporter Associated with Antigen Processing-2* (Transportador 2 Associado com Processamento de Antígeno)
TE - *Tris EDTA*
TNF - alpha - *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de necrose tumoral alpha)
VP16 – *Etoposide* (Etoposídeo)
WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)
WT – *Wild Type* (Selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Câncer	11
1.2 Modelos experimentais de tumor	11
1.3 Linfomas: histórico e características	14
1.4 Disseminação dos linfomas T	17
1.5 Modelos experimentais de linfomas	18
1.6 Resposta imunológica contra tumor e modelos experimentais para investigação deste fenômeno	19
1.7 Apoptose e modelos <i>in vivo</i> para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno	21
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Linhagens celulares e manutenção <i>in vitro</i>	28
3.2 Linhagens de camundongos	28
3.3 Plasmídeos	29
3.4 Transformações de bactérias competentes com plasmídeo retroviral	30
3.5 Purificação e quantificação de DNA plasmidial	31
3.6 Reações em cadeia de polimerase (PCR)	31
3.7 Purificações de DNA (<i>Genecloning</i>)	33
3.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição	33
3.9 Ligações de extremidades coesivas de DNA	34

3.10 Transfecção de células 293T e infecção de células RMA e RMA-S com construções retrovirais	34
3.11 Marcações de células com anticorpos	35
3.12 Curvas de proliferação celular	36
3.13 Ensaio de resistência a apoptose	36
3.14 Preparo de células tumorais para inoculação em camundongos	37
3.15 Inoculações de células tumorais em camundongos.....	37
3.16 Análises de colonização tumoral em tecidos de camundongos.....	37
3.17 Análises de proteção contra paralisia de animais inoculados com células Egfp positivas	38
3.18 Análises de superexpressão protéica por <i>Western Blot</i>	38
3.19 Análises estatísticas	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Caracterização das linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp <i>in vitro</i>	41
4.1.1 Análise de expressão de proteínas em linhagens celulares RMA, RMA-S, RMA.Egfp e RMA-S.Egfp	41
4.1.2 Proliferação celular <i>in vitro</i>	45
4.1.3 Perfil de resistência a apoptose <i>in vitro</i>	46
4.2 Desenvolvimento e caracterização dos modelos murinos de tumor.....	48
4.2.1 Análise de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp	48
4.2.2 Aspectos clínico-patológicos em camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp.....	52
4.2.3 Variações de peso de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp	57

4.2.4	Análise de infiltração tumoral em tecidos de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA. <i>Egfp</i> e RMA-S. <i>Egfp</i>	58
4.2.5	Análise de desenvolvimento de proteção contra paralisia e morte em camundongos C57BL/6 selvagens, após exposição prévia às linhagens celulares inoculadas e.v.	85
4.2.6	Análise da importância de linfócitos T CD4 e CD8 na resposta antitumoral no modelo murino de linfoma	86
4.3	Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem celular RMA transformada com o gene <i>BclW</i> .	94
4.3.1	Expressão das proteínas EGFP, MHC de classe I e BCLW na linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp</i>	94
4.3.2	Proliferação celular de RMA. <i>BclW.Egfp in vitro</i>	97
4.3.3	Perfil de resistência à apoptose da linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp in vitro</i>	98
4.4	Impacto da expressão de BCLW no modelo murino de paralisia induzido por tumor	100
4.4.1	Análise da sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp</i>	100
4.4.2	Aspectos clínico-patológicos em camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp</i>	103
4.4.3	Variações de peso de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp</i>	104
4.4.4	Análise de infiltração tumoral em tecidos de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA. <i>BclW.Egfp</i>	105
5	DISCUSSÃO	120
6	CONCLUSÕES.....	136
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Muitos esforços têm sido empregados nas últimas décadas para o entendimento do processo de tumorigênese. Uma característica indiscutível é a de que o câncer é uma doença genética e que algumas alterações fisiológicas na célula são fundamentais para que a doença se manifeste. Dentre essas alterações, Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram 6 que são consideradas essenciais na fisiologia celular e que possibilitam o crescimento tumoral. São elas: 1. autosuficiência em sinais de crescimento, 2. insensibilidade à sinais de inibição de crescimento, 3. evasão da apoptose, 4. potencial replicativo ilimitado, 5. manutenção da angiogênese e 6. invasão tecidual e metástase.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO), estimou-se que, em 2005, de um total de 58 milhões de mortes no mundo, 7,6 milhões (cerca de 13%) das mortes foram devido ao câncer. Projeta-se que este número de mortes devido ao câncer no mundo continuará crescendo, com a estimativa de 9 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram uma estimativa, para o ano de 2008 e 2009, de cerca de 460 mil casos novos de cânceres entre homens e mulheres.

A fim de facilitar o entendimento desta doença, os diversos tipos de cânceres são classificados como: Carcinomas – neoplasias originadas de tecidos epiteliais (epidermóides quando originado de epitélio de revestimento e adenocarcinomas quando originado de ductos e glândulas); Sarcomas – neoplasias originadas de tecidos conjuntivos, de preenchimento ou de sustentação; Leucemias – neoplasias originadas na medula; Linfomas – neoplasias originadas em outros tecidos linfóides.

1.2 Modelos experimentais de tumor

A fim de elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo*, modelos animais têm sido desenvolvidos nas últimas décadas. O uso de camundongos como instrumentos de estudos biológicos tem sido feito extensivamente, especialmente nas áreas de imunologia,

oncologia e genética, devido ao fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, ter suas características conhecidas e monitoradas geração após geração e pelo fato de que estes animais, além de desenvolverem tumores, compartilham similaridades genéticas, de órgãos e de fisiologia com os humanos, permitindo que múltiplas características desta doença sejam examinadas nestes modelos. Dentre algumas características, o uso de modelos murinos de tumor possibilitou a identificação de marcadores de diagnóstico precoce e novos alvos terapêuticos, o entendimento da biologia e genética do início, da promoção, da progressão e de metástases dos tumores (Hann e Balmain, 2001).

Alguns critérios são fundamentais em um modelo murino ideal de tumor e que permitem seu uso para o esclarecimento da tumorigênese. Alguns destes critérios são: origem e progressão clonal do tumor, evidências da progressão tumoral, patologia e histologia tumoral semelhantes à doença em humanos, possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores, padrões de expressão de genes e possibilidade de estudo de terapias anti-tumorais (Hann e Balmain, 2001).

Para facilitar o monitoramento dos tumores *in vivo* e aprimorar o estudo da progressão tumoral e metástases, diversos estudos têm utilizado a tecnologia de transfecção gênica de tumores com proteínas fluorescentes e detecção posterior dos tumores em modelos animais (Yang, *et al.*, 2000; Hoffman, 2001; Bouvet, *et al.*, 2002). Nessa linha, foram publicados trabalhos onde o principal foco de estudo foram os padrões fisiopatológicos de alguns tumores guiados pela expressão da proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) *in vivo*, tais como o de pulmão (Huang, *et al.*, 2002), de cérebro (MacDonald, *et al.*, 1998), de mama (Li, *et al.*, 2002) e de carcinoma de colon (Sturm, *et al.*, 2003). Outros trabalhos usaram estas técnicas de transfecção gênica com proteínas fluorescentes como o EGFP para observar micrometástase *in vivo* que não são detectadas por métodos usuais (Kaneko, *et al.*, 2001).

Muitos dos modelos para estudo do câncer são feitos através de implantes xenográficos dos tumores humanos em camundongos imunologicamente comprometidos. Alguns exemplos do uso destes modelos foram o estudo da influência do tratamento hormonal em implantes de linhagens de tumor de mama em camundongos atímicos (nude), entre outras linhagens de camundongos deficientes (Clarke, 1996); a criação de linhagem altamente tumorigênica e metastática de melanoma humano para estudo de crescimento, metástase e expressão de moléculas neste tumor em camundongo atímico (van Muijen, *et al.*, 1991) e o estudo da destruição de ossos causados pela inoculação de mieloma em camundongos SCID (Roodman, 1997). Entretanto, há duas desvantagens principais no uso deste tipo de modelo: a)

não permite o estudo do desenvolvimento do câncer e b) o câncer é basicamente tratado como uma doença das células cancerígenas sozinhas, mais do que da interação do tumor com o hospedeiro (Klausner, 1999).

O entendimento biológico de que o câncer é uma doença genética e de que o comportamento alterado da célula cancerígena se deve a alterações genéticas e epigenéticas complexas, levou ao desenvolvimento de modelos experimentais mais sofisticados, onde os camundongos foram geneticamente manipulados para expressar ou não determinadas moléculas, como superexpressão de oncogenes ou inibição de genes supressores de tumor e, em resposta a isso, os animais desenvolveram tumores. A superexpressão de oncogenes está relacionada a indução de tumores como mostrou, por exemplo, o trabalho de Arbeit e colaboradores (1993), onde camundongos modificados e que superexpressavam os genes *E6* e *E7* do HPV (*Human Papiloma Virus*) apresentou carcinogênese de células neuroepiteliais e tumores de cérebro entre 4 e 10 meses de idade. A superexpressão de oncogenes em camundongos geneticamente modificados é uma abordagem discutida por não mimetizar os estágios iniciais do desenvolvimento do câncer, porém isso não exclui a possibilidade de que os eventos moleculares e celulares subsequentes nestes modelos possam ser importantes para desvendar questões relacionadas a biologia dos tumores. A inibição de genes supressores de tumor também é associada ao aparecimento de tumores e é considerada menos artificial como modelo experimental, pois o que ocorre na doença em humanos é a perda de função destes genes. Um exemplo deste tipo de modelo experimental foi o desenvolvimento de camundongos heterozigotos e deficientes do gene *p53*. Nestes modelos, o desenvolvimento de tumores ocorre aos 18 meses em camundongos heterozigotos e em 4 meses e meio nos deficientes (Donehower, 1996).

Contudo, atualmente se sabe que as modificações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer muitas vezes requerem mais de uma alteração que não somente a expressão de oncogenes ou a perda de função de genes supressores de tumor. Para esclarecer a contribuição de outras alterações nesta doença, diversos modelos superexpressam ou nocauteiam mais de um gene envolvido no aparecimento desta doença. Um exemplo é o trabalho de Johnson e colaboradores (2001) que desenvolveram linhagens de camundongos que carregam o alelo do gene *K-ras* que pode ser ativado por recombinação espontânea em todo o animal e resultam no aparecimento de diversos tumores, dentre eles no pulmão. Ao nocautear o gene *p53*, observado também em tumores humanos com mutação de *K-ras*, os autores caracterizaram um modelo experimental mais agressivo do que o anterior.

Mais recentemente, os modelos experimentais de câncer ficaram ainda mais sofisticados e permitem expressar oncogenes de maneira condicional, possibilitando a expressão ou reversão da expressão do gene (sistemas *Cre-loxP*, Tet-On). Dessa forma, descobriu-se que a expressão contínua do gene é necessária para a manutenção do tumor em alguns casos, suportando a idéia de que seriam bons alvos terapêuticos (ver revisões Hann e Balmain, 2001; Resor, *et al.*, 2001). Ou ainda, foi possível analisar o impacto da expressão de determinado gene que causaria mortalidade do embrião, como ocorre com a expressão de *Bcl2-abl*, cuja atividade tirosina-quinase é tóxica durante o desenvolvimento. Para evitar este problema, o gene *Bcr-abl* foi expresso condicionalmente somente em células da medula óssea e em diferentes níveis de expressão (Bernardi, *et al.*, 2002; Ren, 2003).

1.3 Linfomas: histórico e características

Os linfomas são doenças neoplásicas hematológicas que acometem células das linhagens mielóides e linfóides. As neoplasias linfóides podem se originar de células imaturas ou maduras das linhagens T, B e NK e as características clínicas e morfológicas são bastante variadas (Zago, *et al.*, 2001).

Como a variedade de linhagens de células do sistema imunológico é grande, bem como variam os graus de diferenciação e de proliferação celulares, a caracterização apropriada de doenças como os linfomas pelo critério clássico baseado na morfologia celular é complexa e difícil. Segundo Matasar e Zelenetz (2008), do artigo original publicado por Thomas Hodgkin, em 1832, até os dias de hoje uma multiplicidade de entidades clínicas foram nomeadas e descritas com linguagem variada e imprecisa. Historicamente, os linfomas foram classificados baseados principalmente na aparência histológica do crescimento tumoral, no tamanho das células e no imunofenótipo B, T, NK ou null (Jakic-Razumovic e Aurer, 2002). De acordo com Rosenberg (1994), Lukes e Collins, numa publicação de 1974, foram os primeiros a propor que os linfomas fossem classificados em duas categorias básicas: originados de linfócitos T ou B. Em 1982, o *National Cancer Institute* (NCI), publicou um estudo (*Working Formulation*) que visava resolver controvérsias na classificação dos linfomas e que foi amplamente aceito por ser de fácil entendimento. Basicamente, esse estudo foi usado como uma classificação histopatológica que facilitava as previsões de sobrevivência e curabilidade dos pacientes, desconsiderando dados clínicos importantes, como os sintomas sistêmicos, por exemplo (Rosenberg, 1994; Pileri, *et al.*, 1998). Uma atualização desta

classificação foi a de Kiel que, apesar de mais refinada do que a publicada pelo NCI devido a orientação imunológica, apresentava algumas limitações como ausência dos linfomas extranodais (cerca de 40% de todas as neoplasias linfóides), definição de agressividade baseada apenas em aspectos morfológicos e pouca reproducibilidade para algumas categorias (Pileri, *et al.*, 1998). Com o avanço das metodologias de uso de anticorpos para identificar subpopulações e estados de diferenciação de células do sistema imune, a classificação desta doença ficou cada vez mais detalhada e complexa. Um trabalho importante que mostrou os avanços desta área na época e propôs uma nova classificação das categorias de linfomas conhecidas até o momento, foi o de Nancy L. Harris e colaboradores (1994) – *REAL classification* -, derivado de um encontro de um grupo internacional de estudo de linfomas (*International Lymphoma Study Group*). Esta revisão apresentou uma lista das categorias dos linfomas reconhecidas na época, resumindo os aspectos morfológicos, imunológicos, genéticos, apresentação e curso da doença para cada uma das categorias, cujo princípio foi fazer uma classificação “real” de entidades desta doença claramente caracterizadas anatomicamente e clinicamente, evitando conflitos do entendimento da doença entre as escolas americanas e européias. Além disso, o trabalho ainda sugeriu que algumas categorias não se encaixariam em nenhuma das listadas, refletindo o fato de não se conhecer todos os aspectos desta doença e do sistema imune. Em 1997, Harris e colaboradores publicaram uma atualização da classificação de doenças neoplásicas hematológicas feita pela Organização Mundial de Saúde (*WHO classification*) e que até hoje é amplamente utilizada. Trata-se de uma classificação baseada na *REAL classification* e que reconhece os linfomas como neoplasias de linfócitos B, T e de células NK e doença de Hodgkin.

Dentro das neoplasias linfóides o sistema WHO divide os linfomas como linfomas Hodgkin quando há a presença de um tipo de célula chamada Reed-Sternberg (Kuppers, *et al.*, 1994) e Linfomas não-Hodgkin, os quais incluem uma série de grupos diversos de cânceres de células do sistema imune e a classificação é baseada não só em aspectos morfológicos e imunológicos, como feito na doença de Hodgkin, mas baseada também em estágio de diferenciação, características fenotípicas, genotípicas e clínicas.

Os linfomas não-Hodgkin são subdivididos de acordo com a taxa de crescimento tumoral: indolentes (crescimento lento) e agressivos (crescimento rápido). Os linfomas Hodgkin indolentes são associados à sobrevivência medida em anos, independentes de quaisquer terapias utilizadas e as apresentações clínicas são variadas: doença sistêmica e com manifestações leucêmicas; com apresentação primária extranodal que se mantém localizada por muito tempo ou com apresentação nodal e envolvimento amplo do sistema imune (Pileri,

et al., 2000). Os linfomas Hodgkin agressivos apresentam uma sobrevivência de apenas algumas semanas ou meses, se não tratados adequadamente, e podem se apresentar também como doença primariamente sistêmica, extranodal, nodal ou leucêmica, associadas ao rápido crescimento de massas tumorais e sintomas sistêmicos (Pileri, *et al.*, 2000). Os dois subtipos de doença ocorrem tanto em crianças quanto em adultos e se comportam e respondem diferentemente aos tratamentos. O prognóstico e o tratamento destas doenças dependem do estágio e do tipo de câncer (Rogers, 2006).

Com citado anteriormente, os linfomas do tipo não-Hodgkin podem ser provenientes de células B, de células T ou de células NK, dependendo da linhagem linfóide que deu origem à neoplasia. As neoplasias de células B e T são divididas em precursoras (Linfomas linfoblásticos) e maduras (periféricas). De acordo com a principal apresentação clínica, as neoplasias de células B e T podem ser agrupadas como: predominantemente disseminada (leucêmica), doença primariamente extranodal e doença predominantemente nodal (Harris, *et al.*, 1997; Jakic-Razumovic e Aurer, 2002). As neoplasias originadas a partir de células NK são incomuns e heterogêneas e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, as neoplasias de células maduras são divididas em 2 tipos: a) linfoma extranodal de células NK, tipo nasal e b) leucemia agressiva de células NK.

Algumas características clinicopatológicas associadas a essa doença são: presença de compressão da medula espinhal, infiltrações na medula óssea, metástases no fígado, no baço, linfonodos e timo. A compressão da medula espinhal é uma manifestação primária incomum deste tipo de Linfoma, ocorrendo em menos de 5% dos casos diagnosticados e é considerada uma doença agressiva (Epelbaum, *et al.*, 1986). Os pacientes relatam sentir dor nas costas, apresentam disfunções motoras e distúrbios de esfíncter e bexiga. O envolvimento da medula espinhal ocorre tanto nas neoplasias originadas de células B quanto originadas de células T e podem comprometer a região torácica (MacDonald, *et al.*, 1999) ou regiões lombares. Não há uma característica única no comprometimento da medula espinhal e é descrito padrões de envolvimento da medula óssea, com infiltrações difusas, fratura de vértebras, formação de massa tumoral paraespinhal, infiltrações epidurais, onde ocorre o acúmulo de células tumorais acima da dura-máter, no espaço extradural (Miyakoshi, *et al.*, 2003) e, mais raramente, ocorrendo na região subdural ou dentro da medula óssea (Vanneuille, *et al.*, 2000). Os linfomas não-Hodgkin apresentam alta incidência de envolvimento da medula óssea no diagnóstico (McKenna e Hernandez, 1988). O comprometimento do fígado é frequente em neoplasias malignas hematológicas, porém é raro resultar em disfunção do órgão (Lettieri e Berg, 2003; Kanbay, *et al.*, 2004). Apesar do baço ser frequentemente envolvido nos

Linfomas não-Hodgkin disseminados, a apresentação inicial da neoplasia neste órgão é incomum (Brox e Shustik, 1993).

Os linfomas não Hodgkin de células T são neoplasias que representam cerca de 12% de todos os linfomas. Normalmente apresentam-se como doenças extranodais e sabe-se haver associação com translocações cromossômicas específicas e infecções virais (Rizvi, *et al.*, 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, são reconhecidos 9 tipos de linfomas T periféricos, os quais são clinicopatologicamente distintos, além do linfoma T de células precursoras (linfomas linfoblásticos).

1.4 Disseminação dos linfomas T

A maioria dos linfomas T maduros são derivados de linhagens de células de memória (CD45RO⁺) e são designados linfomas de células T periféricos e as neoplasias de precursores de células T são designados como centrais (derivados de timócitos). Algumas moléculas de adesão e receptores de quimiocinas estão relacionadas a migração dos linfomas de células T, tais como: L-selectina e alpha4beta7 que são expressas por linfomas de células T periféricas e alphaLbeta2 (LFA-1), alpha4beta1 (VLA-4), CXCR4 e CXCR5 que são expressas por um amplo espectro de linfomas de células T (Pals, *et al.*, 2008). A L-selectina e CXCR5 são relacionadas a *homing* de linfomas para linfonodos periféricos, alpha4beta7 para o intestino, LFA-1 para múltiplos locais, VLA-4 para a medula óssea e o receptor de quimiocina 4 (CXCR4) está envolvido no *homing* de linfócitos e tumores hematopoéticos para tecidos linfóides secundários e para a medula óssea (Wang, *et al.*, 2006; Burger e Burkle, 2007; Pals, *et al.*, 2008).

Os precursores da linhagem de linfócitos T são capazes de migrar para o timo por apresentarem na superfície celular o padrão LIN⁻ SCA-1⁺ C-KIT⁺ CD25⁻ CD44⁺, além da glicoproteína ligante de P-selectina – PSGL-1 (Rolink, *et al.*, 2006; Wu, 2006).

A maioria dos linfomas não Hodgkin expressa CD44 assim como os linfócitos normais. A molécula CD44 é um ligante de E-selectina expressa em precursores hematopoéticos e que é associada a *homing* tanto de linfócitos imaturos para a medula óssea (Khalidoyanidi, *et al.*, 1996; Vermeulen, *et al.*, 1998; Dimitroff, *et al.*, 2001) como nas metástases de linfomas (Roos, 1991). Esse gene consiste de 20 exons, dos quais 10 são normalmente expressos por células hematopoiéticas. Os outros 10 exons são expressos por *splicing* alternativo, gerando um grande número de produtos diferentes – as isoformas

variantes de CD44 (Günthert, 1993). Essas variantes são associadas a capacidade metastática *in vivo* de diversos tipos de tumores (Tanabe e Saya, 1994). A variante de CD44 que contém um domínio codificado pelo exon v6 é superexpressa em linfomas não Hodgkin agressivos (Pals, et al., 1993) e carcinomas renais (Terpe, *et al.*, 1996). Neste último é descrito que há superexpressão da variante v9 também (Terpe, *et al.*, 1996).

1.5 Modelos experimentais de linfomas

O estudo dos linfomas em modelos animais elucidaram diversos aspectos da tumorigênese dessa doença. Uma delas foi a função das proteínas virais na transformação celular como é o caso da infecção pelo vírus tipo 1 da leucemia de célula T humana (*Human T Cell Leukemia Virus Type 1 - HTLV-1*) que induz leucemias e linfoma associado ao HTLV-1 (Lairmore, *et al.*, 2005). Nesse caso, a proteína viral Tax parece ser a responsável pelas alterações nas vias de sinalização intracelulares que levam a transformação tumoral (Hasegawa, *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2007). O gene *E2a*, por exemplo, era conhecido por sua atividade supressora de tumor, uma vez que camundongos deficientes deste gene apresentam linfoma T. Em um trabalho de Mikkers e colaboradores (2002), foi mostrado que este gene possui característica oncogênica em determinadas situações, como quando há superexpressão de *c-myc* concomitante.

Outro aspecto elucidado em modelos animais de linfoma foi o de metástase. A capacidade da célula tumoral se ligar ao endotélio é um mecanismo essencial para a disseminação do tumor, mas também o crescimento tumoral é um evento que ocorre após a localização ou *homing* do tumor no órgão alvo (Aoudjit, *et al.*, 1998a). Nesse sentido foram realizados também trabalhos com camundongos deficientes da molécula de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule -1*), a qual parece ser essencial para permitir o crescimento de metástases no fígado, baço e rins (Aoudjit, *et al.*, 1998b).

Em outros casos, alguns modelos de linfoma são induzidos em camundongos para investigar aspectos da patogênese da doença, do imunofenótipo das células tumorais e a disseminação das mesmas *in vivo*, como é o caso de um modelo de linfoma extranodal do tipo nasal de células NK/T que foi implantado em camundongos atímicos e que revelou aspectos histológicos semelhantes ao da doença em humanos, possibilitando que este modelo seja utilizado para outros estudos a cerca desta doença (Zhao, *et al.*, 2007).

1.6 Resposta imunológica contra tumor e modelos experimentais para investigação deste fenômeno

Um dos conceitos atualmente prevalentes a respeito da resposta imune contra tumores é o de edição imunológica dos tumores (*immunoediting*). A edição imunológica no câncer é um processo que consiste de 3 fases: a fase de eliminação do tumor (vigilância imunológica contra o câncer), a fase de equilíbrio e a fase de escape e consequente crescimento tumoral (Dunn, *et al.*, 2004; Malmberg e Ljunggren, 2006).

Na vigilância imunológica (*immunosurveillance*) os sistemas imunes inato e adquirido do hospedeiro seriam capazes de reconhecer e erradicar uma porcentagem significativa das células transformadas. Corroborando este conceito, estudos mostraram que deficiências de INF- γ e perforina aumentavam a susceptibilidade aos tumores induzidos quimicamente e aos espontâneos. A participação de células NK também foi mostrada em estudos de camundongos depletados desta população com o uso de anticorpos e estes foram mais susceptíveis ao aparecimento de tumores induzidos quimicamente em comparação aos animais controles. Além disso, tumores induzidos quimicamente ou os espontâneos em camundongos deficientes da enzima RAG, sem a qual os animais apresentam ausência de desenvolvimento de linfócitos maduros, surgiram em alta frequência e mais rapidamente do que em animais controles. Portanto, os linfócitos protegeram os animais contra tumores. (Dunn, *et al.*, 2004).

Apesar dos mecanismos descritos acima, algumas células tumorais são capazes de resistir à pressão exercida pela vigilância imunológica. É hipotetizado que exista uma fase anterior à fase de detecção clínica da doença maligna, a qual é conhecida como fase de equilíbrio. Nessa fase, enquanto as células tumorais parentais foram destruídas, algumas variantes surgem com mutações que conferem resistência ao ataque do sistema imune do hospedeiro.

Na fase do escape, as células tumorais que sobreviveram à fase de equilíbrio do processo de edição imunológica crescem no hospedeiro sem a pressão do sistema imune e são consideradas células tumorais editadas. Para escaparem a esta pressão, alguns tumores perdem a expressão de moléculas de MHC de classe I e, assim, escapam ao ataque de linfócitos citotóxicos restritos a apresentação de antígenos no contexto do MHC. Outra alteração observada nos tumores editados é a secreção de citocinas imunossupressoras que inibem as respostas imunes do hospedeiro (Dunn, *et al.*, 2004).

Utilizando células de Linfoma T murino alguns trabalhos elucidaram as funções de células do sistema imune nas repostas contra tumores. É o caso da teoria do “*missing self*” que sugeriu que as células NK são células efetoras capazes de reconhecer e matar tumores que não expressam MHC de classe I na superfície (Karre, *et al.*, 1986). Células tumorais que apresentam este defeito são frequentemente encontradas em cânceres humanos e são capazes de escapar do reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos restritos a apresentação de antígenos na molécula de MHC de classe I. A expressão de antígenos de MHC de classe I em tumores, no entanto, não estão sempre associados à susceptibilidade ao ataque pelos linfócitos T citotóxicos (CTL), isso porque pode ocorrer, por exemplo, ausência de peptídeos derivados de antígenos tumorais ou a coexpressão de moléculas imunossupressoras (Chang, *et al.*, 2004).

No trabalho citado anteriormente de Karre e colaboradores (1986), o mecanismo de ataque de células NK contra tumores foi realizado utilizando-se duas linhagens celulares chamadas RMA e RMA-S. Em 1985, os autores geraram estas células em um estudo que visava obter linhagens tumorais que não expressassem moléculas de MHC de classe I na superfície, a fim de observar os mecanismos de vigilância imunológica no caso de tumores que escapavam do ataque de linfócitos citotóxicos. Para isso, os autores induziram mutações genéticas na linhagem celular RBL-5 (linfoma T induzido por vírus Rauscher), as quais foram posteriormente selecionadas de acordo com a expressão ou não da molécula de MHC de classe I na superfície. As células que não foram selecionadas com anticorpos e complemento receberam o nome de RMA e as que foram selecionadas a expressar baixos níveis de MHC de classe I na superfície, receberam o nome de RMA-S. Posteriormente, descobriu-se que uma das mutações ocorridas nesta última linhagem era a deficiência da molécula transportadora de proteínas citoplasmáticas para o retículo endoplasmático – TAP2 (*Transporter Associated with Antigen Processing-2*) (Powis, *et al.*, 1991; Attaya, *et al.*, 1992; Yang, *et al.*, 1992). A formação do complexo MHC classe I e peptídeo é iniciado no retículo endoplasmático. O peptídeo degradado pelo proteossomo é levado do citosol para dentro do retículo endoplasmático pelas moléculas transportadoras TAP 1 e 2 (Kleijmeer, *et al.*, 1992) e estabilizam a molécula de MHC classe I ao se ligar a esta. Após a formação do complexo, este é expresso na superfície celular para que os peptídeos citossólicos sejam apresentados aos linfócitos T CD8 (Towsend e Bodmer, 1989) e, com isso, possa haver o reconhecimento de moléculas próprias ou não. Com a ausência da molécula TAP2, os peptídeos citoplasmáticos não são transportados para o interior do retículo endoplasmático e não se ligam a molécula de MHC classe I, a qual não fica estável para ser expressa na superfície celular. Dessa forma, a linhagem RMA-S praticamente não expressa esta molécula na superfície celular e não é

reconhecida por linfócitos T citotóxicos. Outra diferença entre estas duas linhagens celulares foi descrita recentemente por Sabapathy e Nam (2008) que é a ausência da molécula p53 no compartimento nuclear de células RMA-S, encontrando-se acumulada no compartimento citossólico. Esta molécula supressora de tumor é conhecida como “guardiã do genoma” pela habilidade em parar o ciclo celular de células que sofreram algum tipo de dano ao DNA (Lane, 1992) ou induzir a morte por apoptose. Em resposta a sinais de estresse, p53 é ativado e migra para o núcleo da célula, onde se liga a sequências responsivas no genoma e transcreve inúmeros genes, dentre eles vários relacionados a indução de morte por apoptose (Levine, *et al.*, 2006; Aylon e Oren, 2007). Dessa forma, a linhagem RMA-S se torna mais resistente a indução de morte por estresse extríntrico ou intríntrico por não ter a translocação de p53 do citosol para o núcleo quando ocorrem danos a célula.

Utilizando-se as duas linhagens tumorais descritas acima, alguns mecanismos de ação efetora das células NK contra tumores foram elucidados, bem como outros aspectos como a importância da interleucina 12 (IL-12) na imunidade inata (células NK) e na imunidade adquirida (linfócitos T citotóxicos - CTLs) para o ataque aos tumores RMA e RMA-S *in vivo* (Grufman e Karre, 2000).

Outros trabalhos procuraram desvendar as respostas imunes contra tumores em modelos animais, como por exemplo, o trabalho de Humblet e colaboradores (1997) que mostraram que camundongos irradiados letalmente desenvolviam linfomas de células do timo após cerca de um ano. Se fosse feito enxerto nestes animais com células normais da medula óssea após 2 ou 10 dias da irradiação, os animais eram protegidos do aparecimento de linfoma, mas o mesmo não ocorria após 15 e 30 dias da irradiação. Esse trabalho mostrou que as células pré-tumorais sofriam alterações intríntricas que resultavam na resistência ao ataque pelas células da medula óssea que haviam sido enxertadas, além de mostrar as fases de eliminação, equilíbrio e de escape tumoral descrito no início deste item.

1.7 Apoptose e modelos *in vivo* para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno

A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico essencial para a eliminação de células em excesso ou que não são mais necessárias para o organismo, atuando na homeostase dos tecidos. Por outro lado, esse fenômeno também está envolvido em condições patológicas.

Os aspectos que caracterizam a morte celular programada são divididos em morfológicos, dentre os quais observam-se: redução do volume celular, condensação da cromatina, clivagem de DNA e fragmentação da célula em corpos apoptóticos, os quais são reconhecidos e fagocitados rapidamente por fagócitos, sem ocasionar resposta imunológica e aspectos moleculares, tais como: liberação de citocromo c da mitocôndria, ativação de caspases, as quais clivam diversos substratos celulares, levando a células a morte. Devido à dificuldade e controvérsias em torno da definição de apoptose, usa-se comumente a definição deste fenômeno como o decorrente de ativação de vias bioquímicas dentro das células, ou seja, ativação de proteínas denominadas caspases. (Amarante-Mendes e Green, 1999). As caspases são proteases que possuem cisteína em seu sítio ativo que reconhecem e clivam especificamente resíduos de aspartato em outras proteínas (Thornberry e Lazebnik, 1998). A ativação das caspases ocorre por duas vias principais: uma via extrínica, mediada por receptor na membrana celular e inicia a apoptose por ativação de caspase 8 e por uma via intrínica, mediada pela liberação de citocromo c da mitocôndria e inicia a apoptose através da ativação de caspase 3. A ligação a receptores na superfície celular, como FAS ou TNF, promovem a ativação de caspase 8, a qual ativa caspase 3 diretamente ou cliva membros pró-apoptóticos da família BCL2 que promovem a liberação de citocromo c da mitocôndria. Na mitocôndria, a liberação de citocromo c é regulada pelos membros da família BCL2 que possui proteínas pró e anti-apoptóticas. Em resposta a estresse, membros pró-apoptóticos dessa família são translocados do citoplasma para a mitocôndria, onde promovem a liberação do citocromo c. No citoplasma, o citocromo c ativa caspase 9 que, por sua vez, ativa caspase 3 e, assim, inicia-se a clivagem de substratos específicos que resultam nos aspectos morfológicos e bioquímicos da morte celular (Zimmermann, *et al.*, 2001). Os membros anti-apoptóticos da família BCL2 (BCL2, BCLXL e BCLW) atuam, predominantemente, prevenindo que os membros pró-apoptóticos BAX e BAK se liguem e perturbem a integridade de membranas intracelulares, em particular a membrana externa das mitocôndrias, ocasionando liberação de citocromo c e morte celular (Adams e Cory, 2007). Essas moléculas são considerados potencialmente oncogênicas. A proteína BCL2, por exemplo, é originada da translocação entre os cromossomos 14 e 18 e foi descoberta em linfoma folicular humano (Tsujimoto, *et al.*, 1984). Apesar de mutações únicas em genes anti-apoptóticos desta família serem eventos raros em neoplasias, essas mutações podem ser associadas indiretamente ao aumento de expressão das mesmas, como por exemplo, a ativação da via de NF- κ B em neoplasias, levando a ativação de *Bclxl* e *AI* (Cory, *et al.*, 2003).

A proteína BCLW possui estrutura muito similar as de BCL2 e BCLXL, cuja principal característica é a presença de domínios denominados BH (*Bcl2 homology*) (Cory, *et al.*, 2003; Petros, *et al.*, 2004). Essa molécula é encontrada na forma ativa fracamente ligada a membrana mitocondrial e sequestra membros pró-apoptóticos, impedindo a liberação de citocromo c. Em resposta a estímulos apoptogênicos, a proteína BIM se liga a BCLW, inserindo-a na membrana mitocondrial e, desta forma, impossibilitando o sequestro dos membros pró-apoptóticos (Kaufmann, *et al.*, 2004). É descrito que BCLW protege células da morte frente a um amplo espectro de insultos citotóxicos, incluindo privação de citocinas, irradiação com raios gama e UV e drogas quimioterápicas (ver Huang, *et al.*, 1997). Esta molécula é encontrada em diversos tecidos como cólon, cérebro, testículos, células mielóides, linfóides e epiteliais (O'Reilly, *et al.*, 2001). Apesar de se assemelhar estruturalmente a outros membros anti-apoptóticos com funções descritas na tumorigênese, pouco é descrito a respeito do envolvimento desta molécula no fenômeno de tumorigênese e progressão tumoral.

Sabe-se que os modelos murinos são sistemas valiosos para a análise experimental de oncogenes *in vivo*, bem como para a identificação de alvos farmacológicos do câncer e para avaliar terapias anti-tumorais.

Nesse sentido, alguns trabalhos mostraram a função de algumas moléculas no comportamento dos tumores *in vivo* quando superexpressadas em células tumorais. Por exemplo, a molécula SSC-S2 (também conhecida como proteína 8 induzida por TNF-alpha - TNFAIP8) caracterizada como molécula anti-apoptótica e oncogene teve sua função *in vivo* elucidada pelo trabalho de Zhang e colaboradores (2006). Neste trabalho, a superexpressão desta molécula em células de câncer de mama foi associada ao aumento da frequência de colonização tumoral no pulmão, mostrando uma nova função desta molécula na progressão tumoral e alvo potencial na terapia anti-tumoral.

Os membros da família BCL2 tem sido associados a patogênese da várias neoplasias hematológicas, incluindo linfoma folicular não-Hodgkin. Foi descrito que a superexpressão de BCL2 em camundongos transgênicos induz o desenvolvimento de hiperplasia linfóide e esplenomegalia (Mcdonnell, *et al.*, 1989). Outro trabalho mostrou que a superexpressão de BCL2 em células de melanoma aumentou a atividade de proteinases relacionadas a metástase e o crescimento tumoral *in vivo*, mostrando a função crucial desta molécula no fenótipo invasivo e na progressão tumoral (Trisciuglio, *et al.*, 2005). Além disso,

Como citado anteriormente, apesar de apresentar características interessantes quando analisadas *in vitro*, a participação e a função da molécula BCLW na progressão tumoral *in vivo* foi pouco investigada até o momento. De acordo com alguns estudos, a

participação de BCLW foi mostrada de forma indireta na progressão tumoral *in vivo* no trabalho de Oltersdorf e colaboradores (2005), onde o uso de ABT-737 (quimioterápico que inibe as moléculas antiapoptóticas BCLW, BCL2 e BCLXL) em modelos animais de tumores induziu a regressão dos tumores e aumentou a sobrevivência dos animais, mostrando assim uma possível participação de BCLW no estabelecimento de tumores *in vivo*. Além disso, é descrito que a superexpressão de BCLW em linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico promove aumento de invasividade por aumentar a expressão MMP2 pelas vias de PI3K, AKT e Sp1 (Bae, *et al.*, 2006). Camundongos knockouts de BCLW são estéreis por apresentarem espermatogênese alterada (Russell, *et al.*, 2001), porém, nenhuma outra anormalidade foi observada em outros tecidos, mostrando que talvez esta molécula tenha função redundante (Print, *et al.*, 1998). Saber se esta molécula pode alterar a progressão tumoral *in vivo* permanece obscuro e a elucidação da participação na progressão tumoral pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias contra tumor.

Visto a importância dos estudos de tumorigênese e respostas imunes contra o câncer e a possibilidade de investigar a participação de moléculas anti-apoptóticas na progressão tumoral *in vivo*, a proposta deste trabalho foi desenvolver modelos murinos de linfomas T que poderão servir como plataformas para estudos de tumorigênese, respostas imunes anti-tumorais, investigação de expressão ectópica de moléculas anti-apoptóticas e imunoterapias contra tumores.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver modelos murinos de linfoma T em camundongos C57BL6, nos quais linhagens celulares estabelecidas e que expressam ou não a molécula de MHC classe I, sejam modificadas geneticamente para permitir a superexpressão da proteína fluorescente EGFP e, assim, serem monitoradas *in vivo*.

2. Caracterizar as doenças, infiltração tumoral e padrões de sobrevivência induzidas pelas linhagens tumorais em camundongos C57BL6.

3. Verificar o efeito da expressão ectópica da molécula anti-apoptótica BCLW no comportamento da linhagem tumoral RMA *in vivo* em relação a doença induzida, padrão de infiltração tumoral e na sobrevivência de camundongos C57BL6.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em 16.09.2005 e o protocolo foi registrado sob o nº 073.

3.1 Linhagens celulares e manutenção *in vitro*

Foram utilizadas linhagens celulares RMA e RMA-S, as quais são caracterizadas como linfomas T de origem de camundongo da linhagem C57BL/6. A linhagem RMA expressa MHC de classe I (H-2Db) na superfície celular e, ao contrário, a linhagem RMA-S não expressa esta molécula devido a uma deficiência da molécula TAP2, o que impossibilita a estabilidade do complexo MHC de classe I com peptídeos intracelulares, impedindo sua expressão na superfície celular.

Construções retrovirais que continham os plasmídeos pMX.IRES.Egfp ou pMX.BclW.IRES.Egfp foram utilizados para gerar três novas linhagens celulares, as quais foram denominadas RMA.Egfp, RMA-S.Egfp e RMA.BclW.Egfp.

A manutenção das culturas celulares foi feita com meio RPMI 1640 (Gibco BRL), suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco BRL), 2 mM glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml streptomicina, em estufa umidificada, com 5% de CO₂, à 37 °C.

3.2 Linhagens de camundongos

Neste trabalho utilizamos camundongos singênicos, fêmeas, com idade entre 6-12 semanas, das linhagens C57BL/6 selvagens, C57BL/6 CD4KO (deficientes de linfócitos T CD4⁺), C57BL/6 CD8KO (deficientes de linfócitos T CD8⁺), provenientes do Biotério de criação do Departamento de Imunologia, ICB-USP. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Imunologia, ICB IV-USP, nas seguintes condições: luz - períodos de 12 horas claras e 12 horas escuras, ração e água – *ad libitum*.

3.3 Plasmídeos

O plasmídeo retroviral utilizado como carregador do gene que codifica a proteína fluorescente EGFP é denominado pMX-IRES.*Egfp* e o mapa está ilustrado na figura 1. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA. USA).

O gene *Egfp* foi modificado a partir do gene *Gfp* (clonado da água-viva *Aequorea victoria*), com o intuito de fluorescer ainda mais do que o segundo gene. O primeiro gene tem um brilho 35 vezes mais intenso do que o segundo e é muito utilizado como marcador de expressão gênica, em diversos campos de pesquisa (Zhang, *et al.*, 1996). A sequência IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) foi derivada do vírus da encefalomielite murina (ECMV). Esta sequência permite que a menor unidade do ribossomo se ligue ao RNA mensageiro a partir do meio da molécula e não da extremidade 5', traduzindo a porção localizada abaixo desta sequência (Martinez-Salas, 1999).

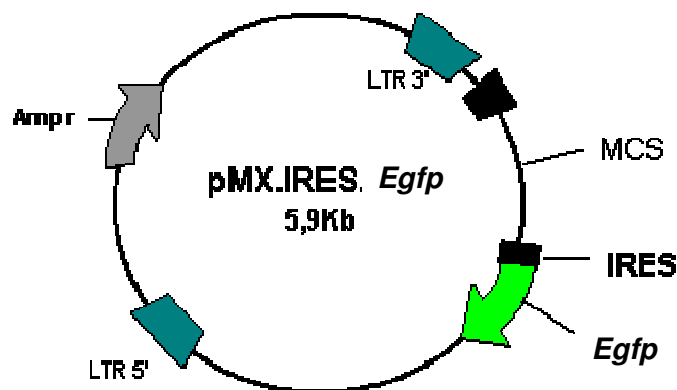


Figura 1. Mapa do vetor retroviral pMX.IRES.Egfp. Este vetor contém o elemento IRES entre o MCS (Multiple Cloning Site) e o gene Egfp, permitindo a transcrição concomitante de um gene clonado no MCS e do gene Egfp. O tamanho do vetor é de 5,9 Kb e contém também um gene que confere resistência a ampicilina (Amp^r).

O plasmídeo pMX.*BclW*.IRES.*EGFP* (Fig.2) foi construído através da clonagem do gene humano *BclW* no vetor pMX.IRES.*EGFP* durante o estágio no Laboratório do Dr. Seamus J. Martin, Trinity College, Dublin, Ireland. Outros genes humanos como *Bclxl*, *Ciap1*, *Ciap2* e *Xiap* foram clonados. Os plasmídeos de onde estes genes foram retirados foram: pCDNA3.*BclW*, pCDNA3.*Bclxl*, pCDNA3.myc.*Ciap1*, pCDNA3.myc.*Ciap2* e pCDNA3.*Xiap*.myc.

O vetor pMX.IRES.*egfp* foi utilizado como vetor para clonagem dos genes relacionados à apoptose mencionados acima, gerando os seguintes vetores recombinantes: pMX.*BclW*.IRES.*Egfp*, pMX.*Bclxl*.IRES.*Egfp*, pMX.*Ciap1*.IRES.*Egfp*, pMX.*Ciap2*.IRES.*Egfp* e pMX.*Xiap*.IRES.*Egfp*.

Estes plasmídeos foram amplificados em bactérias e purificados para posterior infecção das linhagens celulares RMA e RMA-S com a construção retroviral (descrito no item abaixo).

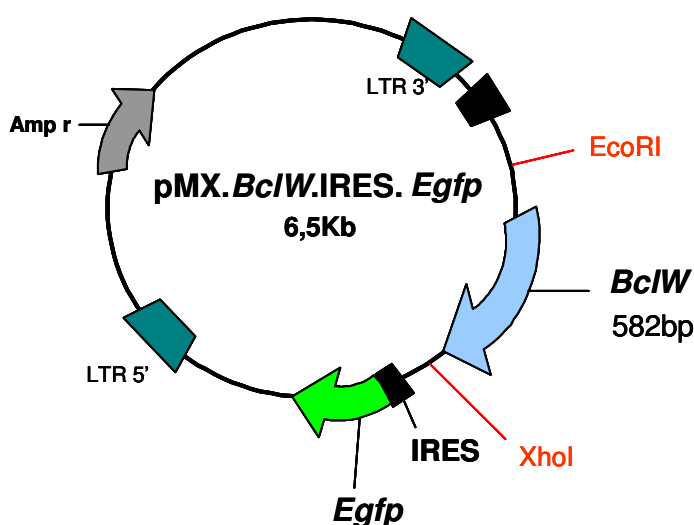


Figura 2. Mapa do vetor retroviral pMX.*BclW*.IRES.*Egfp*. O gene *BclW* (582pb) foi clonado no MCS do vetor pMX.IRES.*Egfp* e o tamanho do novo vetor é de 6,5 Kb. Este vetor contém o elemento IRES entre o gene *BclW* e o gene *Egfp*, permitindo a transcrição concomitante das proteínas BCLW e de EGFP. O vetor também contém um gene que confere resistência à ampicilina.

3.4 Transformações de bactérias competentes com plasmídeo retroviral

Para a amplificação e manutenção do plasmídeo, células competentes da linhagem bacteriana DH10B foram transformadas da seguinte maneira: uma colônia de bactérias DH10B, crescida em placa LB ágar (Luria Bertani) sem antibiótico, foi inoculada em meio líquido SOB, sob agitação constante, por 4 horas. Após este período, 1/20 do pré-inóculo foi transferido para outro recipiente, contendo meio líquido SOB, o qual permaneceu sob agitação até que a densidade ótica atingisse 0,6 (600 nm). As bactérias foram tratadas com 0,5 mL MgCl₂ (1 M), seguida de uma solução RFI pH 5,8 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KC₂H₃O₂ 30 mM, CaCl₂ 10 mM e glicerol 15%), e solução RFII pH 6,8 (MOPS 100 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM e glicerol 15%). Por fim, foram estocadas à -80 °C.

Estas bactérias foram utilizadas nas transformações por choque térmico, cuja técnica consiste em adicionar o DNA de interesse a 50 µl de células competentes, incubá-las no gelo por 30 minutos e, então, é dado o choque térmico à 42 °C, por 1 minuto. As células retornam imediatamente ao gelo, onde permanecem por 5 minutos. A seguir, é adicionado meio SOC (9 X o volume de bactérias) e as células permanecem sob agitação constante, a 37 °C, por 1 hora. Após este período, as células são submetidas a um spin e o ‘pellet’, ressuspendido em 50-100 µl de meio LB, sendo plaqueadas em placas de LB ágar, contendo o antibiótico de seleção e incubadas a 37 °C, por 14-16 horas. O controle negativo de cada eppendorf de células competentes utilizado é feito com bactérias que foram submetidas às mesmas condições, exceto pela ausência do plasmídeo de interesse.

3.5 Purificação e quantificação de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi purificado em colunas do Kit Qiagen Plasmid Purification, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante e que consiste basicamente na técnica de lise alcalina para preparações de plasmídeos.

O plasmídeo foi eluído em um 50 µl de água MilliQ estéril e tampão de baixa concentração salina (TE: Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,1 mM). A análise da qualidade e quantificação do DNA plasmidial purificado foi feita através de eletroforese em gel de agarose (0,8%), de acordo com o descrito por Maniatis (1989). A corrida foi realizada a 60 V e a comparação de tamanho do DNA feita com padrão de DNA “*supercoiled*” (Gibco-BRL). Após a purificação, o DNA foi mantido à -20 °C até a utilização na transfecção de células.

3.6 Reações em cadeia de polimerase (PCR)

Para amplificação dos genes relacionados a apoptose, foram desenhados oligonucleotídeos específicos - *primers* (Tabela 1). Estes nucleotídeos foram desenhados de modo a conter sequências de DNA específicas, as quais pudessem ser reconhecidas por enzimas de restrição e permitissem a clonagem no vetor pMX.IRES.egfp e uma sequência chamada Kozak que permite a expressão dos genes em células eucarióticas. Ambas estas sequências localizam-se *upstream* aos inícios das sequências dos genes relacionados à apoptose.

As amplificações foram feitas com diferentes concentrações de DNA (100 ng ou 200 ng) e oligonucleotídeos específicos (100 nM ou 200 nM) e combinações destas concentrações, juntamente com MgCl₂ 1.5 nM, Tampão PCR 10 X -10% do volume de reação, dNTPs 200 µM, Taq DNA polimerase 2,5 U e água estéril para completar o volume para 100 µl.

A ciclagem utilizada para a amplificação dos genes foi a seguinte:

Desnaturação inicial: 94 °C, por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C, por 1 minuto; 60 °C, por 030 segundos e 72 °C, por 2 minutos.

Dez microlitros de cada amostra foram analisadas por eletroforese de gel de agarose.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados para amplificação de genes anti-apoptóticos humanos por PCR.

Gene	Sequência (5'→3')	Tm (°C)	Fragmento (pb)
<i>BclW</i> Met	AAT GAA TTC GCC ATG GCG ACC	82.1	582
<i>BclW</i> Stop	GGC CTC GAG CTA CTT GCT AGC	72.7	
<i>Bclxl</i> Met F	AAT GAA TTC GCC ATG TCT CAG	78.9	702
<i>Bclxl</i> Stop	GGC CTC GAG TCA TTT CCG ACT	74.7	
<i>Bcl2</i> Met F	AAT GAA TTC GCC ATG GCG CAC	83.7	720
<i>Bcl2</i> Stop	TCT CTC GAG TCA CTT GTG GCC	72.7	
<i>Ciap1</i> Met	AGG GAA TTC GCC ATG CAC AAA	77.9	1857
<i>Ciap1</i> Stop	CGC CTC GAG TTA AGA GAG AAA	69.2	
<i>Ciap2</i> Met	GGC GGA TCC GCC ATG AAC ATA	75.7	1815
<i>Ciap2</i> Stop	GCG CTC GAG TCA TGA AAG AAA	72.5	
<i>Mcl1</i> Met F	CGC GGA TCC GCC ATG TTT GGC	83.6	1053
<i>Mcl1</i> Stop	CGC TCT AGA CTA TCT TAT TAG	58.8	
<i>Xiap</i> Met F	GCG GGA TCC GCC ATG ACT TTT	75.5	1494
<i>Xiap</i> Stop	CGG CTC GAG TTA AGA CAT AAA	70.8	

3.7 Purificações de DNA (*Genecloning*)

As amostras de DNA foram purificadas a partir de gel de agarose e de reações de PCR.

A partir de gel de agarose, as amostras foram excisadas dos géis corados com Brometo de etídeo e analisados através de iluminação com luz UV. O peso dos pedaços de cada gel contendo o DNA de interesse foi estimado e foi adicionado a cada pedaço de gel 3 volumes/g de NaI 6 M. A mistura foi incubada à 55 °C até que o gel estivesse totalmente dissolvido.

A partir das reações de PCR, os DNAs de interesse foram purificados adicionando-se às reações 3 volumes de NaI 6 M.

Após a adição de NaI 6 M, tanto amostras de DNA de gel de agarose quanto de reações de PCR foram purificados seguindo-se o seguinte protocolo: cerca de 20 µl de sílica (aproximadamente 5 µl de sílica/µg de DNA) foi misturada à suspensão, por 15 minutos, sob agitação constante, seguido de centrifugação à 14000 g, por 10 segundos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µl de Tampão de lavagem (Tris-Hcl 10 mM, pH7,5, NaCl 50 mM, EDTA 2.5 mM e Etanol 50%), seguido por centrifugação à 14000 g, por 10 segundos. A lavagem foi repetida por 3 vezes. Os sobrenadantes foram descartados e a sílica foi deixada secando a temperatura ambiente, por cerca de 15 minutos. Finalmente, foi adicionado ao *pellet* 20 µl de água estéril e a suspensão foi centrifugada novamente como descrito anteriormente. O sobrenadante contendo o DNA purificado foi transferido para outro tubo e cerca de 1-2 µl de cada amostra foi analisada em eletroforese de gel de agarose.

3.8 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os DNAs dos genes de interesse e do vetor pMX.IRES. *Egfp* foram digeridos com enzimas de restrição seguindo-se o protocolo descrito a seguir.

Cerca de 2-4 µg de DNA foram utilizados para cada reação, juntamente com tampão específico de cada enzima - 10% do volume final de reação, BSA quando necessário (enzimas) - 10% do volume final de reação, 0.5 µl de cada enzima de restrição e água estéril para completar o volume para 50 µl. As reações foram incubadas a 37 °C, overnight.

Como controle das reações foi utilizada amostra com DNA sem enzima e amostra somente com 1 das enzimas.

3.9 Ligações de extremidades coesivas de DNA

Cerca de 200 ng de DNA do vetor pMX.IRES.*Egfp* (100-200 ng/ μ l) foram utilizados para cada reação de ligação com os insertos digeridos e o dobro da concentração molar foi utilizada de cada inserto para cada reação de ligação (cerca de 40 ng de *BclW* digerido com EcoRI+XhoI, *Bclxl*, cerca de 140 ng de *Ciap1* digerido com EcoRI+XhoI, cerca de 140 ng de *Ciap2* digerido com BamHI+XhoI e cerca de 160 ng de *Xiap* digerido com BamHI+XhoI).

O DNA do inserto de do vetor foi colocado em 8,5 μ l de dH₂O ultrapura, incubados à 45 °C, por 5 minutos, seguido de incubação em gelo para que as extremidades de DNA permanecessem livres. Após esta etapa, foram acrescentados 1 μ l de tampão T4 DNA ligase 10 x (Invitrogen) e 0.5 μ l de enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada à aproximadamente 16 °C, *overnight*.

Cerca de 3 μ l de cada reação de ligação foi utilizada para transformar 200 μ l de bactérias competentes da linhagem DH5-alpha e todo o volume de transformação foi plaqueado em placas de LB ágar, contendo Ampicilina (100 μ g/ml).

3.10 Transfecção de células 293T e infecção de células RMA e RMA-S com construções retrovirais

A transfecção transitória de células empacotadoras (293T) foi realizada com protocolo de fosfato de cálcio descrito a seguir: preparou-se um precipitado com 4 μ g do plasmídeo de interesse em 18 μ L de 2,5 M CaCl₂, completando com água MilliQ autoclavada para volume final de 180 μ L. Esta solução que contém DNA foi adicionada, gentilmente, a um tubo contendo 180 μ L de tampão 2 x HeBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄). Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente, para que se forme um precipitado. Este foi despejado sobre células 293T com confluência de cerca de 70% e mantidas em placa de cultura com meio fresco, 3 horas antes. Para que as células 293T produzissem partículas virais com os genes que codificam as proteínas EGFP ou BCLW, estas foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo pMXI.IRES.*Egfp* ou pMX.*bclW*.IRES.*Egfp* e 4 μ g do pCL-ampho, o qual fornece os genes que codificam proteínas gag, pol e env, essenciais para a produção de retrovírus. As células foram incubadas na estufa, a 37 °C, por 6 horas seguido de lavagem com PBS, à temperatura ambiente e mantidas por mais 24 horas em

2 ml de meio DMEM completo. Após este período, o meio de cultura foi trocado e as células, mantidas na estufa por 18 horas adicionais. Após este período, as células transfectadas foram tripsinizadas (Tripsina 0,25%) e separadas para análise da eficiência da transfecção em citômetro de fluxo (Facsalibur, BD). O sobrenadante foi recolhido para ser utilizado na infecção das células RMA e RMA-S.

Para infecção viral das células RMA e RMA-S o seguinte protocolo foi usado: o sobrenadante das células 293T obtido como descrito acima foi centrifugado a 500g para que restassem apenas partículas virais. As células RMA e RMA-S foram plaqueadas em placa de 6 poços, no dia anterior ao da infecção, no número de 1×10^5 células totais/poço.

O meio de cultivo das células RMA e RMA-S foi recolhido e sobre as mesmas foram adicionado 500 μ L do sobrenadante das transfecções de células empacotadoras, acrescido de polibrene na concentração final de 8 μ g/mL. O polibrene é uma molécula pequena, carregada positivamente e que se liga à superfície celular, neutralizando a carga da superfície a fim de facilitar a ligação das glicoproteínas virais com seus receptores presentes na membrana celular e aumentar a eficiência da infecção.

Em seguida, as células foram incubadas por 4 horas em estufa, à 37 °C e, findo esse período, foi adicionado 1 ml de meio fresco e incubado novamente por 16 horas. Finalmente, as células foram novamente submetidas à infecção, seguindo-se o mesmo procedimento. Após estes procedimentos, células que superexpressavam a proteína fluorescente verde foram selecionadas e separadas em citômetro de fluxo (FacsVantage, SE).

3.11 Marcações de células com anticorpos

Para marcação de linhagens celulares cultivadas *in vitro* com anticorpos anti-mouse, 5×10^5 células RMA, RMA-S, RMA.*egfp* e RMA-S.*egfp* foram separadas em 100 μ l de meio de cultura (RPMI 1640, Invitrogen) e incubadas com sobrenadante de hibridoma 24G2 (anticorpo Fc Block). Após lavagem com PBS 1x, foram adicionadas 25 μ l das seguintes combinações de anticorpos (BD-Pharmingen):

-Para RMA e RMA-S – CD62L (FITC) + CD25 (PE); CD4 (Cy) + CD8 (PE) + CD45R (FITC); CD3 (FITC) + CD44 (PE)

-Para RMA.*egfp* e RMA-S.*egfp* - CD4 (Cy) + CD8 (PE); CD45R(PE); CD25 (PE); CD44 (PE).

Após incubação por 30 minutos, a 4 °C foram feitas duas lavagens com PBS, 3% soro fetal bovino (SFB) e, por fim, as células foram ressuspensas em 300 µl de PBS, 1% SFB, 0,01% azida sódica para aquisição em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur). Como controles foram usadas células sem marcação com anticorpos. Para aquisição de dados no citômetro de fluxo, foram adquiridos 30.000 eventos de cada amostra.

3.12 Curvas de proliferação celular

As linhagens tumorais foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/ml, em placa de 24 poços (triplicata), nas mesmas condições de manutenção descritas no item 1. A contagem do número de células totais foi feita a cada 24 horas, durante 5 dias, em câmara de Neubauer. O gráfico da curva de proliferação foi feito em programa GraphPad versão 4.0, onde foi calculado o tempo de duplicação (regressão não linear e curva de crescimento exponencial).

3.13 Ensaio de resistência a apoptose

As células tumorais foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/0,1 ml, em placa de 96 poços (triplicata) com concentrações crescentes das seguintes drogas: Etoposídeo (0,4; 2 e 10 µM), Actinomicina D (0,04; 0,2 e 1 µM) e Cicloheximida (2; 10 e 50 µM). Após 18 horas de incubação com as drogas, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µL de solução HFS (50 µg/mL PI, 1% citrato de sódio, 1% Triton X 100), incubadas por 1 hora, adquiridas em citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD) e analisadas em programa CellQuest.

3.14 Preparo de células tumorais para inoculação em camundongos

As células Egfp positivas mantidas em cultura foram centrifugadas por 5 minutos, a 4 °C, a 240 g e ressuspendidas em 1mL de PBS (1X), a fim de contá-las em câmara de Neubauer. Após a certificação do número mínimo de células necessárias para as injeções, estas foram lavadas duas vezes em PBS (1X), para eliminar qualquer resíduo de soro e novamente contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular mínima estabelecida para as inoculações foi de 90% e feita por exclusão de Azul de Tripán.

As células ressuspendidas em volume de 0,2 ml/animal nas inoculações e.v de PBS 1 X e mantidas em tubos de fundo côncavo, em gelo, até o momento das inoculações. A viabilidade celular foi verificada após as inoculações para garantir que as células se mantiveram viáveis até o final do procedimento.

3.15 Inoculações de células tumorais em camundongos

As células tumorais, antes mantidas em gelo, foram aquecidas na mão antes das inoculações e homogeneizadas a cada aplicação.

Nas injeções e.v., os camundongos foram mantidos dentro de microisoladores, próximas a um aquecedor elétrico (cerca de 0,5 m de distância) alguns minutos antes para que a veia caudal ficasse suficientemente dilatada. Nestes experimentos foram utilizados camundongos selvagens (WT), CD4KO, CD8KO, todos com fundo C57BL/6.

Cada experimento durou cerca de 13-15 dias. Nestes experimentos utilizamos camundongos das linhagens C57BL/6 selvagens e, devido a problemas com a linhagem nude com fundo C57BL/6 no Biotério de criação do Departamento de Imunologia, utilizou-se a linhagem Balb/c nu/nu para verificar o crescimento dos tumores no dorso de animais deficientes de linfócitos T maduros.

3.16 Análises de colonização tumoral em tecidos de camundongos

Para analisar a porcentagem de células Egfp⁺ em tecidos de camundongos inoculados com células tumorais, cada animal foi sacrificado (experimentos com inoculação e.v. – 21 dias) e perfundido no coração com 10 ml de PBS, a fim de eliminar dos órgãos células EGFP⁺

que estivessem no sangue periférico e não nos tecidos. Após a perfusão, os seguintes tecidos foram retirados e mantidos em meio de cultura até a homogenização: baço, fígado, rim, timo, líquido peritoneal e fêmur para retirada da medula óssea. Os órgãos foram macerados com auxílio de “BD Falcon™ cell strainer”, poros de 70 µm em malha de nylon e diluídos em 5 ml (medula óssea e timo), 10 ml (baço e rins) ou 20 ml (fígado). As medulas ósseas foram retiradas por injeção de PBS no orifício do fêmur. Para as aquisições em citômetro de fluxo, 400 µl de cada amostra foi recolhida. Com base na janela feita a partir do tamanho e expressão de Egfp das células de ambas as linhagens tumorais cultivadas in vitro, foram adquiridos de 100.000 a 200.000 eventos de cada amostra de homogenizado de tecido.

Para analisar a porcentagem de células Egfp⁺ circulantes no sangue dos camundongos inoculados com 1×10^6 células RMA.Egfp, retiramos amostra de sangue (50 µl de cada animal) nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação das células. As amostras foram incubadas com 500 µl de Dextran 500 diluídos em PBS (20 mg/ml), à 37 °C, por 30 minutos para decantar a maior parte dos eritrócitos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado à 300 g, à 20 °C, por 5 minutos e o pellet foi incubado com 1ml de tampão ACK (50 mM de NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 M EDTA), à temperatura ambiente, por 2 minutos para lisar os eritrócitos restantes. A contagem dos leucócitos totais foi feita em Câmara de Neubauer e a aquisição de porcentagem de EGFP foi feita em citômetro de fluxo (50.000 eventos).

3.17 Análises de proteção contra paralisia de animais inoculados com células Egfp positivas

Cerca de quatro meses após a inoculação e.v. de grupos de 6 camundongos C57BL/6 com solução salina, 1×10^2 e 1×10^3 células tumorais RMA.Egfp e RMA-S.Egfp, estes foram inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.Egfp e o desenvolvimento de paralisia e morte foram acompanhados diariamente, por no máximo 3 meses.

3.18 Análises de superexpressão protéica por Western Blot

Vinte microlitros de cada amostra de lisado celular foi aplicado em gel 12% acrilamida (*running gel*) (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 10%, acrilamida 30%, APS (persulfato de amônio) 10%, TEMED 0,012%). O gel de empilhamento 5% (*stacking gel*) foi

preparado com Tris 1M pH 6,8, SDS 10%, acrilamida 30%, APS 10% e TEMED 0,008%. A eletroforese foi feita em tampão Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%, sob a voltagem de 55 V até as proteínas atravessarem o gel de empilhamento e 75 V no *running* gel durante aproximadamente 4 horas.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF previamente umedecida em metanol e água destilada. A transferência foi realizada a 40 mA, *overnight* em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v:v). Finda a transferência, a membrana foi embebida em solução de bloqueio (TBSTween 5%, NFDM (*Non Fat Dried Milk*) 0,05% azida sódica), por 1 hora, sob agitação constante, com os seguintes anticorpos primários: anti-BCLW (Calbiochem), anti-CIAP1 e anti-CIAP2 (RD System), anti-XIAP (BD Biosciences) diluídos 1:500 e anti-Actina (RD System) diluído 1:1000. A incubação com anticorpo secundário (anti-imunoglobulina G de coelho ou camundongo conjugada a peroxidase, Jackson Immuno Research), na titulação de 1:1000 em tampão de bloqueio, foi feita a temperatura ambiente durante 1 hora, também sob agitação constante. Após sucessivas lavagens com TBSTween (3 vezes de 15 minutos), as proteínas foram detectadas através de método baseado em quimioluminescência Supersignal (Pierce). Foram feitas algumas exposições dos *blots* em filmes fotográfico.

3.19 Análises estatísticas

Em todos os experimentos, os dados foram analisados pelo software GraphPad (versão 4.0) e as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os dados do experimento de proliferação celular *in vitro* foram analisados pelo com regressão não linear e curva de crescimento exponencial. Os dados do experimento de resistência a apoptose e de grau de paralisia foram analisados pelo teste Two-way ANOVA e teste de Bonferroni. Os dados de curvas de sobrevivência foram analisados diretamente pelo software, o qual utiliza o método de Kaplan-Meyer e a comparação das curvas é feito com teste LogRank.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Para desenvolver modelos murinos de linfoma T que pudessem ser utilizados em estudos da resposta imune contra tumor, decidiu-se utilizar as linhagens celulares RMA e RMA-S. Isso porque a primeira expressa MHC de classe I na superfície celular e pode, assim, ser alvo de linfócitos T citotóxicos enquanto a segunda não expressa essa molécula e, em consequência, escapa do ataque desses linfócitos, todavia esta última passa a ser alvo de células NK (*Natural Killers*).

A fim de obter linhagens celulares que pudessem ser detectadas *in vivo*, decidiu-se infectar as linhagens RMA e RMA-S com uma construção retroviral, contendo o plasmídeo pMX.IRES.Egfp e, assim, induzir a expressão da proteína fluorescente verde EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*). Após este procedimento, seguiram-se as estratégias descritas abaixo.

4.1 Caracterização das linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp *in vitro*

4.1.1 Análise de expressão de proteínas em linhagens celulares RMA, RMA-S, RMA.Egfp e RMA-S.Egfp

Após a obtenção das linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp, a expressão da proteína EGFP foi verificada por microscopia de fluorescência (Fig.3). A figura mostra que não houve detecção de fluorescência verde nas linhagens parentais RMA e RMA-S quando observadas em campo escuro e filtro 570 nm, como esperado e que houve detecção de fluorescência verde nos citoplasmas das linhagens RMA.Egfp e RMA-S.Egfp quando analisadas nas mesmas condições, indicando que as mesmas expressam a proteína EGFP. A sobreposição das imagens indica que as células visualizadas no campo claro eram as mesmas que expressavam a proteína fluorescente. Vale ressaltar que as células infectadas expressam intensidades diferentes de fluorescência verde, pois foram separadas populações positivas que incluíram células que expressavam níveis altos e baixos de fluorescência. A expressão proteica de EGFP é estável por várias passagens *in vitro* e *in vivo* (dados não mostrados).

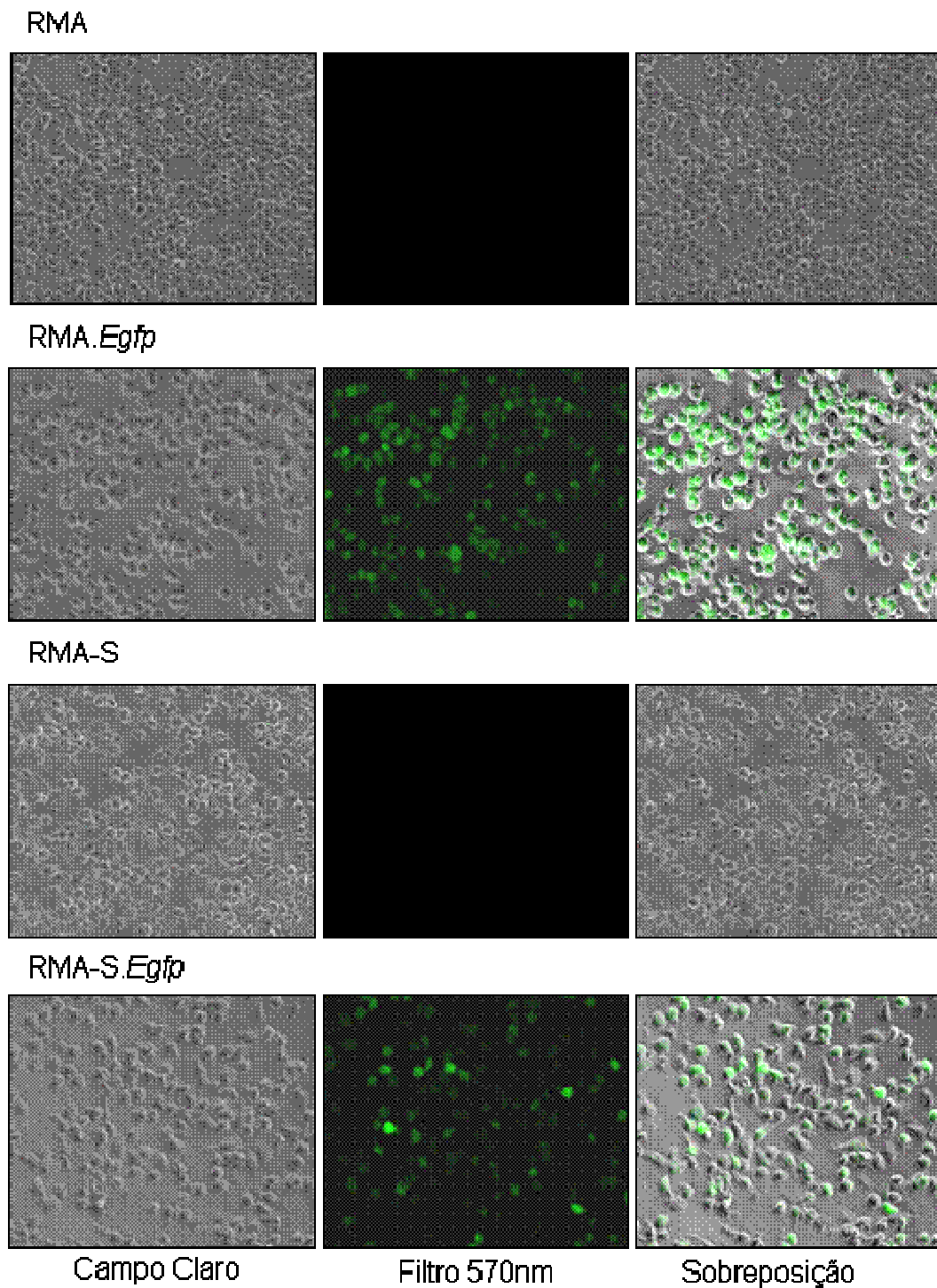


Figura 3. Expressão da proteína EGFP em linhagens celulares RMA, RMA.Egfp, RMA-S e RMA-S.Egfp. As células tumorais infectadas ou não com a construção retroviral que contém o gene *Egfp* foram analisadas por microscopia de fluorescência. A coluna da esquerda mostra as células observadas em campo claro, a coluna central; em campo escuro, com filtro 570 nm e a coluna da direita mostra a sobreposição das imagens do campo claro e do escuro.

A expressão desta proteína também foi verificada por citometria de fluxo (Fig.4). A figura mostra que as células parentais RMA e RMA-S não expressavam a proteína EGFP enquanto as células infectadas RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* expressavam esta proteína. Em relação a expressão de MHC de classe I (H-2D^b), como mostra a figura 4, foi observada a expressão desta molécula nas superfícies celulares das linhagens RMA e RMA.*Egfp*. Ao contrário, não houve detecção de H-2D^b nas superfícies celulares de RMA-S e RMA-S.*Egfp*.

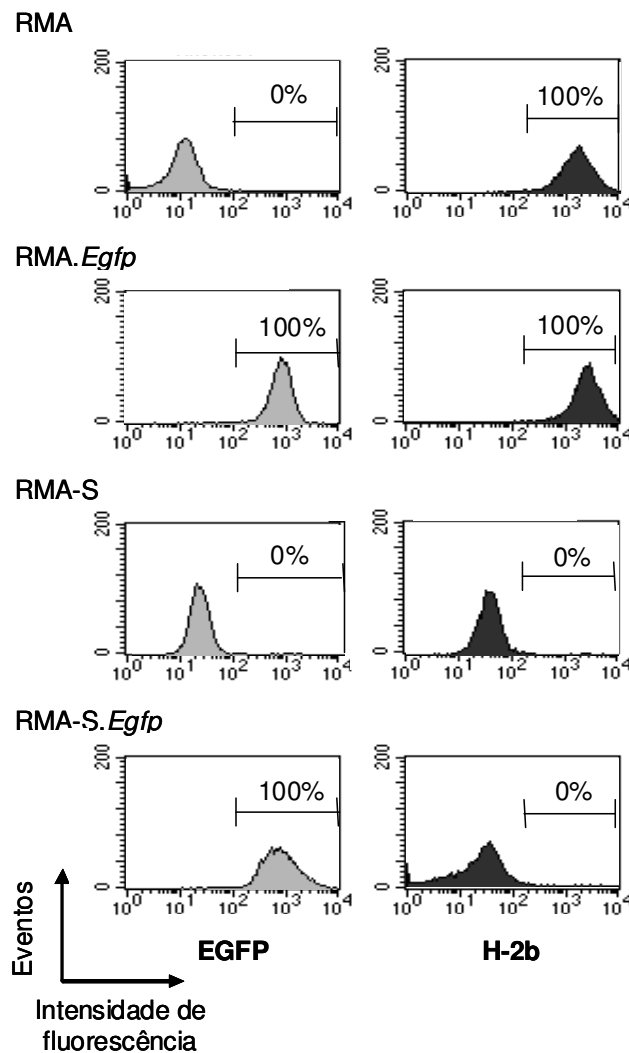


Figura 4. Expressão das proteínas EGFP e MHC classe I (H-2^b) em linhagens celulares RMA, RMA.*Egfp*, RMA-S e RMA-S.*Egfp*. Células infectadas e não infectadas com a construção retroviral que contém o gene *Egfp* foram marcadas com anticorpo anti-H2D^b- PE. As aquisições das populações celulares foram feitas por citometria de fluxo, utilizando filtro 500-560 nm para detecção de EGFP e 550-600 nm para a detecção do anticorpo anti mouse H-2b-PE. Foram adquiridos 10.000 eventos. As porcentagens de células EGFP ou H-2^b positivas de cada linhagem celular são representadas em cada gráfico.

Outras proteínas de superfície celular foram analisadas em ambas as linhagens celulares a fim de caracterizá-las. Foram analisadas a expressão das moléculas CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD45R e CD62L. A figura 5 mostra que a expressão da molécula CD44 foi detectada nas quatro linhagens celulares e que não foi detectada a expressão de nenhuma outra das moléculas citadas acima.

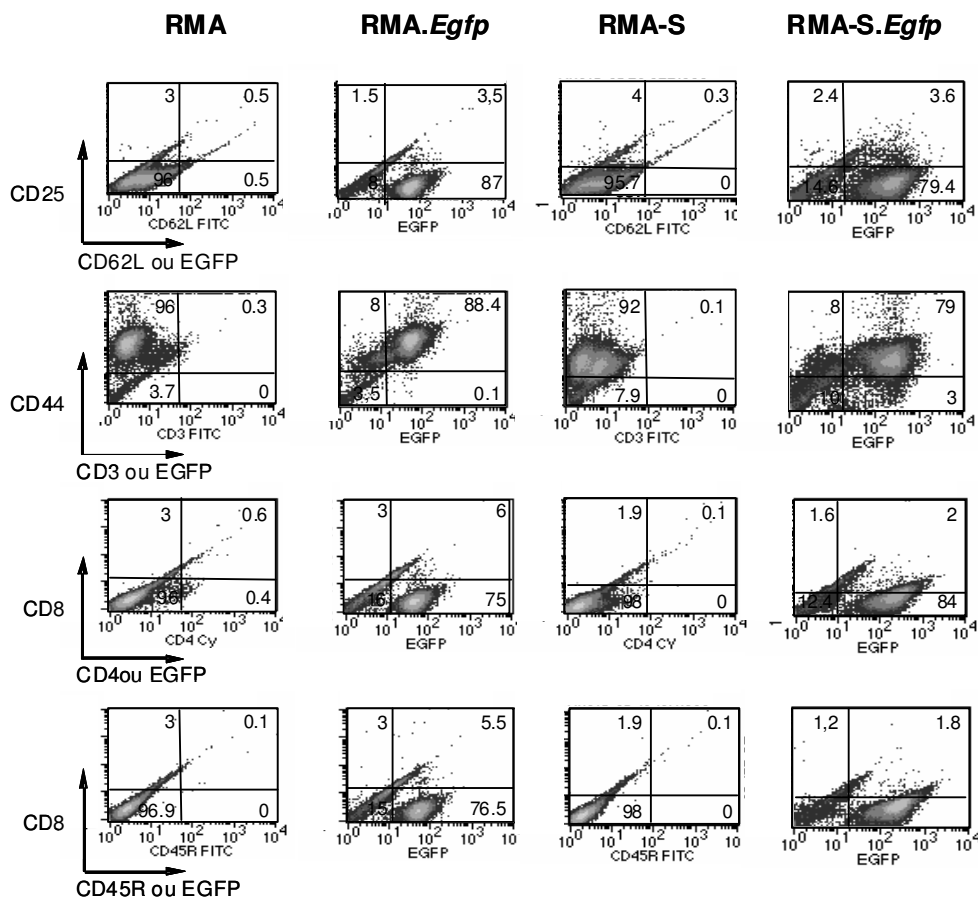


Figura 5. Expressão de moléculas de superfície celular nas linhagens RMA, RMA.Egfp, RMA-S e RMA-S.Egfp. As células foram marcadas com anticorpos conjugados aos fluoróforos FITC (CD3, CD62L e CD45R), PE (CD44, CD25 e CD8) e Cy (CD4), os eventos foram adquiridos por citômetro de fluxo e analisados em software CellQuest. Foram adquiridos 10.000 eventos. As porcentagens de eventos são representados em cada quadrante dos gráficos.

A tabela 2 ilustra o painel de expressão de moléculas pelas linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

Tabela 2. Painel de expressão de proteínas pelas linhagens celulares RMA, RMA.Egfp, RMA-S e RMA-S.Egfp.

	RMA	RMA.Egfp	RMA-S	RMA-S.Egfp
H-2b	+	+	-	-
EGFP	-	+	-	+
CD3	-	NA	-	NA
CD4	-	NA	-	NA
CD8	-	-	-	-
CD25	-	-	-	-
CD44	+	+	+	+
CD45R	-	NA	-	NA
CD62L	-	NA	-	NA

(+) - expressão
 (-) - não expressão
 NA - Não analisado

Após a verificação de que as linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp expressavam igualmente a proteína EGFP e expressavam diferencialmente a proteína MHC de classe I de acordo com a literatura, iniciaram-se os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

4.1.2 Proliferação celular *in vitro*

Antes de observar o comportamento das linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp *in vivo*, foi preciso analisar se as taxas de proliferação de ambas as linhagens eram diferentes. Isso porque a avaliação do comportamento destas linhagens *in vivo* (agressividade, colonização tecidual, etc) depende da análise prévia sobre diferenças independentes de variáveis encontradas em interações *in vivo*. Para isso, foram feitos experimentos de contagem números de células totais por períodos de tempo entre 24 e 96 horas.

As análises mostraram que as taxas de proliferação celular *in vitro* de ambas as linhagens foram semelhantes entre si (Fig. 6). A fase de latência foi curta (2 horas) e não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de duplicação (15 e 13 horas, respectivamente).

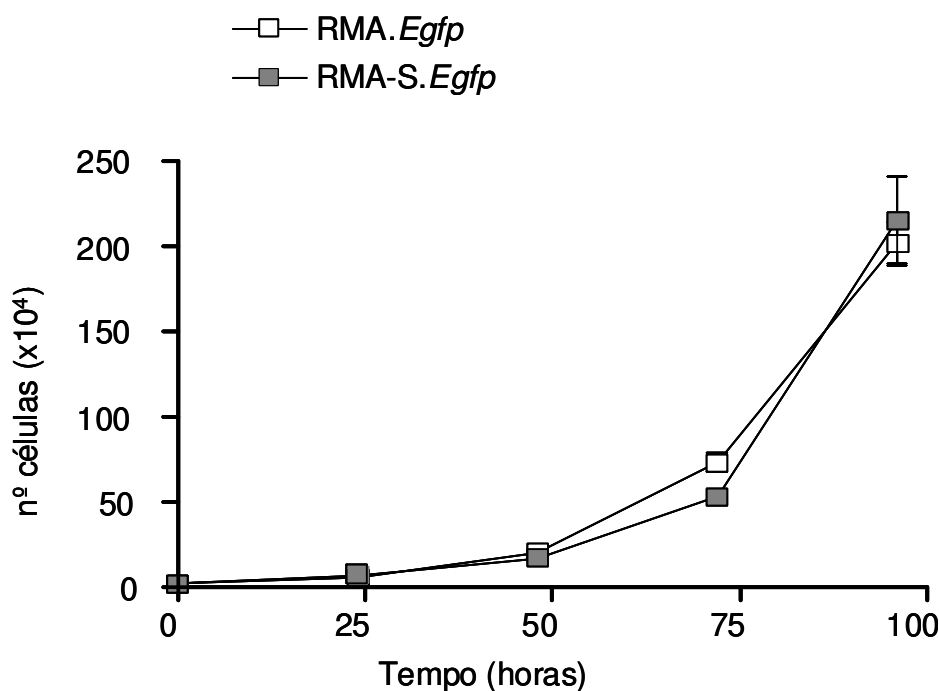


Figura 6. Curva de proliferação de células RMA.Egfp e RMA-S.Egfp, *in vitro*. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células de cada linhagem e as contagens dos números totais de células foram feitas a cada 24 horas, em câmara de Neubauer, por até 96 horas. O tempo de duplicação de cada linhagem foi calculado em 15 e 13 horas para RMA.Egfp e RMA-S.Egfp, respectivamente (análise de regressão não linear). Os pontos representam média aritmética \pm desvio padrão (n=3).

4.1.3 Perfil de resistência a apoptose *in vitro*

Considerando que os modelos animais desenvolvidos neste trabalho podem ser usados em estudos de terapia antitumoral, decidiu-se avaliar os perfis de resistência à morte das linhagens celulares RMA.Egfp e RMA-S.Egfp induzida por agentes quimioterápicos, *in vitro*.

Para estes ensaios foram utilizadas diferentes concentrações dos agentes quimioterápicos Cicloheximida (inibidor de síntese de proteína), Actinomicina D (inibidor de transcrição de DNA) e Etoposídeo (causador de dano ao DNA). As células foram incubadas com as drogas pelo período de 18 horas (triplicatas). A fragmentação de DNA decorrente do processo de apoptose foi observada por incorporação de Iodeto de Propídeo ao DNA,

aquisição em citômetro de fluxo e análise da porcentagem de células hipodiplóides em cada tratamento.

A Figura 7 ilustra os perfis de resistência à morte das linhagens celulares com as diferentes concentrações dos quimioterápicos citados acima. Na maioria dos casos (tanto o tipo de droga quanto a dosagem usada), foi possível observar que a resistência à morte entre ambas as linhagens celulares foram semelhante entre si (teste Two-way ANOVA). Uma exceção foi observada ao utilizar o quimioterápico Etoposídeo, o qual se mostrou mais tóxico para células RMA.*Egfp* do que para RMA-S.*Egfp* na maior concentração utilizada (10 μ M).

Foi observado também um efeito dose-dependente na morte de ambas as linhagens celulares com as três drogas quimioterápicas.

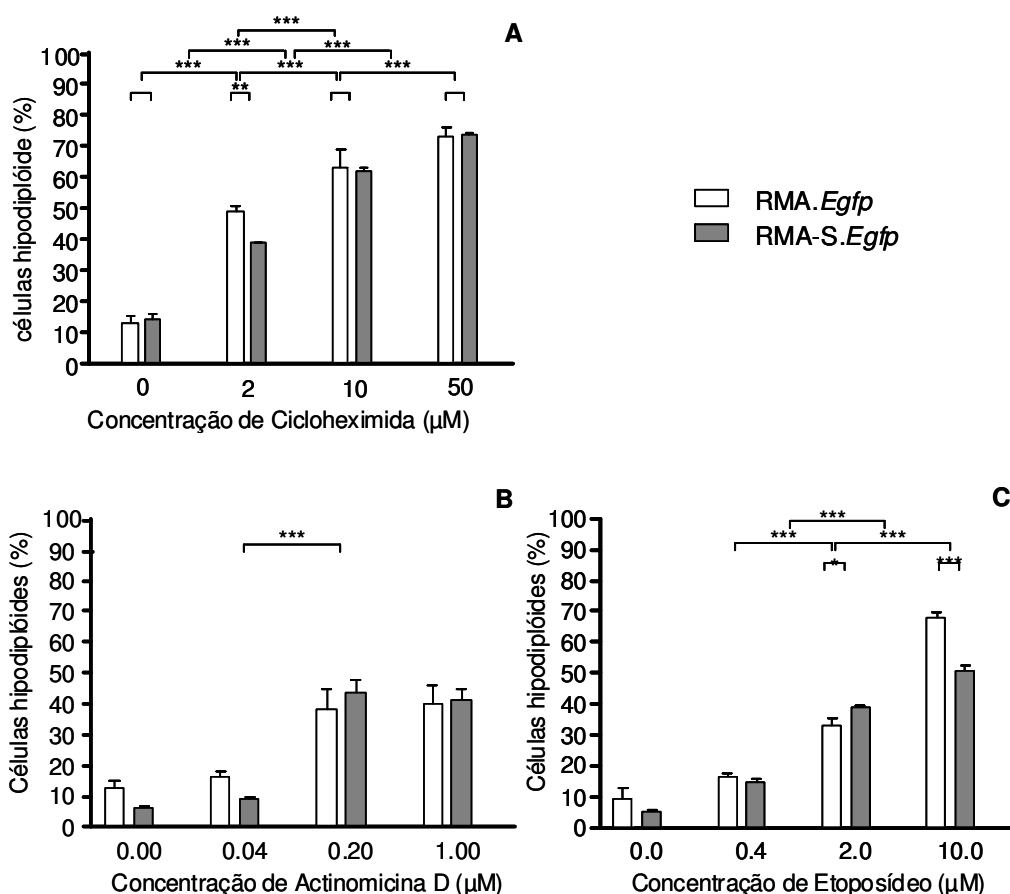


Figura 7. Perfil de resistência à apoptose de células RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* com diferentes quimioterápicos, *in vitro*. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células de ambas as linhagens, as quais foram incubadas por cerca de 18 horas na presença ou ausência das diferentes concentrações de cada droga (A- Cicloheximida, B- Actinomicina D e C- Etoposídeo). As análises de fragmentação de DNA foram feitas em citômetro de fluxo. As barras representam a média \pm desvio padrão ($P < 0,05$ *; $P < 0,001$ ***-Two-way ANOVA, $n=3$). Gráfico representativo de 3 experimentos independentes.

4.2 Desenvolvimento e caracterização dos modelos murinos de tumor

Após caracterizar as linhagens celulares *in vitro*, iniciou-se o desenvolvimento dos modelos murinos de linfoma. Para isso, foram inoculadas ambas as linhagens RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* pela via endovenosa (e.v.) de camundongos C57Bl/6 selvagens (*Wild Type*). Diversos parâmetros foram analisados após as inoculações, dentre eles padrões de sobrevivência, variação de peso, doença e colonização de tecidos pelas células tumorais.

Posteriormente, decidiu-se verificar indiretamente alguns aspectos da resposta imune contra os tumores, como a geração de proteção contra tumor pela exposição prévia do hospedeiro às linhagens tumorais e a análise da importância de subpopulações de linfócitos na resposta imune contra os tumores RMA.*Egfp*, utilizando camundongos deficientes de linfócitos T CD4 (CD4KO) e de linfócitos T CD8 CD8KO).

4.2.1 Análise de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*

Primeiramente, foi avaliada a existência de limiar de quantidade de células de ambas as linhagens celulares que poderiam afetar a sobrevivência dos camundongos quando inoculadas endovenosamente (e.v.). Para isso, diferentes números de células RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* (entre 1×10^2 e 1×10^6 células) foram inoculadas e.v. em camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens e a sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente.

A figura 8 ilustra a curva de sobrevivência de camundongos inoculados com os diferentes números de células RMA.*Egfp*. Neste gráfico, observa-se que os grupos de animais inoculados com números $\leq 1 \times 10^3$ células sobreviveram igualmente ao grupo inoculado com solução salina (controle). Diferentemente, os grupos inoculados com números $\geq 1 \times 10^4$ células apresentaram porcentagem de morte entre os animais de cada grupo (1×10^4 – 47,4%, 1×10^5 – 63,2%, 1×10^6 - 86,8%).

RMA.*Egfp*

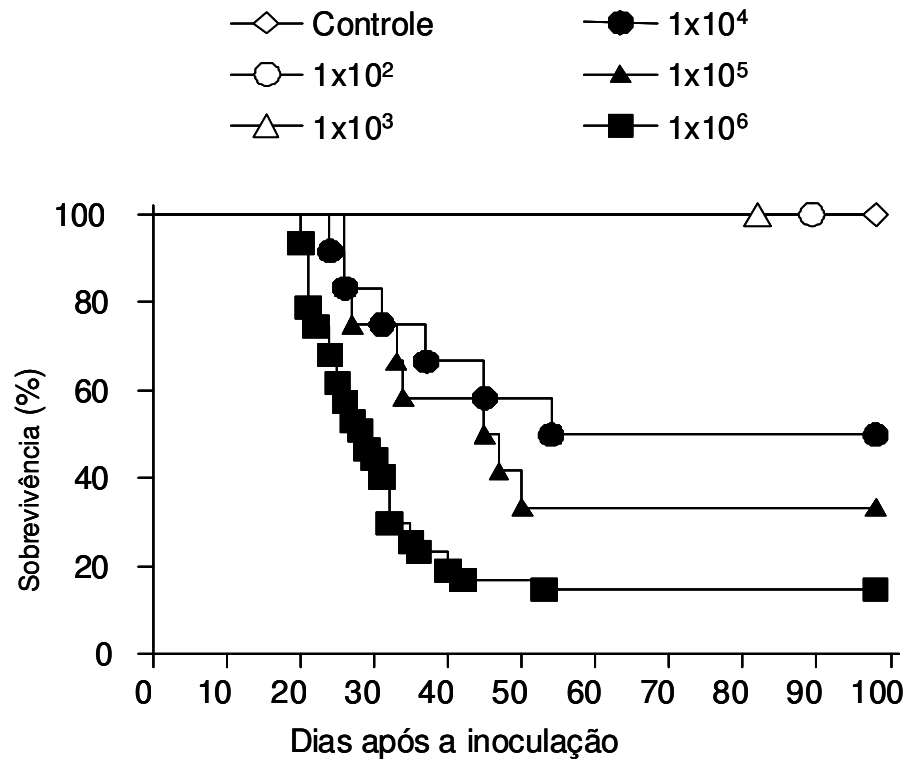


Figura 8. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com células RMA.*Egfp*. Os animais foram injetados e.v. com 0,2 ml de solução salina (Controle) ou com números crescentes da linhagem celular RMA.*Egfp*. Os dados são mostrados em gráfico do tipo Kaplan Meyer. A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank ($P < 0,0001$ entre as curvas, grupos Controle $n=22$; 1×10^2 e 1×10^3 $n=11$; 1×10^4 e 1×10^5 $n=19$; 1×10^6 $n=53$).

A tabela 3 lista os experimentos utilizados para a construção desta curva de sobrevivência.

Tabela 3: Inoculação e.v. de números $\geq 1 \times 10^4$ células da linhagem RMA.*Egfp* provoca paralisia e morte de camundongos C57BL/6 selvagens.

Nº de células inoculadas e.v.	Mortes	Dia da morte (média \pm desvio padrão)
1×10^6	3/4	27,7 \pm 7
	3/6	40,7 \pm 13,1
	5/6	23,8 \pm 1,6
	7/7	26,3 \pm 2,4
	4/4	33 \pm 12,5
	8/10	33,4 \pm 4,3
	6/6	24,2 \pm 3,3
	5/5	30,6 \pm 5,4
1×10^5	5/5	32,8 \pm 2,2
	3/6	35,3 \pm 9,1
	4/7	40,8 \pm 13
1×10^4	5/6	36,4 \pm 11,5
	4/6	38,5 \pm 13,5
	3/7	39,3 \pm 6,5
1×10^3	2/6	31,5 \pm 7,8
	0/5	-
	0/6	-
1×10^2	0/5	-
	0/6	-

A curva de sobrevivência de camundongos inoculados com diferentes números de células da linhagem RMA-S.*Egfp* é mostrada na figura 9. Neste gráfico, também é verificado que a inoculação de números $\leq 1 \times 10^3$ células não promoveu a morte de nenhum animal assim como o observado no grupo controle e, ao contrário, grupos de animais inoculados com números $\geq 1 \times 10^4$ células apresentaram morte entre os animais (1×10^4 – 38,5%, 1×10^5 – 53,8%, 1×10^6 – 100%).

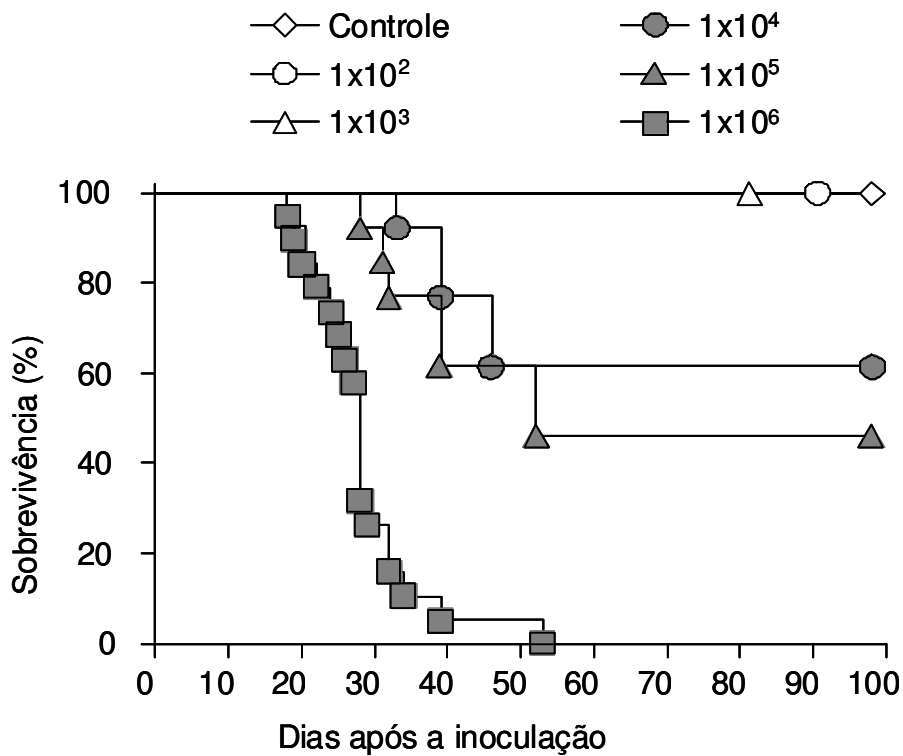


Figura 9. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 inoculados e.v. com células RMA-S.*Egfp*. Os animais foram injetados e.v. com 0,2 ml de solução salina (Controle) ou com números crescentes da linhagem celular RMA-S.*Egfp*. Os dados são mostrados em gráfico do tipo Kaplan Meyer. A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank ($P < 0,0001$ entre as curvas; grupos Controle $n=17$; 1×10^2 e 1×10^3 $n=6$; 1×10^4 e 1×10^5 $n=13$; 1×10^6 $n=19$).

A tabela 4 lista os experimentos utilizados para a construção desta curva de sobrevivência.

Tabela 4: Inoculação e.v. de números $\geq 1 \times 10^4$ células da linhagem RMA-S.*Egfp* provoca ascite e morte de camundongos C57BL/6 WT.

Nº de células inoculadas e.v.	Mortes	Dia da morte (média \pm desvio padrão)
1×10^6	6/6	23 \pm 4,6
	6/6	36,3 \pm 8,9
	7/7	26,3 \pm 2,4
1×10^5	3/6	36,7 \pm 4
	4/7	40,8 \pm 13
1×10^4	2/6	42,5 \pm 4,9
	3/7	39,3 \pm 6,5
1×10^3	0/6	-
1×10^2	0/6	-

A morte nos grupos inoculados com ambas as células ocorreu a partir do dia 20 após as inoculações e a quantidade de animais que morreram foi dependente dos números de células inoculadas ($1 \times 10^6 > 1 \times 10^5 > 1 \times 10^4$ – teste Log Rank $p < 0,0001$).

Como a inoculação de 1×10^6 células de ambas as linhagens celulares induziu a morte da maioria dos animais e de forma mais rápida, este número foi escolhido para os experimentos seguintes, onde os parâmetros de sobrevivência, doença, capacidade de colonizar tecidos e análises do papel dos linfócitos na resposta antitumoral foram caracterizados.

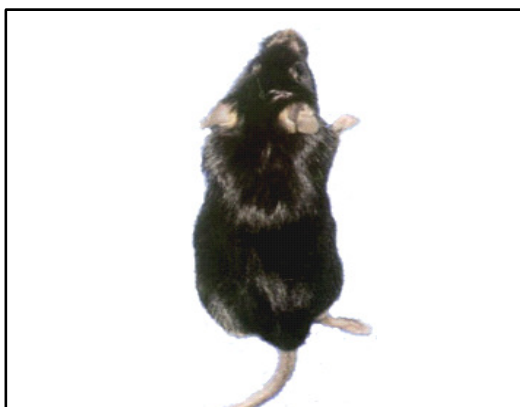
4.2.2 Aspectos clínico-patológicos em camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*

Quinze a vinte dias após a inoculação de números $\geq 1 \times 10^4$ células de ambas as linhagens tumorais, observou-se que os animais apresentavam sintomas clínicos e

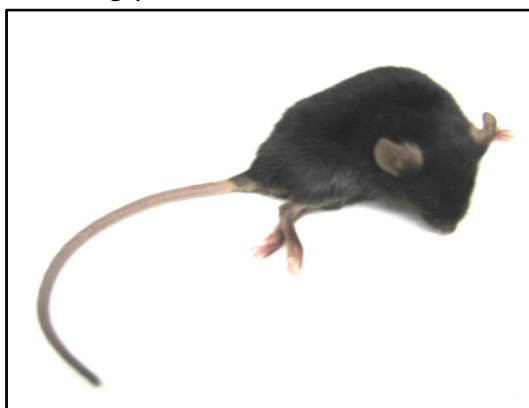
patológicos, ao contrário dos animais inoculados com solução salina (controles) e números menores de células.

Dependendo da linhagem tumoral inoculada, os sinais apresentados foram característicos e diferentes. A Figura 10 ilustra alguns destes sinais, entre eles: a) quando inoculada a linhagem celular RMA.*Egfp*, os animais apresentaram incontinência e quadro de paralisia da região posterior do corpo, de forma ascendente, progressiva e irreversível e b) quando inoculada a linhagem RMA-S.*Egfp*, os animais apresentaram ascite. O sinal de paralisia ocorreu em 50-100% dos animais inoculados com 1×10^6 células RMA.*Egfp*, 50-80% dos inoculados com 1×10^5 e 33-66% dos inoculados com 1×10^4 (Tabela 2, o qual ilustra a porcentagem de animais mortos devido a paralisia). A paralisia começou com fraqueza e perda do tônus muscular da cauda (classificada neste trabalho como sinal n°1); enfraquecimento muscular das patas posteriores e paralisia da cauda, com comprometimento dos movimentos dos animais (sinal n°2); paralisia da cauda e das patas posteriores (sinal n°3) e, em algumas ocasiões, a paralisia dos membros anteriores e total impedimento dos movimentos dos animais (sinal n°4).

Controle



RMA.Egfp



RMA-S.Egfp

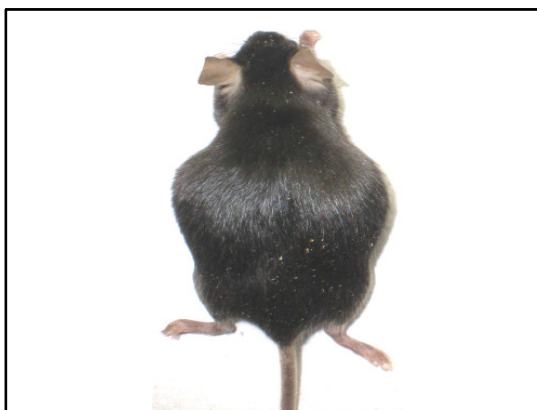


Figura 10. Sinais de doenças causadas pela inoculação e.v. das linhagens celulares *RMA.Egfp* e *RMA-S.Egfp* em comparação ao animal controle. As fotos ilustram camundongos C57BL/6 selvagens controle (acima) inoculado com solução salina, animal paralisado (centro) inoculado com células *RMA.Egfp* e animal com ascite (abaixo), inoculado com células *RMA-S.Egfp*, após 21 dias e 30 dias da inoculação, respectivamente. A foto do animal controle foi feita com 21 dias.

A progressão destes sinais foi muito rápida neste modelo, após o aparecimento do sinal aqui classificado como de n°1, os animais sobrevivem por cerca de uma semana (Fig.11). Ainda no modelo de inoculação de células RMA.*Egfp*, observou-se em alguns animais e em repetidos experimentos, o aparecimento de uma massa tumoral situada na frente, entre os olhos (Fig.12). Essa massa de células cresceu sobre o osso e após a retirada, maceramento e análise ao microscópio de fluorescência, constatou-se que as células expressavam a proteína EGFP (dados não mostrados).



Figura 11. Inchaço na região da frente de camundongo C57BL/6 selvagem inoculado e.v. com 1×10^6 células RMA.*Egfp*. Alguns dos animais que ficaram paralisados apresentaram também um inchaço na frente (indicado pela seta).

RMA.*Egfp*

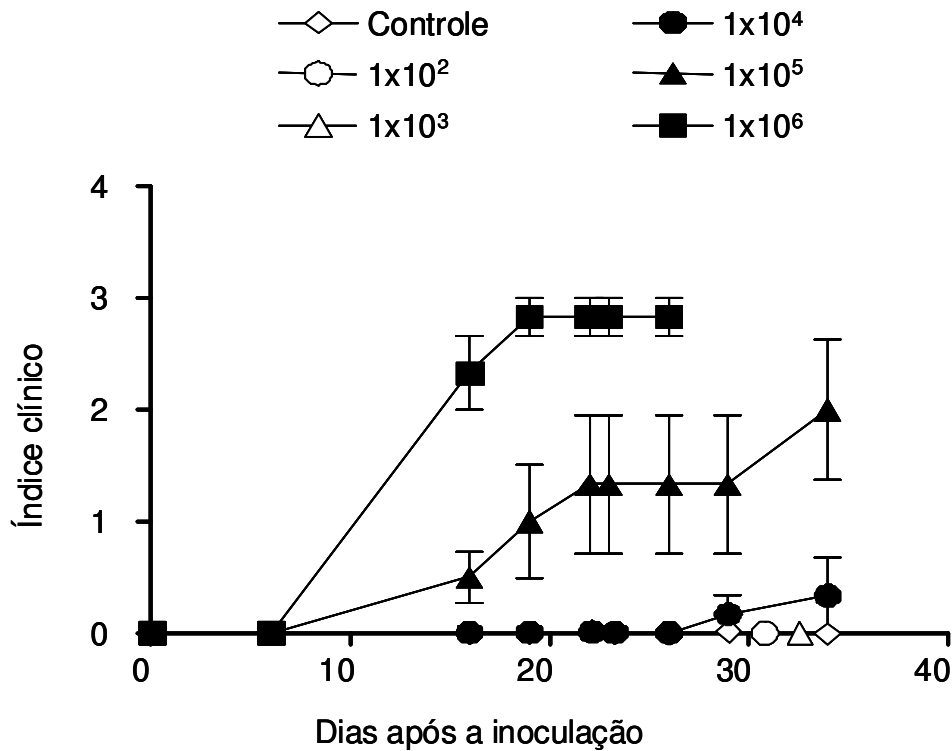


Figura 12. Índice clínico de paralisia de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com células RMA.*Egfp*. Gráfico representativo de um experimento, cujos animais foram inoculados e.v. com solução salina (Controle) ou números crescentes da linhagem celular RMA.*Egfp*. Os sinais de paralisia foram observados diariamente. A ordenada representa o grau de paralisia dos animais de acordo com a classificação: 1- perda do tônus da cauda; 2- paralisia da cauda e fraqueza dos membros posteriores; 3- paralisia da cauda e de membros posteriores; 4- paralisia da cauda, membros posteriores e fraqueza dos membros anteriores. As curvas representam as médias dos índices clínicos dos animais \pm erro padrão (Grupo Controle n=2, RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* n=6).

Quando inoculadas células RMA-S.*Egfp*, após cerca de 20-30 dias, os animais começaram a apresentar sinais de acúmulo de líquidos no abdome e, com o decorrer do tempo, a ascite era evidente.

A paralisia só foi observada quando inoculada a linhagem RMA.*Egfp* e a ascite, quando inoculada a linhagem RMA-S.*Egfp*. A inoculação de números $\leq 1 \times 10^3$ de ambas as linhagens celulares não provocaram o aparecimento de nenhum sinal clínico-patológico nos camundongos, os quais permaneceram iguais aos animais controles.

4.2.3 Variações de peso de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*

Nos camundongos inoculados com números $\geq 1 \times 10^4$ células de ambas as linhagens tumorais e que apresentaram os sinais clínicos patológicos descritos no item acima, foi observada variação de peso após o aparecimento dos sinais de doença. Após o aparecimento da paralisia, os animais inoculados com a linhagem RMA.*Egfp* deixaram de ganhar peso em comparação com os animais controles (ou perderam peso) e os animais inoculados com a linhagem RMA-S.*Egfp* e que apresentaram ascite, ganharam peso gradativamente. A figura 13 ilustra as médias das variações de peso dos animais em relação aos pesos iniciais, após a inoculação de 1×10^6 células tumorais de ambas as linhagens celulares ou solução salina (controle). O gráfico representa as médias da variação de peso de cada grupo até o momento em que o primeiro animal do grupo morreu. Em alguns animais foi possível observar uma perda ou ganho de peso sutil, porém em outros esta variação foi pronunciada, chegando a diminuir ou aumentar cerca de 20-30% do peso inicial (dados não mostrados).

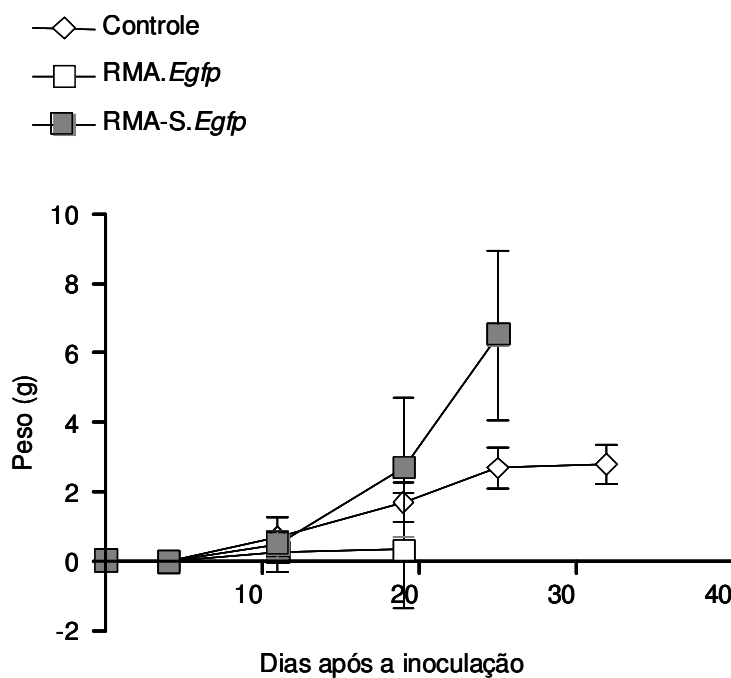


Figura 13. Variação de peso de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com as linhagens celulares RMA.*Egfp* ou RMA-S.*Egfp*. Gráfico representativo de um experimento, cujos animais foram inoculados com solução salina (Controle), 1×10^6 células RMA.*Egfp* ou RMA-S.*Egfp*. O peso dos animais foi observado diariamente, até o momento em que o primeiro animal de cada grupo morreu. No grupo controle, os animais foram sacrificados no dia 32. As curvas representam as médias das variações de peso dos animais \pm erro padrão (Grupo Controle n=2, RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* n=6). Gráfico representativo de 9 experimentos com células RMA.*Egfp* e 3 com células RMA-S.*Egfp*.

Os animais inoculados com solução salina continuaram a ganhar peso de forma sutil, de acordo com o desenvolvimento normal. Apesar de sobreviverem por mais dias, os dados dos animais controle foram mostrados neste gráfico somente até o dia 32 após o início do experimento.

4.2.4 Análise de infiltração tumoral em tecidos de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. de linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*

Após observar que a inoculação das duas linhagens celulares provocou doenças diferentes nos camundongos, decidiu-se analisar possíveis diferenças na migração e colonização de tecidos. Para isso, as seguintes análises foram feitas: análise macroscópica de alteração tecidual, análise de fluorescência verde proveniente das linhagens celulares no sangue e em macerados de tecidos por aquisição em citômetro de fluxo e análise microscópica de infiltração tumoral em lâminas histológicas de tecidos coradas com H&E. Após 21 dias da inoculação de 1×10^6 células de ambas as linhagens celulares, a maioria dos animais foram perfundidos com solução salina pelo coração para a retirada do sangue circulante dos tecidos e, assim, possibilitar a detecção das células tumorais que realmente colonizaram os tecidos.

Na análise macroscópica, foi possível observar que não houve alteração visível no cérebro, pulmão, timo e de tamanho de alguns linfonodos (dados não mostrados) nem no baço (Fig.14). Já os rins e o fígado de alguns animais inoculados com as linhagens celulares apresentaram alterações quando comparados aos órgãos controle.

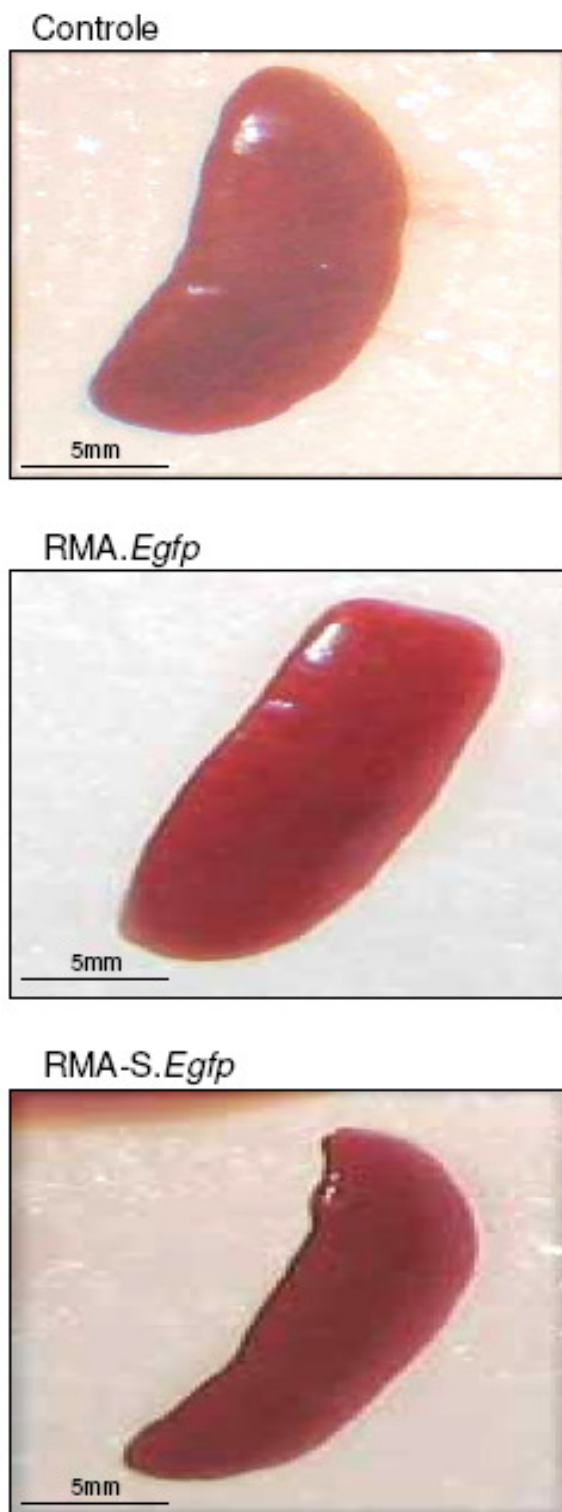


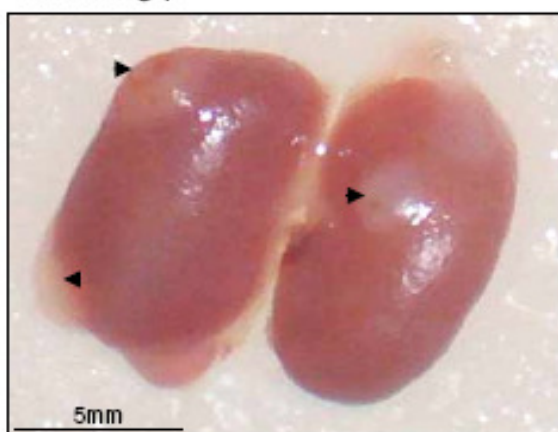
Figura 14. Aspecto macroscópico de baço de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados ou não com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com solução salina (Controle) (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro) ou RMA-S.*Egfp* (abaixo) e os órgãos foram retirados após 21 dias da inoculação.

A comparação dos rins de animais dos grupos controle e inoculados com as linhagens celulares é mostrada na figura 15. Nesta figura, observa-se que os rins do animal inoculado com a linhagem RMA.*Egfp* continha poucas manchas brancas e arredondadas na borda do tecido quando comparado ao controle, apesar deste aspecto não ter sido observado na maioria dos animais do grupo. Os rins do animal representativo do grupo inoculado com a linhagem RMA-S.*Egfp* estavam imersos em massa branca e, após a retirada do excesso desta massa, foi possível observar hemorragia no órgão e restos de massa tumoral branca, envolvendo-os.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

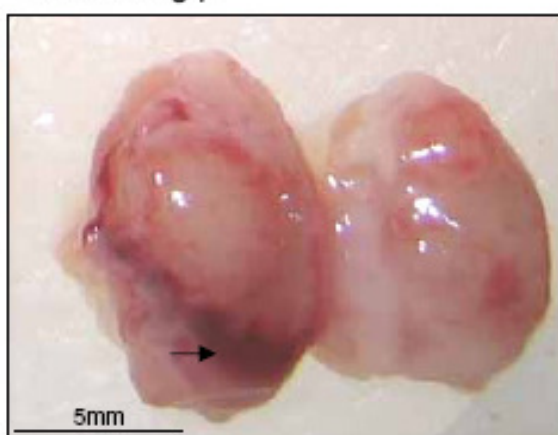


Figura 15. Aspecto macroscópico de rins de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados ou não com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com solução salina (Controle) (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro) ou RMA-S.*Egfp* (abaixo) e os órgãos foram retirados após 21 dias da inoculação. As cabeças de seta na foto central indicam manchas brancas devido a inoculação de RMA.*Egfp* e a seta na foto abaixo indica região de hemorragia após a inoculação de RMA-S.*Egfp*.

As alterações do fígado são ilustradas na figura 16, onde o fígado de um animal do grupo inoculado com a linhagem RMA.*Egfp* apresentou poucas alterações macroscópicas do tipo de pequenas manchas brancas, arredondadas, bem delimitadas e distribuídas, principalmente, nas bordas do órgão em comparação com o controle. Vale ressaltar que a maioria dos animais do grupo não apresentou tais alterações. No fígado do animal representativo do grupo inoculado com a linhagem RMA-S.*Egfp* foram observadas muitas manchas brancas, de maior diâmetro, também arredondadas, bem delimitadas e distribuídas, principalmente, nas bordas do órgão.

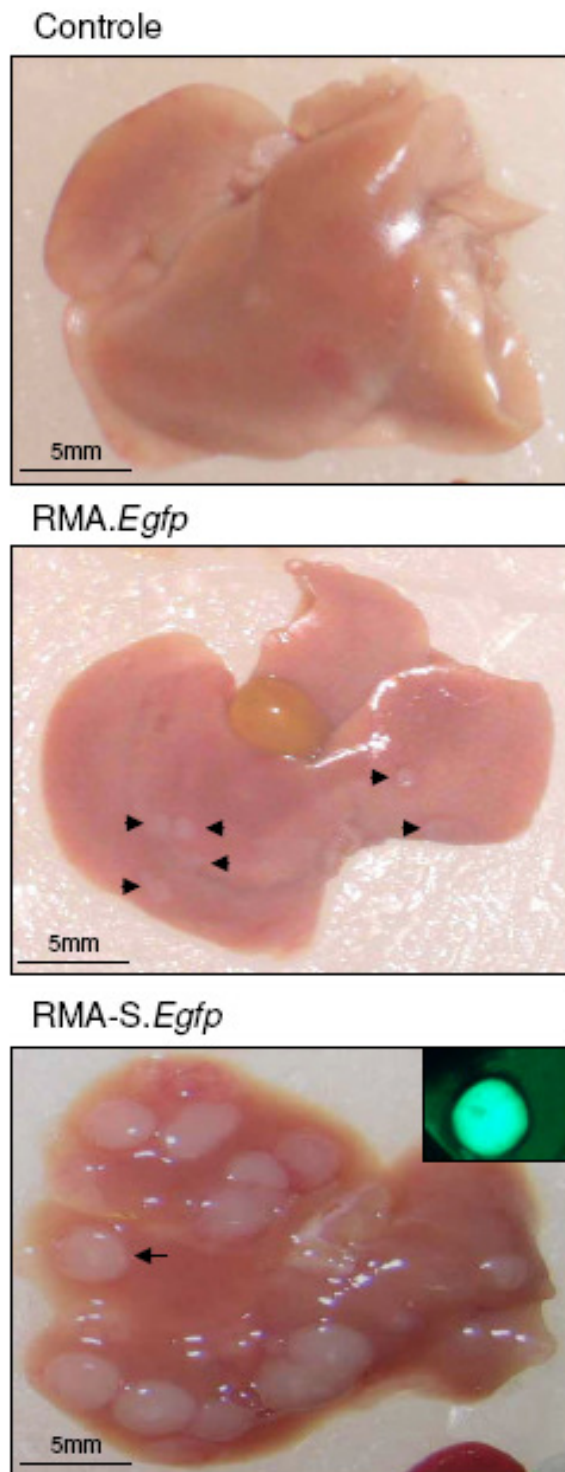


Figura 16. Aspecto macroscópico de fígado de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados ou não com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com solução salina (Controle) (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro) ou RMA-S.*Egfp* (abaixo) e os órgãos foram retirados após 21 dias da inoculação. As cabeças de seta na foto central indicam manchas brancas acumuladas após a inoculação de RMA.*Egfp* e as setas na foto abaixo indicam manchas acumuladas após a inoculação de RMA-S.*Egfp*. Na foto abaixo é mostrado no detalhe uma das manchas brancas observadas por lupa de fluorescência, com filtro 570 nm.

A análise de porcentagem de fluorescência verde no sangue e em macerados de tecidos e cavidade peritoneal também permitiu uma observação rápida sobre a infiltração de alguns tecidos pelas linhagens celulares. A análise no sangue foi feita somente em animais inoculados com a linhagem RMA.Egfp, 7, 14 e 21 dias após a inoculação e não foi detectada fluorescência verde nestas amostras (Fig. 17).

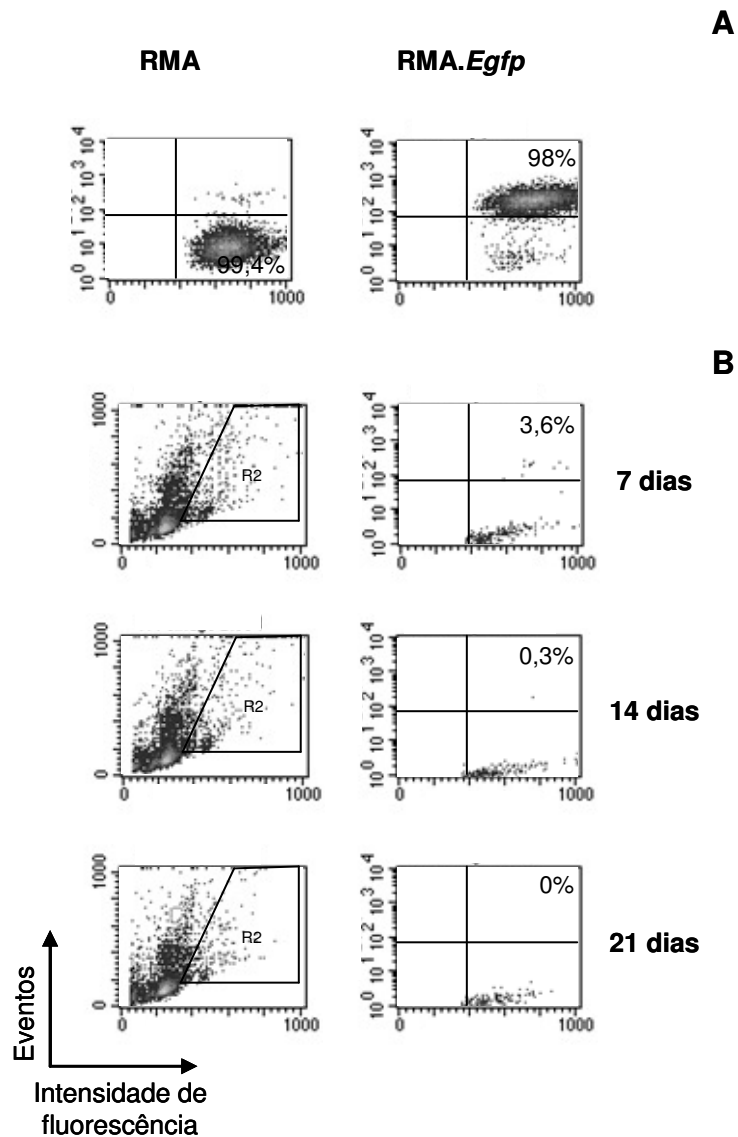


Figura 17. Ausência de células tumorais no sangue de camundongos C57BL/6 inoculados com células RMA.Egfp. Os animais foram inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.EGFP e após 7, 14 e 21 dias o sangue foi analisado por citometria de fluxo para detecção de células fluorescentes. Em (A), análise de linhagens tumorais RMA e RMA.Egfp usadas para *settings* do citômetro de fluxo para este experimento. Em (B), os gráficos ilustram a captura de células totais do sangue (esquerda) e a porcentagem de células cujo tamanho esperado de células tumorais (R2) fluorescentes (direita).

A figura 18 ilustra o gráfico da análise de detecção de fluorescência verde feita em tecidos linfóides, onde se observa porcentagem de fluorescência verde detectada, principalmente, na medula óssea de animais inoculados com a linhagem RMA.*Egfp*. Neste caso, a fluorescência verde detectada variou de 0,04-31,4% e apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação aos animais inoculados com a linhagem RMA-S.*Egfp* (variação de 0,01-2,15%) e aos animais controle. Menor fluorescência foi detectada no baço quando inoculada a linhagem RMA.*Egfp* (0,17-0,36%) e, semelhantemente, nas amostras inoculadas com RMA-S.*Egfp* (0-0,39%). Em ambos os casos, não houve diferença estatística quando comparadas aos macerados de baço dos animais controles. Nas amostras do *pool* de linfonodos e do timo também não foram detectadas porcentagens significativas de fluorescência quando inoculada a linhagem RMA.*Egfp* (0-0,02% e 0,04-1,3%, respectivamente) e, apesar de detectada em amostras de animais inoculados com a linhagem RMA-S.*Egfp* (0-6,26% e 0-6%, respectivamente), esta detecção foi observada em 2 e 1 animais, respectivamente. Em todos os casos, as amostras dos animais controles foram ajustadas para o valor zero.

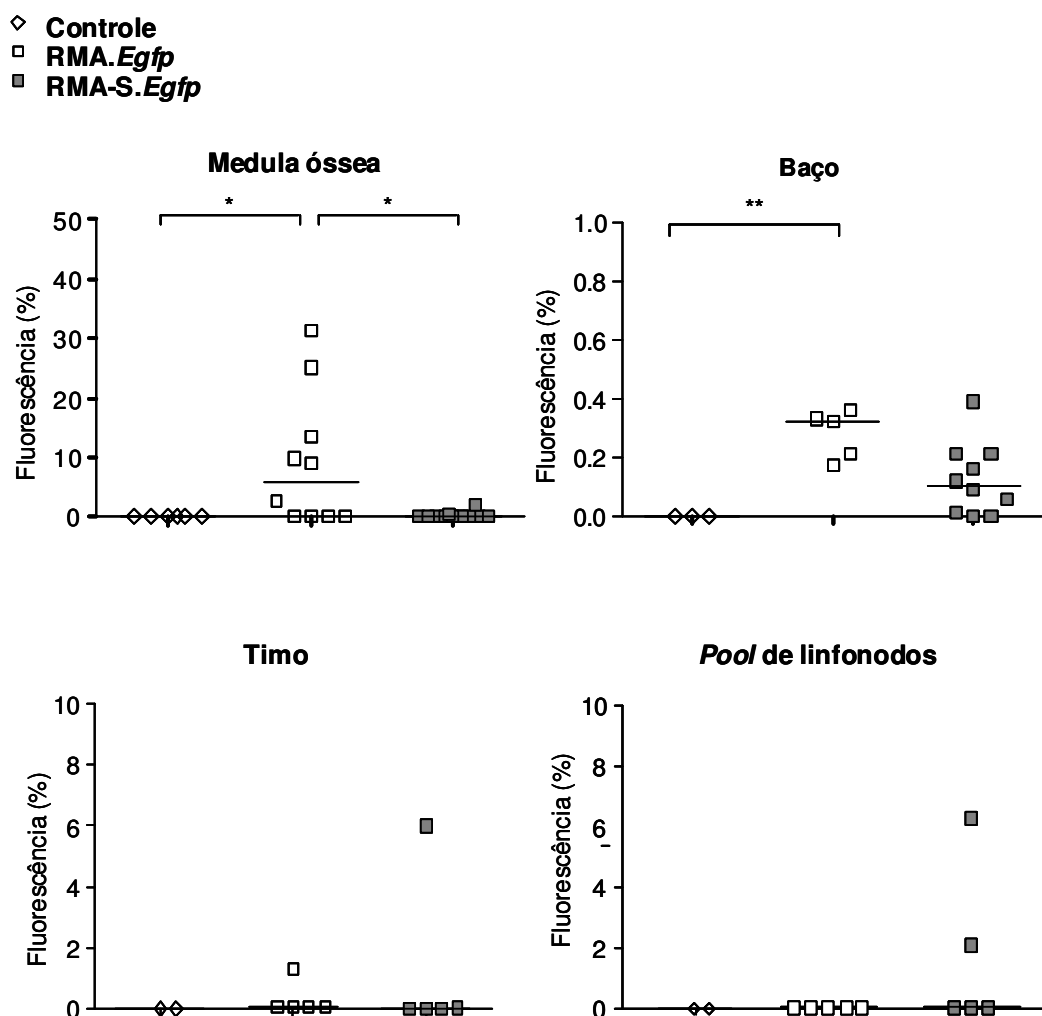


Figura 18. Perfil de infiltração de células RMA.Egfp e RMA-S.Egfp em órgãos linfóides de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. Os animais foram inoculados com solução salina (Controle), 1×10^6 células RMA.Egfp ou células RMA-S.Egfp e os órgãos macerados foram analisados quanto à presença de fluorescência verde, 21 dias após a inoculação, por citometria de fluxo, com filtro FL-1. Cada símbolo representa um animal de cada grupo analisado. As barras representam a mediana e o teste estatístico usado foi One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Na figura 19, observa-se a detecção de fluorescência verde em macerados de tecido não linfóides e no peritônio de animais dos grupos controle e inoculados com ambas as linhagens celulares. Nesta figura é possível observar que praticamente não há detecção significativa de fluorescência em tecidos não linfóides de animais inoculados com a linhagem RMA.Egfp (fígado-0-0,09%, rins-0-0,03%, pulmão-0,01-0,04% e peritônio-0,02-0,67%). Nas amostras de tecidos de animais inoculados com a linhagem RMA-S.Egfp não foram detectadas fluorescência no pulmão (0-0,21%), mas foram detectadas porcentagens no fígado

(0-7,62%), rins (0,01-6,89%) e no peritônio (0,06-81,48%). As amostras de animais controle foram tratadas como descrito acima.

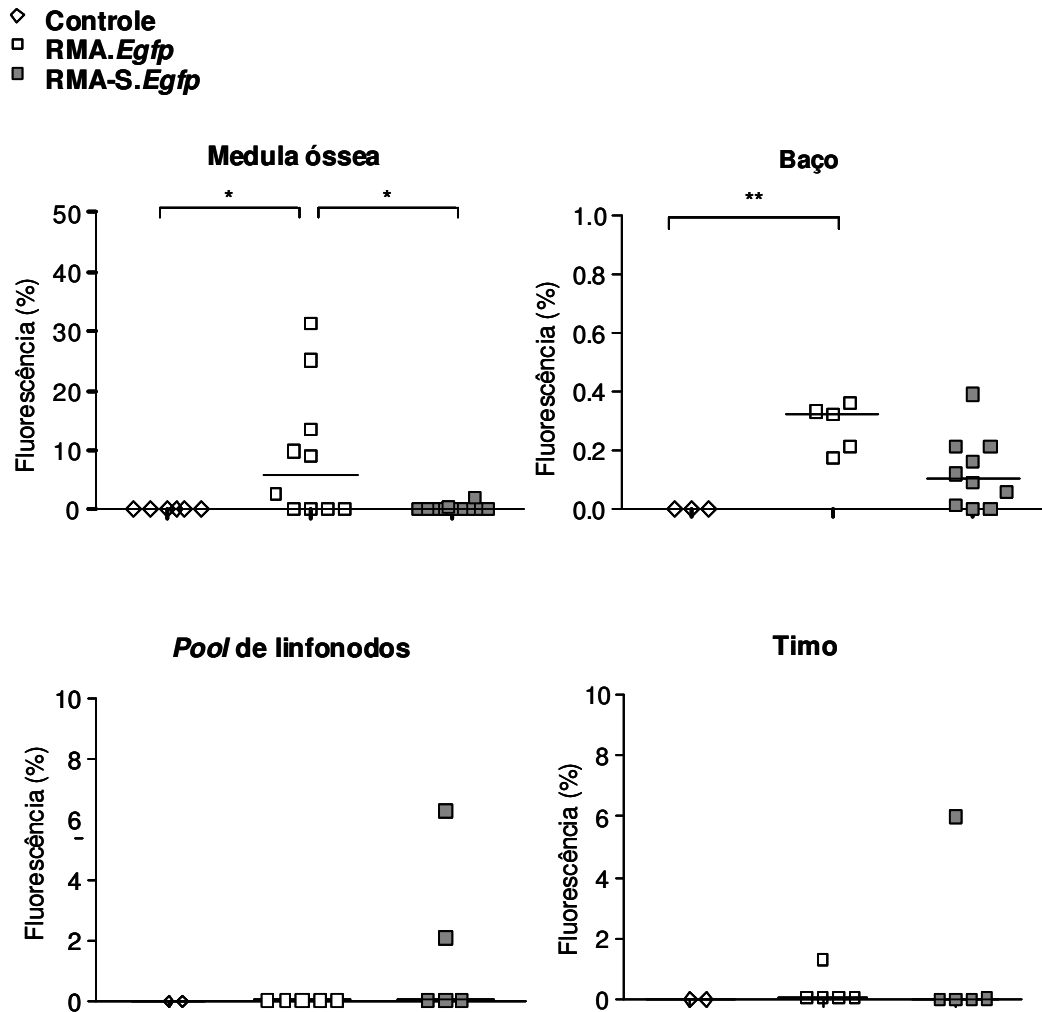


Figura 19. Perfil de infiltração de células RMA.Egfp e RMA-S.Egfp em órgãos não linfóides de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. Os animais foram inoculados com solução salina (Controle), 1×10^6 células RMA.Egfp ou células RMA-S.Egfp e os órgãos macerados foram analisados quanto à presença de fluorescência verde, 21 dias após a inoculação, por citometria de fluxo. Cada símbolo representa um animal de cada grupo analisado. As barras representam a mediana e o teste estatístico usado foi One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Para ilustrar a infiltração de células RMA-S.*Egfp* no peritônio, a figura 20 mostra fotos da cavidade abdominal feitas em lupa de fluorescência, comparando as cavidades peritoneais de um animal controle e de um animal inoculado com RMA-S.*Egfp* e que desenvolveu ascite pronunciada, após 29 dias da inoculação. Nestas fotos, observou-se que a cavidade peritoneal do animal controle, no campo escuro, não apresentou fluorescência verde. A fluorescência observada no intestino foi basal. No animal inoculado com a linhagem RMA-S.*Egfp*, a cavidade peritoneal apresentou grande quantidade de líquido, o qual estava totalmente fluorescente nesta observação. Ao contrário do observado no líquido do intestino do animal controle, o líquido peritoneal retirado deste animal continha inúmeras células que apresentavam fluorescência verdes quando analisadas ao microscópio de fluorescência (dado não mostrado), demonstrando se tratar das células RMA-S.*Egfp* que haviam sido inoculadas e.v

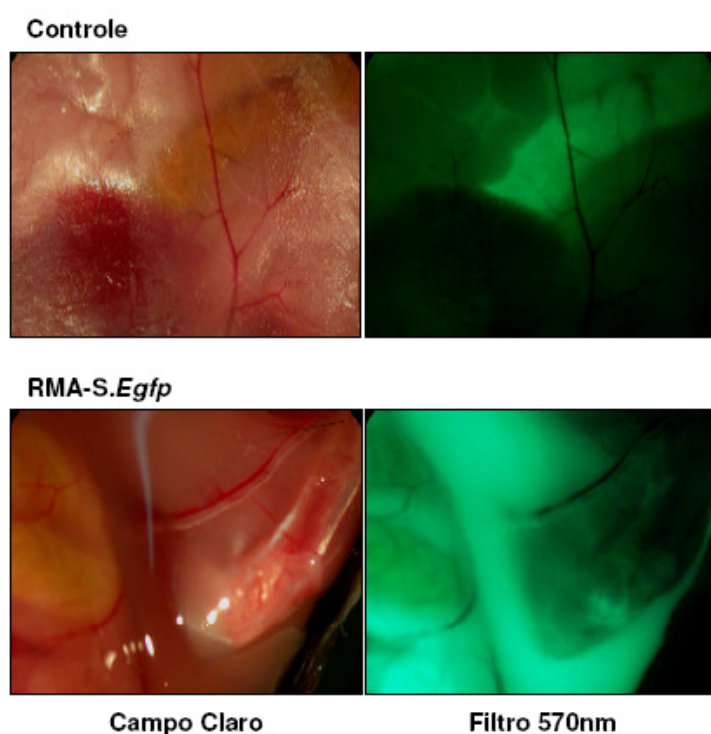
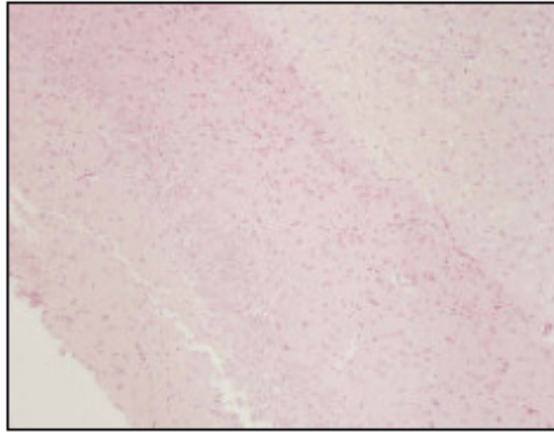


Figura 20. Acúmulo de células RMA-S.*Egfp* no peritônio de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA-S.*Egfp*. Os animais foram inoculados ou não e.v. com 1×10^6 células RMA-S.*Egfp*. As fotos ilustram as cavidades peritoneais de um animal controle (acima) e de um animal inoculado com células tumorais (abaixo), após 29 dias da inoculação. As fotos à esquerda foram tiradas em lupa de fluorescência com luz halogênica (campo claro) e as fotos à direita foram tiradas com filtro para detecção de fluorescência verde (500-570 nm).

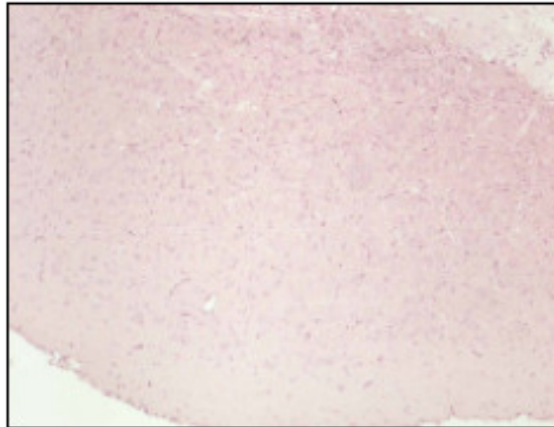
A última forma de avaliar a infiltração das linhagens celulares em tecidos foi a microscópica. Para isso, foram feitas lâminas histológicas de cérebro, pulmão, timo, linfonodos, baço, rins, fígado e coluna vertebral de camundongos C57BL/6 selvagens, após 21 dias da inoculação de solução salina (controle) ou das linhagens celulares tumorais. A seguir, são mostradas figuras que ilustram comparações entre fotos de tecidos de grupos inoculados com solução salina (controle) e dos inoculados com as linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*.

Nos cortes histológicos de cérebro (Fig. 21) e de pulmão (Fig. 22) não foram observadas infiltrações tumorais por nenhuma das duas linhagens tumorais e as estruturas destes órgãos foram semelhantes aos dos animais controles.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

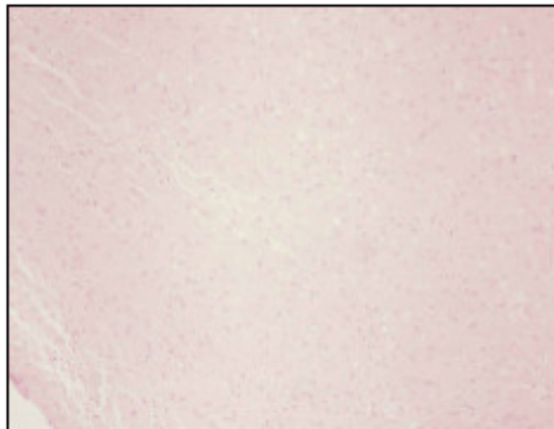
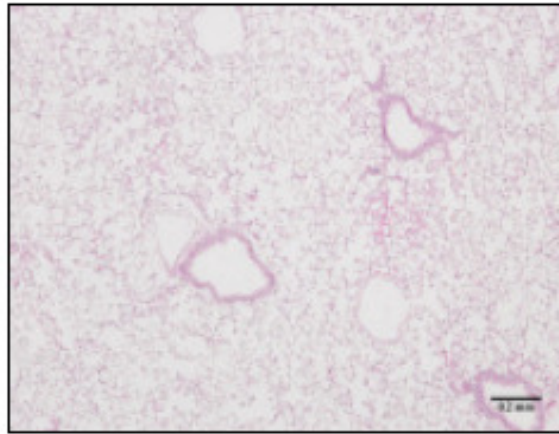
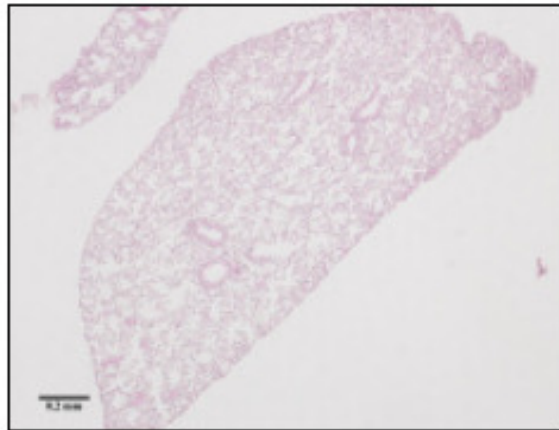


Figura 21. Ausência de células tumorais em cortes histológicos de cérebro de camundongos C57BL/6 selvagens. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro), e RMA-S.*Egfp* (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. As fotos foram tiradas com aumento de 100X.

Controle



RMA.Egfp



RMA-S.Egfp

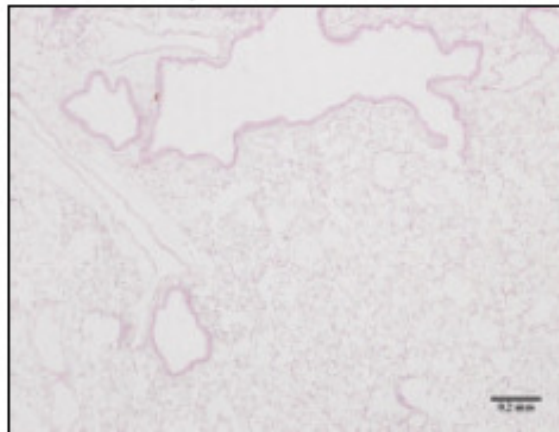
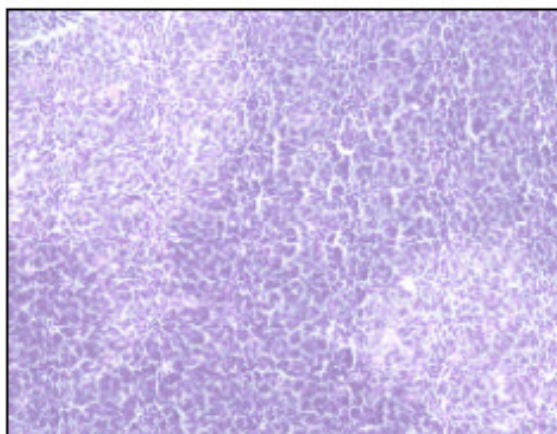


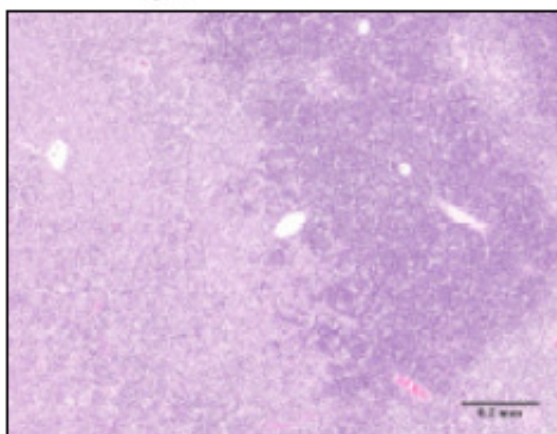
Figura 22. Ausência de células tumorais em cortes histológicos de pulmão de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados ou não com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.Egfp (centro), e RMA-S.Egfp (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. As fotos foram tiradas com aumento de 100X.

Na figura 23 é possível observar que o timo foi colonizado pelas células tumorais RMA.*Egfp* e não pelas células RMA-S.*Egfp*. A foto que ilustra o timo de um animal inoculado com células RMA.*Egfp* mostra que uma parte do tecido foi invadido pelas células tumorais, desorganizando a estrutura do órgão e outra parte, na mesma foto, não foi colonizada e a estrutura do tecido foi mantida.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

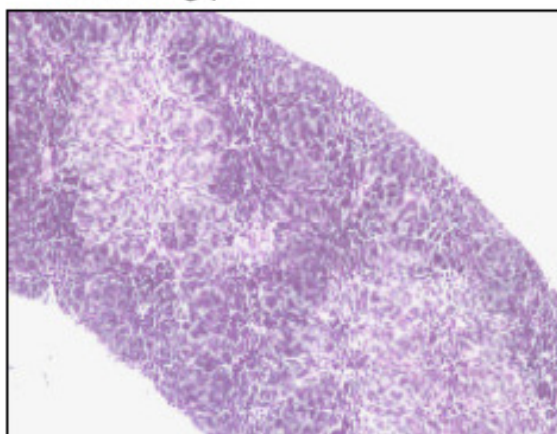


Figura 23. Presença de células tumorais em cortes histológicos de timo de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA.*Egfp*. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro), e RMA-S.*Egfp* (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra na foto central tem escala de 0,2 mm e as fotos acima e abaixo foram tiradas com aumento de 200X.

A figura 24 ilustra a análise de cortes de linfonodos, onde foi observada infiltração de alguns deles por células RMA.*Egfp*. A infiltração foi maior na região medular. No caso de linfonodos de animais inoculados com a linhagem RMA-S.*Egfp*, foram observadas infiltrações somente em alguns animais e de pequenas regiões do tecido, menores do que quando inoculada a outra linhagem celular.

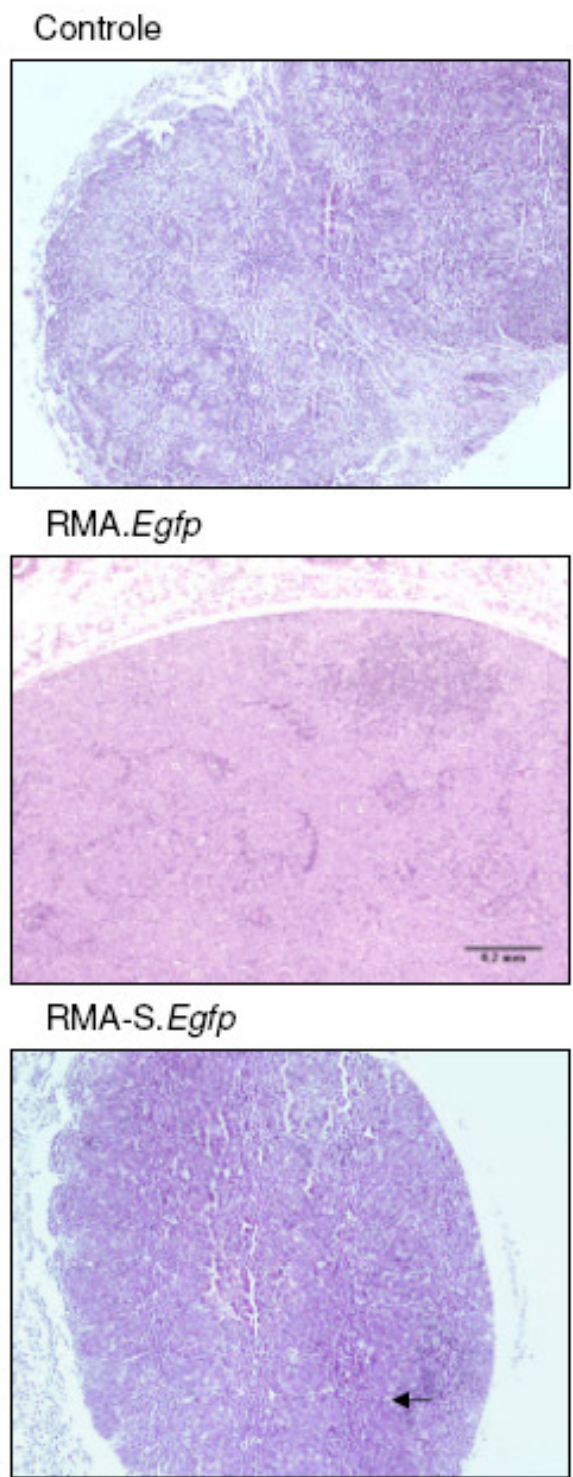
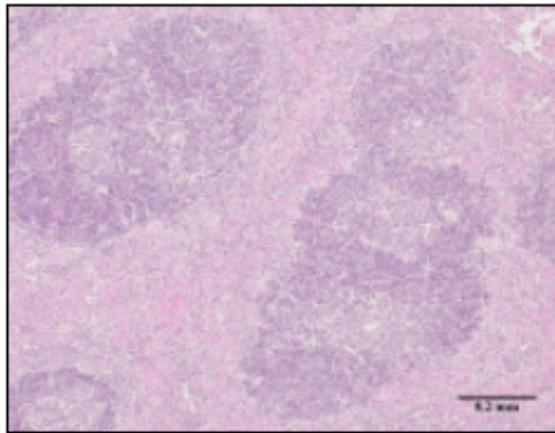


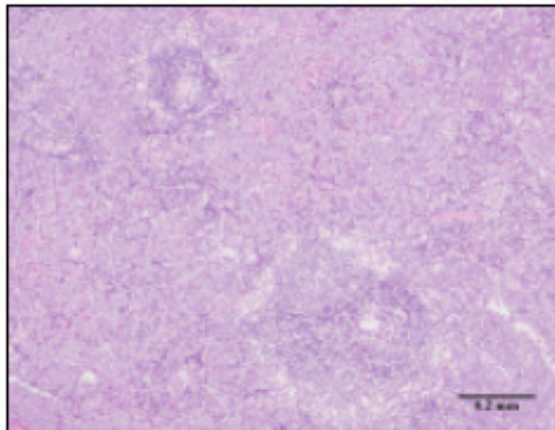
Figura 24. Presença de células tumorais em cortes histológicos de linfonodos de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.Egfp (centro), e RMA-S.Egfp (abaixo). No último caso, a seta mostra uma região com infiltração de algumas células tumorais. Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra na foto central tem escala de 0,2 mm e as fotos acima e abaixo foram tiradas com aumento de 100X.

A figura 25 ilustra fotos de regiões do baço. Nestas fotos, pode-se observar que o baço do animal controle apresentou estrutura normal do órgão, com as polpas tanto brancas quanto vermelhas bem limitadas. No caso dos animais inoculados com células RMA.*Egfp*, apesar da análise macroscópica não sugerir infiltração neste órgão e a análise de detecção de células fluorescentes por citometria de fluxo indicar pouquíssima infiltração por esta linhagem, na análise microscópica de alguns animais cujas perfusões não foram satisfatórias, observou-se pequenas regiões de infiltração deste órgão, onde se caracterizou a desorganização da estrutura básica do tecido pela infiltração de células tumorais, como ilustrado na foto. Nas lâminas de baço dos animais inoculados com a linhagem RMA-S.*Egfp* não foram observadas regiões de colonização tumoral na maioria dos animais do grupo e o tecido apresentava-se semelhante ao dos animais controle.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

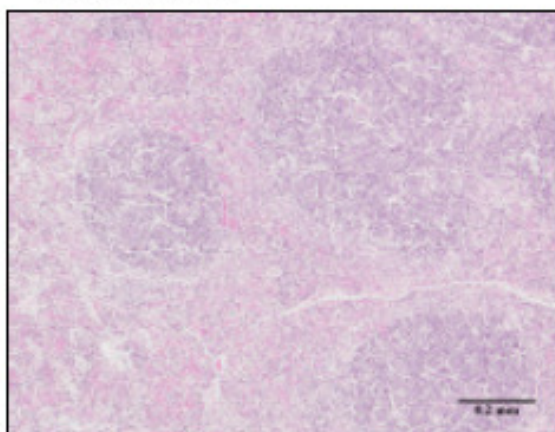
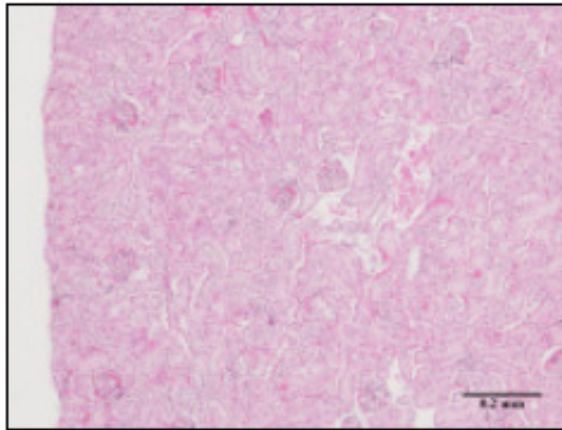


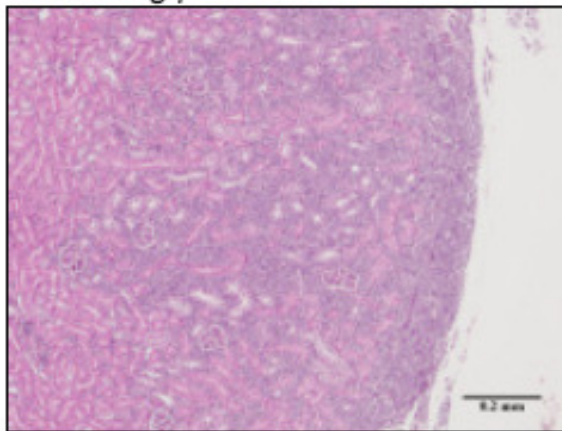
Figura 25. Presença de células tumorais em cortes histológicos de baço de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA.*Egfp*. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro), e RMA-S.*Egfp* (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra nas fotos tem escala de 0,2 mm.

No caso dos rins, a figura 26 ilustra o córtex renal com estrutura normal de corte histológico deste órgão de um animal representativo do grupo controle, onde é possível observar túbulos renais e glomérulos. Nos cortes de animais representativos dos grupos inoculados com as linhagens tumorais, foi observada infiltração maior do órgão por células da linhagem RMA-S.*Egfp* e que apresentaram ascite do que nos animais que não apresentavam ascite e nos que foram inoculados com células RMA.*Egfp*. No grupo inoculado com a linhagem RMA.*Egfp* e nos inoculados com RMA-S.*Egfp* e que não apresentaram ascite, observou-se que o tecido não foi totalmente colonizado e manteve a estrutura do córtex renal, apesar da infiltração das células tumorais pelos espaços dos glomérulos e túbulos renais. No grupo inoculado com a linhagem RMA-S.*Egfp* e que apresentaram ascite, porém, os órgãos estavam totalmente colonizados pelo tumor e desorganizados estruturalmente. Uma característica da colonização dos rins pelas células tumorais foi a infiltração do órgão pela periferia, acumulando-se na região peri-renal e infiltrando-se pelos espaços das células, glomérulos e túbulos.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

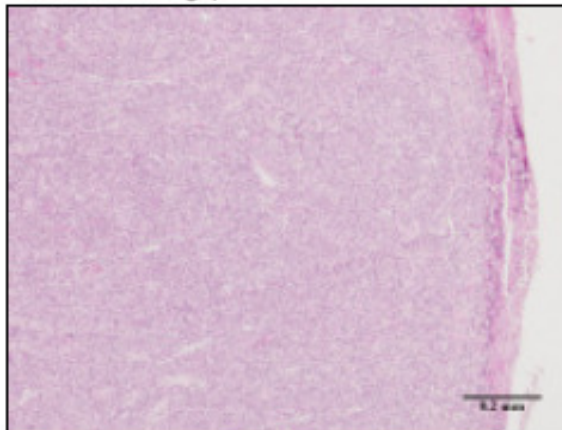


Figura 26. Presença de células tumorais em cortes histológicos de rim de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro), e RMA-S.*Egfp* (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra nas fotos tem escala de 0,2 mm.

No fígado, observou-se pela análise microscópica que ambas as linhagens tumorais migraram e colonizaram este órgão em comparação com o de animais controle (Fig. 27). O fígado de animais inoculados com células RMA-S.*Egfp* foi mais infiltrado do que o de animais inoculados com a linhagem RMA.*Egfp*. Na maioria dos cortes histológicos, observou-se que as células tumorais se espalharam a partir de uma veia, depositando-se ao redor destas e se acumularam nas bordas do órgão, possivelmente formando a região arredondada e de coloração branca observada macroscopicamente (ilustrado na foto do fígado de animal inoculado com RMA-S.*Egfp*). Mesmo nos cortes onde foram verificadas grandes áreas de infiltração pelas células tumorais, foram observadas regiões onde a estrutura do órgão estava preservada e os hepatócitos pareciam normais, como ilustrado na foto do fígado de animal inoculado com a linhagem RMA.*Egfp*.

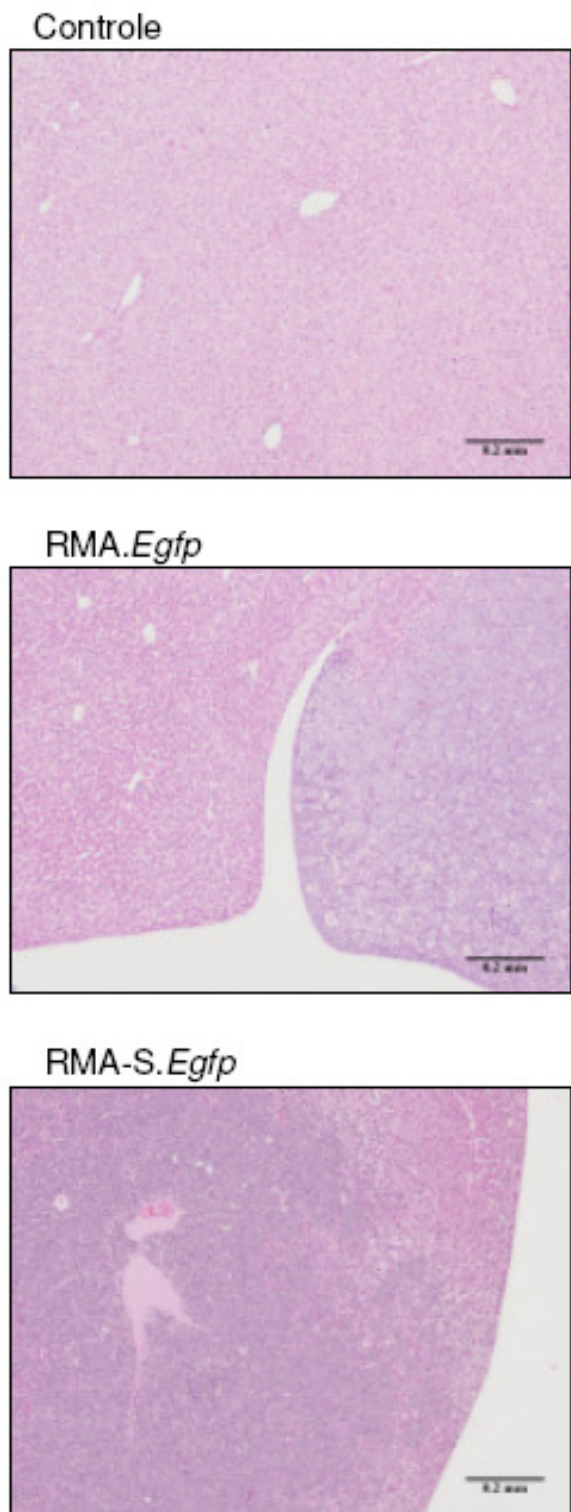
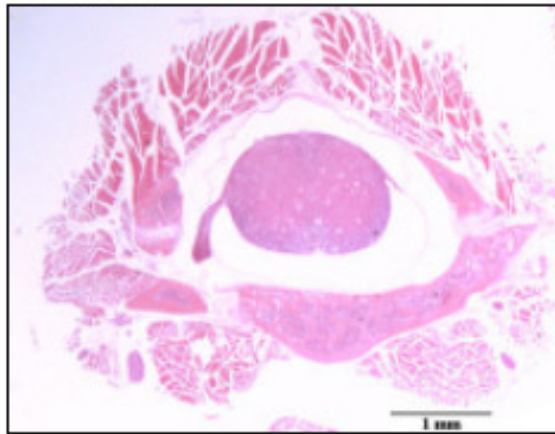


Figura 27. Presença de células tumorais em cortes histológicos de fígado de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA.Egfp e RMA-S.Egfp. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.Egfp (centro), e RMA-S.Egfp (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra nas fotos tem escala de 0,2 mm.

Na análise histológica de cortes da coluna vertebral foi observado que a medula óssea das vértebras foi infiltrada somente nos animais inoculados com células RMA.*Egfp* (Figura 28). Neste caso, as células invadiram totalmente este tecido, desorganizando-o e causando, inclusive, hemorragia neste local (Figura 29F). Essa observação foi feita na região da cauda equina, onde o tumor cresceu na medula óssea e pareceu extravasar este espaço, acumulando-se na superfície externa das meninges – região da dura-máter (Fig. 29A e B) e na região das emergências de nervos que controlam os membros pélvicos. Além disso, as células tumorais infiltraram a musculatura paravertebral, causando a necrose deste tecido (Fig. 29C). O acúmulo de células tumorais no espaço extradural provocou a compressão da medula espinhal e das raízes nervosas respectivas, onde foi possível observar algumas áreas de hemorragia no meio da substância cinzenta da medula espinhal, causada possivelmente pelo impedimento do fluxo sanguíneo neste local (Fig. 29D). O tecido nervoso na medula espinhal comprimida apresentou vacuolização dos locais onde existiam os axônios dos neurônios mortos (Fig. 29E). A distorção das vértebras observadas em alguns locais poderiam ter causado a perda do alinhamento entre os ossos e ter colaborado também para a lesão das raízes nervosas e, em consequência, a paralisia.

Controle



RMA.*Egfp*



RMA-S.*Egfp*

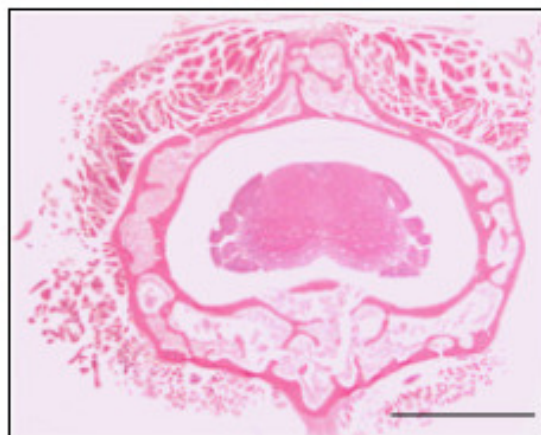


Figura 28. Presença de células tumorais em cortes histológicos de medula óssea paravertebral de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA.*Egfp*. Os animais foram inoculados e.v com solução salina - Controle (acima), 1×10^6 células RMA.*Egfp* (centro), e RMA-S.*Egfp* (abaixo). Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, a coluna vertebral retirados, descladificada e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. A barra nas fotos tem escala de 1 mm.

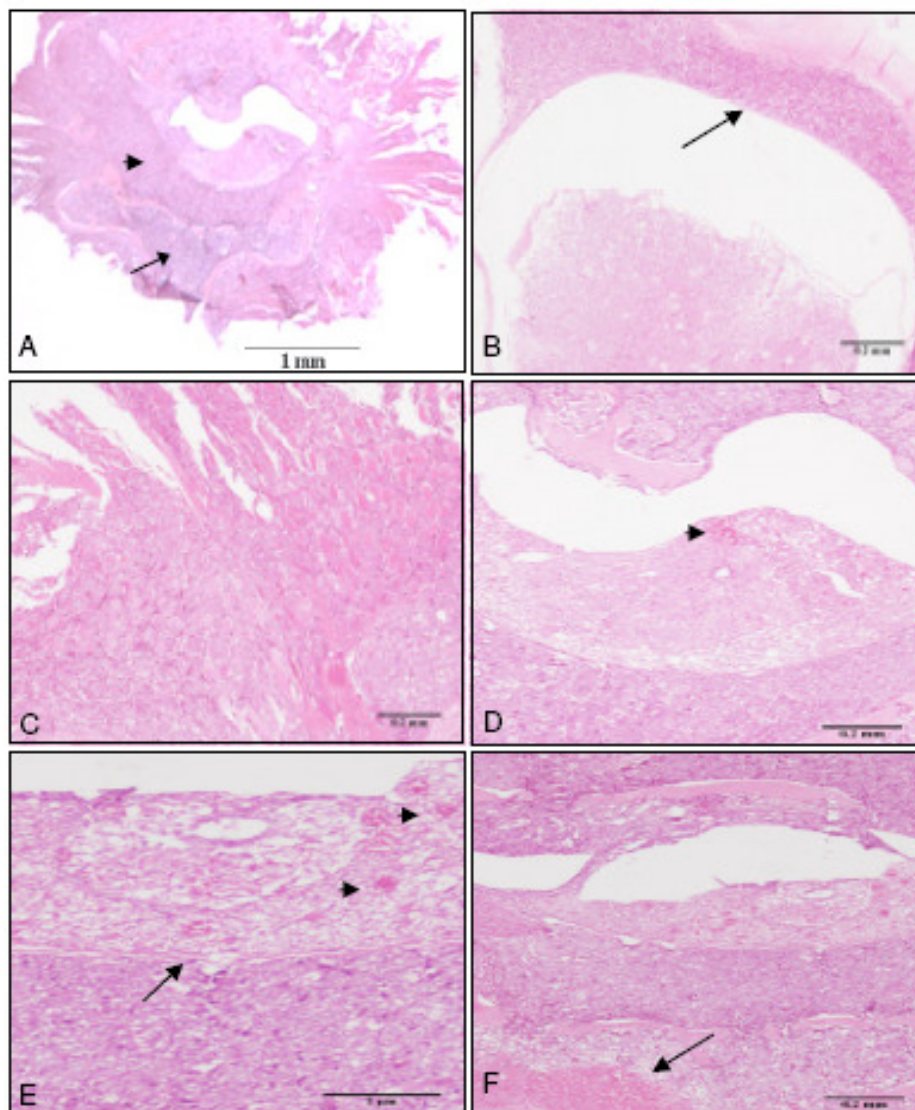


Figura 29. Comprometimento de musculatura paravertebral e tecido nervoso da medula espinhal de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp*. Após 21 dias das inoculações, os animais foram sacrificados e perfundidos com solução salina e paraformaldeído 4%. As lâminas foram coradas com H&E. A – Coluna vertebral ilustrando acúmulo de células tumorais na medula óssea da vértebra (seta) e no espaço extradural (cabeça de seta). B – Dura-máter preservada (seta) e acúmulo de tumor no espaço extradural acima desta barreira. C – Invasão tumoral na musculatura paravertebral. D – Compressão e achatamento da medula espinhal e hemorragia (cabeça de seta). E – Necrose de neurônios na região da medula espinhal (cabeças de seta), dura-máter (seta) e células tumorais abaixo da dura-máter. F- medula óssea da vértebra com hemorragia (seta). A barra nas fotos tem escala de 1 mm ou 0,2 mm.

Em resumo, observou-se que a linhagem RMA.*Egfp* infiltrou tecidos linfóides, principalmente, a medula óssea e, em menor proporção, infiltrou fígado e rins. A linhagem RMA-S.*Egfp* infiltrou, principalmente, tecidos não-linfóides, como fígado e rins, além da cavidade peritoneal. Pode-se dizer, ainda, que a paralisia decorrente da inoculação da linhagem RMA.*Egfp* pode ser devido ao comprometimento direto da musculatura paravertebral e indireto do sistema nervoso da medula espinhal e das raízes nervosas respectivas.

4.2.5 Análise de desenvolvimento de proteção contra paralisia e morte em camundongos C57BL/6 selvagens, após exposição prévia às linhagens celulares inoculadas e.v.

Neste ensaio foi avaliada a capacidade de animais previamente expostos a números pequenos de ambas as linhagens celulares (1×10^2 e 1×10^3 células) e, posteriormente, desafiados com quantidade de células RMA.*Egfp* que sabidamente causa paralisia, desenvolverem proteção contra a paralisia e morte. Para isso, camundongos C57BL/6 selvagens inoculados inicialmente com 1×10^2 e 1×10^3 de ambas as linhagens celulares e que não desenvolveram doença, após 120 dias, foram re-inoculados com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (Fig. 30A).

A Figura 30B ilustra a curva de sobrevivência dos camundongos, após a inoculação de solução salina (controle) ou 1×10^6 células RMA.*Egfp*. Foi observada maior porcentagem de animais sem sinais de doença nem morte nos grupos previamente inoculados com 1×10^3 células de ambas as linhagens celulares (RMA.*Egfp* – 66,7% e RMA-S.*Egfp* – 50%) do que os inoculados com 1×10^2 células (RMA.*Egfp* – 40% e RMA-S.*Egfp* – 16,7%). Os animais previamente inoculados com as células RMA.*Egfp* apresentaram maior porcentagem de sobrevivida e sem sinais de doença (1×10^2 – 40% e 1×10^3 – 66,7%) do que os previamente inoculados com células RMA-S.*Egfp* (1×10^2 – 16,7% e 1×10^3 – 50%). No grupo de animais previamente inoculados com solução salina e posteriormente inoculados com células 1×10^6 RMA.*Egfp* foi observada paralisia e morte em todos os animais do grupo.

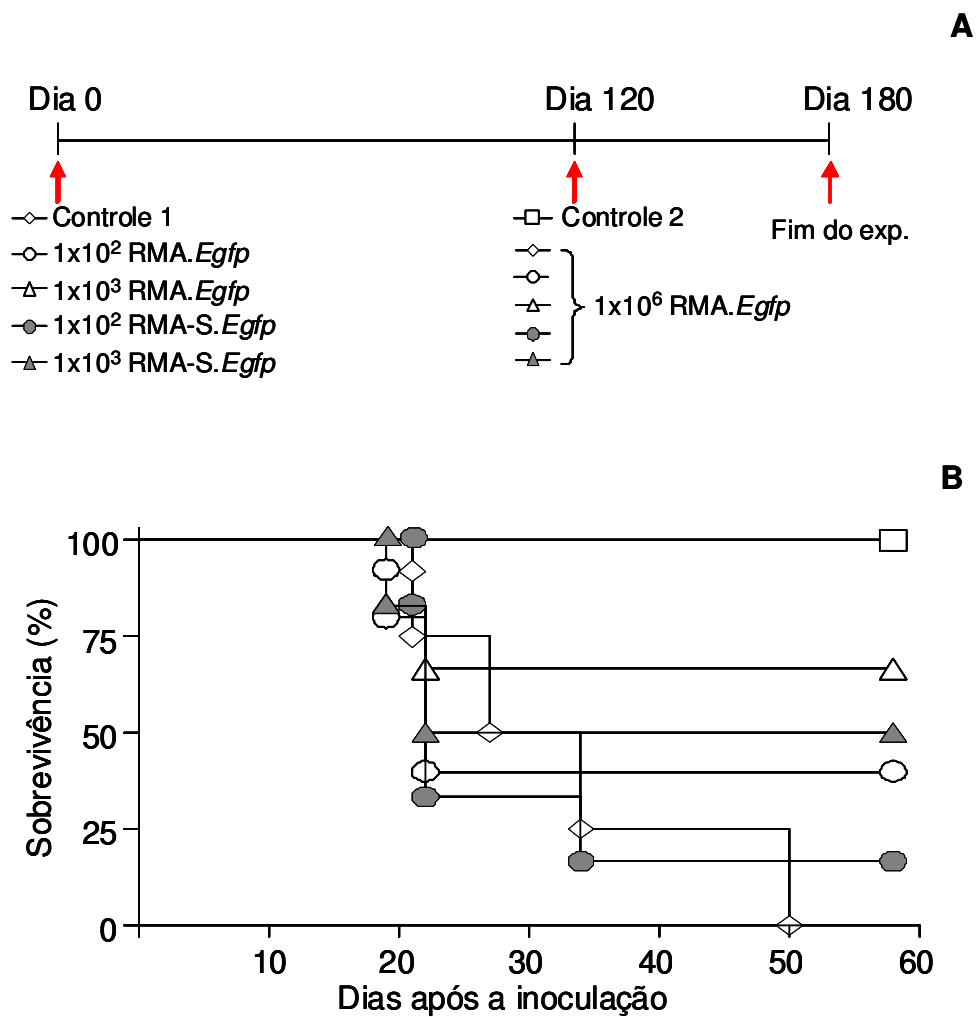


Figura 30. Ensaio de proteção contra tumor. Em (A), *flow-chart* do experimento. Após quatro meses da primeira inoculação e.v. com solução salina (Controle 2), 1×10^2 e 1×10^3 células RMA.Egfp e RMA-S.Egfp, os animais foram inoculados com 1×10^6 células RMA.Egfp e a sobrevivência foi acompanhada diariamente. Em (B), curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens desafiados com 1×10^6 células RMA.Egfp e.v. O Controle 1 representa o grupo de animais que foi inoculado com solução salina no momento do desafio e o Controle 2, o grupo de animais inoculados previamente com solução salina e, neste experimento, inoculado com 1×10^6 células RMA.Egfp ($n=4$). Os dados são mostrados em gráfico do tipo Kaplan Meyer. A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank ($P=0,57$ entre as curvas). Grupo previamente inoculado com 1×10^2 RMA.Egfp $n=5$, demais grupos $n=6$. O gráfico mostra os resultados de 1 experimento.

4.2.6 Análise da importância de linfócitos T CD4 e CD8 na resposta antitumoral no modelo murino de linfoma

Neste ensaio foi avaliada a importância dos linfócitos T helper (CD4) e dos citotóxicos (CD8) na resposta antitumoral no modelo de paralisia induzida por tumor desenvolvido neste

trabalho. Para isso, camundongos selvagens e *knockouts* (KO) de linfócitos T CD4 e de CD8 foram inoculados com 1×10^6 células RMA.*Egfp*.

A Figura 31 ilustra a curva de sobrevivência de animais selvagens, CD4KO e CD8KO, onde se observou que os selvagens apresentaram um atraso no início das mortes em comparação aos dois grupos de animais *knockouts* (cerca de 5 dias). As médias de sobrevivência dos animais foram de 33,5 dias no grupo de selvagens, 24 dias no grupo CD4KO e 26 dias no grupo CD8KO.

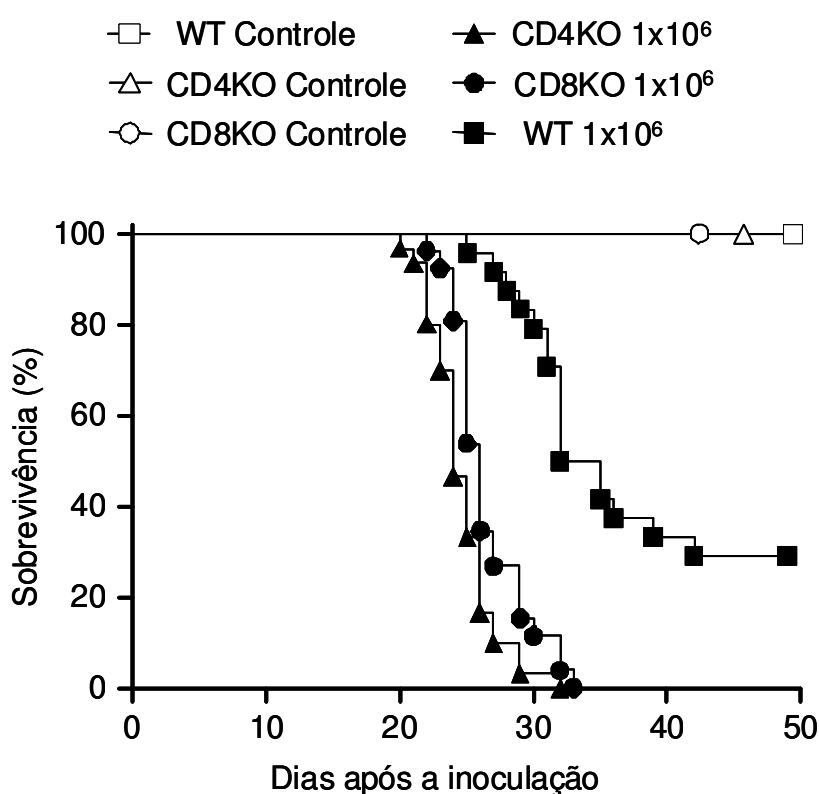


Figura 31. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens, CD4KO e CD8KO inoculados e.v. com células RMA.*Egfp*. Os animais foram injetados com 0,2 ml de solução salina (Controle) ou com 1×10^6 células RMA.*Egfp*. Os dados são mostrados em gráfico do tipo Kaplan Meyer. A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank ($P < 0,001$ entre as curvas. Grupos Controles – WT, CD4KO e CD8KO $n=3$; Grupos inoculados com 1×10^6 células tumorais – WT $n=24$; CD4KO $n=30$; CD8KO $n=26$). WT – selvagens (*Wild Type*) e KO – *knockouts*.

A tabela 5 lista os experimentos utilizados para a construção desta curva de sobrevivência.

Tabela 5: Inoculação e.v. de 1×10^6 células RMA.*Egfp* provoca paralisia e morte de camundongos C57BL/6 WT, CD4KO e CD8KO.

C57BL/6 W T			
Nº de células inoculadas e.v.	Paralisia e morte	Dia da morte	Nº do experimento
1×10^6	6/10	$31,5 \pm 2,8$	22
1×10^6	1/4	42	23
1×10^6	5/5	$30,6 \pm 5,4$	25
1×10^6	5/5	$32,8 \pm 2,2$	26
C57BL/6 CD4KO			
1×10^6	10/10	$24,2 \pm 2,6$	22
1×10^6	9/9	$25,1 \pm 2,2$	23
1×10^6	6/6	$26,5 \pm 2,8$	25
1×10^6	5/5	$22,6 \pm 0,5$	26
C57BL/6 CD8KO			
1×10^6	9/9	$27 \pm 3,2$	22
1×10^6	7/7	$27 \pm 2,8$	23
1×10^6	7/7	25	25
1×10^6	3/3	$27,7 \pm 5$	26

Ainda neste ensaio, foi observado que as curvas das médias dos graus de paralisia dos grupos *knockouts* foram semelhantes entre si (não houve diferença estatisticamente significativa) e a curva dos animais selvagens, apesar de parecerem apresentar um atraso em relação aos grupos *knockouts*, também não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 32A).

Após o aparecimento da paralisia (cerca de 15 dias após a inoculação), os animais inoculados com células tumorais começaram a perder peso em relação aos pesos iniciais (Figura 32B) enquanto os animais inoculados com solução salina continuaram a ganhar peso sutilmente, de acordo com o desenvolvimento normal dos animais. Dentre os grupos que perderam peso, o dos animais CD4KO foi o que apresentou a maior queda de peso.

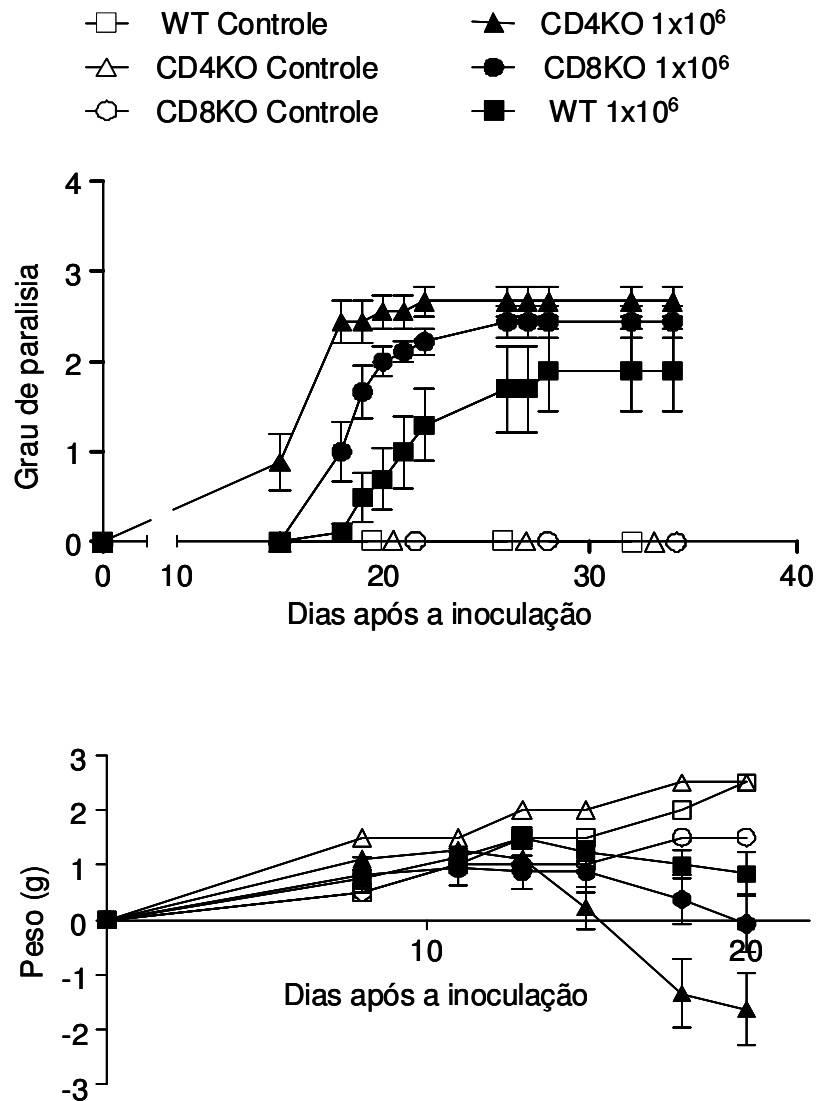


Figura 32. Índice clínico de paralisia e variação de peso de camundongos C57BL/6 WT, CD4KO e CD8KO inoculados e.v. com células RMA.*Egfp*. Os animais foram injetados com 0,2 ml de solução salina (Controle) ou com 1x10⁶ células RMA.*Egfp*. Em (A), índice clínico de paralisia. A ordenada representa o grau de paralisia dos animais de acordo com a classificação citada na figura 12. As curvas representam as médias dos índices clínicos dos animais ± erro padrão. Em (B), variação de peso. O peso dos animais foi observado diariamente, até o momento em que o primeiro animal de cada grupo morreu. As curvas representam as médias dos pesos ± erro padrão. Grupos Controles WT n=1; CD4KO n=1 e CD8KO n=1. Grupos inoculados com células tumorais WT n=10; CD4KO n=10 e CD8KO n=9. WT – selvagem (*Wild Type*) e KO – *knockouts*.

Com base nos resultados deste ensaio, pode-se sugerir que a presença destas populações de linfócitos promoveu uma melhora da sobrevivência e do quadro clínico-patológico dos animais no modelo de paralisia induzida por tumor.

Como último objetivo deste trabalho, decidiu-se avaliar o impacto da expressão ectópica de genes relacionados a apoptose no comportamento *in vivo* de linhagens celulares transformadas. Para alcançar essa meta, 5 genes relacionados a apoptose foram clonados no vetor bicistrônico pMX.IRES.Egfp durante o estágio “sanduíche” feito no laboratório do Dr. Seamus J. Martin (Trinity College, Dublin, Ireland). Os genes clonados foram *BclW*, *BclxL*, *Ciap1*, *Ciap-2* e *Xiap*, todos humanos. A figura 2 (materiais e métodos) ilustra o vetor retroviral pMX.*BclW*.Egfp. Após a clonagem, foram feitos sequenciamentos de DNA dos genes clonados para checar a integridade das sequências inseridas. Como mostra, por exemplo, a figura 33, o DNA do gene *BclW* clonado no vetor retroviral apresentou similaridade na maior parte da sequência quando comparado com a sequência depositada no NCBI (número de acesso da sequência - BT019549). Apesar de terem ocorrido 3 substituições de bases após a clonagem, isso não acarretou alteração na sequência protéica, como mostra a figura 34. No caso do gene *BclW*, a sequência é bem conservada entre mamíferos (Fig. 35).

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
Bcl-W NCBI	ATGGCGACCCAGCCTTGGCCCCAGACACACGGGCTTGGTGGCAGACTTGTGAGCTATAAGCTGACGGCAGAAAGGTTATGTCTGTGG								
Bcl-W 7	ATGGCGACCCAGCCTTGGCCCCAGACACACGGGCTTGGTGGCAGACTTGTGAGCTATAAGCTGACGGCAGAAAGGTTATGTCTGTGG								
Consensus	atggcgacccagccttggcccccagacacacgggcttgg								
	91	101	111	121	131	141	151	161	171
Bcl-W NCBI	GCTGGCCDCGGGAGGGCCAGCAGCTGACCTGTTGCAACCAAGCCATGCGGGCAGCTGGAGATGATTCGAGACCCGCTTCGGCCGCAAC								
Bcl-W 7	GCTGGCCDCGGGAGGGCCAGCAGCTGACCTGTTGCAACCAAGCCATGCGGGCAGCTGGAGATGATTCGAGACCCGCTTCGGCCGCAAC								
Consensus	gctggccdcgggagggccagcagctgacctgttgc								
	181	191	201	211	221	231	241	251	261
Bcl-W NCBI	TTCTGTGATGTGGCGGCTCAGCTGCATGTGACCCAGGCTCAGCCCAACACCGCTTCAACCGAGTCTCCGATGAACCTTTTCAAGGGGGC								
Bcl-W 7	TTCTGTGATGTGGCGGCTCAGCTGCATGTGACCCAGGCTCAGCCCAACACCGCTTCAACCGAGTCTCCGATGAACCTTTTCAAGGGGGC								
Consensus	ttctgtgatgtggcggctcagctgc								
	271	281	291	301	311	321	331	341	351
Bcl-W NCBI	CCCAACTGGGGCCGCTTTGATGCTTCTTTGTCTTTGGGGTGGACTGTGTGTGAGAGTGTCAACAGGAGATGSAACCACTGGTGGGA								
Bcl-W 7	CCCAACTGGGGCCGCTTTGATGCTTCTTTGTCTTTGGGGTGGACTGTGTGTGAGAGTGTCAACAGGAGATGSAACCACTGGTGGGA								
Consensus	cccaactggggccgctttgatgcttctttgtctttg								
	361	371	381	391	401	411	421	431	441
Bcl-W NCBI	CAAGTGCAGGAGTGGATGGTGGCTACCTGGAGACGGGCTGGCTGACTGGATTCACAGCAGTGGGGCTGGCCGSAAGTTCACAGCTCTA								
Bcl-W 7	CAAGTGCAGGAGTGGATGGTGGCTACCTGGAGACGGGCTGGCTGACTGGATTCACAGCAGTGGGGCTGGCCGSAAGTTCACAGCTCTA								
Consensus	caagtgcaggagtggatgg								
	451	461	471	481	491	501	511	521	531
Bcl-W NCBI	TACGGGACCGGGCCCTGGAGGAGGCGGGCTGTGGGGGAGGGAACTGGGATCAGTGAGGACAGTGTGACGGGGCCGCTGGACTG								
Bcl-W 7	TACGGGACCGGGCCCTGGAGGAGGCGGGCTGTGGGGGAGGGAACTGGGATCAGTGAGGACAGTGTGACGGGGCCGCTGGACTG								
Consensus	tacgggacggggccctggag								
	541	551	561	571	581	591	601	611	621
Bcl-W NCBI	GGGGCCCTGGTAACTGTAGGGCCCTTTTGTGCTAGCAAGTAG-----								
Bcl-W 7	GGGGCCCTGGTAACTGTAGGGCCCTTTTGTGCTAGCAAGTAG-----								
Consensus	ggggccctggtaaactgtagggccctttt								

Figura 33. Sequência de DNA do gene *BclW*. O clone 7 de pMX.*BclW*.IRES.*Egfp* foi sequenciado e comparado com a sequência depositada no banco de dados NCBI (número de acesso da sequência BT019549). Os dados em amarelo destacam as similaridades, em vermelho são destacadas as substituições de base em comparação com a depositada no NCBI.

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
Bcl-W NCBI	MATPASAPDTRALVADFYGFKLRLQKGFVCGAGTGGGPAADPLHQAMRAAGDEFPETRFKRTFSDLAAGLHVTPGSAQQRFTQVSDLELFOGG								
Bcl-W 7	MATPASAPDTRALVADFYGFKLRLQKGFVCGAGTGGGPAADPLHQAMRAAGDEFPETRFKRTFSDLAAGLHVTPGSAQQRFTQVSDLELFOGG								
Consensus	matpasapdtralvadfyg								
	91	101	111	121	131	141	151	161	171
Bcl-W NCBI	PNWGRIVAFFYFGAALCAEAVIKENEPLFGQVQEWNVAYLETPLADQIHSSGGGAEFTALYGGGALLEAPRLREGHWASVETVLTGAYAL								
Bcl-W 7	PNWGRIVAFFYFGAALCAEAVIKENEPLFGQVQEWNVAYLETPLADQIHSSGGGAEFTALYGGGALLEAPRLREGHWASVETVLTGAYAL								
Consensus	pnwgrivaffyfgaalcae								
	181	191	201	211	221	231	241	251	261
Bcl-W NCBI	GALVTVGAFPAASK*-----								
Bcl-W 7	GALVTVGAFPAASK*								
Consensus	galvtvga								

Figura 34. Sequência de aminoácido da proteína BCLW. As sequências de aminoácidos das proteínas BCLW dos clones 7 de pMX.*BclW*.IRES.*Egfp* foram traduzidas a partir da sequência de DNA e comparadas com a sequência depositada no banco de dados NCBI. Os dados em amarelo destacam as similaridades com a sequência depositada no NCBI.

Cloned	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	
hBcl-w	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	40
mBcl-w	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	40
rBcl-w	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	40
cBcl-w	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	40
bBcl-w	MATPASAPDTRALVADFVGYKLRQKGYVCGAGPGEGPAAD	40
Domínio BH1		
Cloned	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	
hBcl-w	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	80
mBcl-w	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	80
rBcl-w	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	80
cBcl-w	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	80
bBcl-w	PLHQAMRAAGDEFETRFRRTFSDLAAQLHVTPGSAQQRFT	80
Domínio BH1		
Cloned	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	
hBcl-w	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	120
mBcl-w	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	120
rBcl-w	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	120
cBcl-w	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	120
bBcl-w	QVSDELFQGGPNWGRLVAFFVFGAALCAESVKNKEMEPLVG	120
Domínio BH1		
Cloned	QVQEWNVAYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	
hBcl-w	QVQEWNVAYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	160
mBcl-w	QVQEWNVAYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	160
rBcl-w	QVQEWNVTYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	160
cBcl-w	QVQEWNVAYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	160
bBcl-w	QVQEWNVAYLETRLADWIIHSSGGWAEFTALYGDGALEEAR	160
Cloned	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	
hBcl-w	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	193
mBcl-w	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	193
rBcl-w	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	193
cBcl-w	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	193
bBcl-w	RLREGNWSVRTVLTGAVALGALVTVGAFFASK	193
hBcl-w	(AAB09055) <i>Homo sapiens</i>	
mBcl-w	(AAB09056) <i>Mus musculus</i>	
rBcl-w	(AAC64200) <i>Rattus norvegicus</i>	
cBcl-w	(AAZ22484) <i>Canis familiaris</i>	
bBcl-w	(BAF35574) <i>Bos taurus</i>	

Figura 35. Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína BCLW entre espécies de mamíferos. Os retângulos em cinza delimitam as similaridades entre as seqüências.

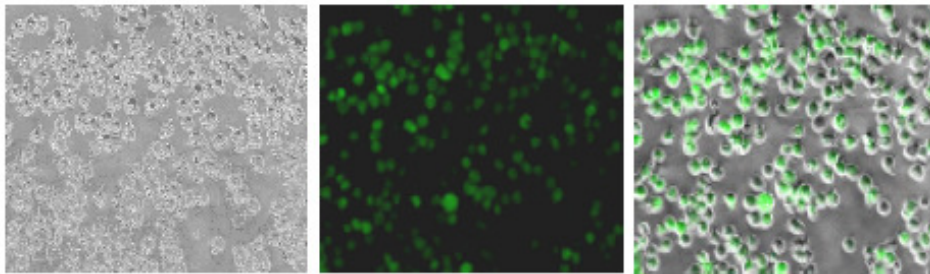
Em seguida, iniciaram-se experimentos de infecção de células RMA e RMA-S com os novos vetores e obteve-se uma nova linhagem celular, denominada RMA.*BclW.Egfp*, a qual foi utilizada para investigar o impacto da expressão de BCLW no modelo de paralisia induzida por tumor desenvolvido neste trabalho. A seguir são descritos os resultados obtidos com esta linhagem celular.

4.3 Caracterização *in vitro* da linhagem celular RMA transformada com o gene *BclW*

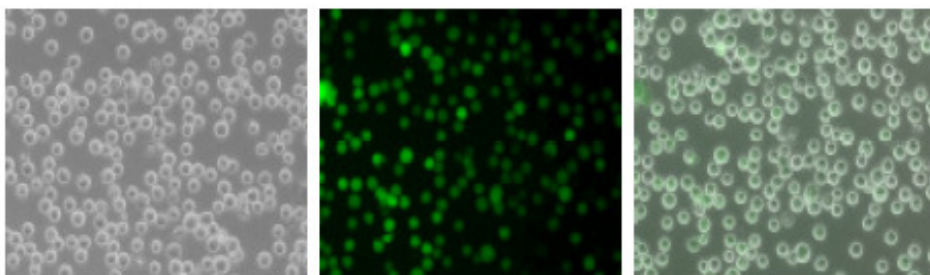
4.3.1 Expressão das proteínas EGFP, MHC de classe I e BCLW na linhagem celular RMA.*BclW.Egfp*

Após a obtenção da linhagem celular RMA.*BclW.Egfp*, a expressão da proteína EGFP foi verificada por microscopia de fluorescência (Fig. 36). A figura mostra que em ambas as linhagens celulares (infectada com o vetor vazio - RMA.*Egfp* e infectada com o vetor contendo o gene *BclW* - RMA.*BclW.Egfp*) foi detectada fluorescência verde no citoplasma quando observadas em campo escuro e filtro 570 nm, indicando que ambas expressavam a proteína EGFP. A sobreposição das imagens indica que as células visualizadas no campo claro eram as mesmas que expressavam a proteína fluorescente. A expressão protéica de EGFP é estável por várias passagens *in vitro* e *in vivo* (dados não mostrados).

RMA.Egfp



RMA.BclW.Egfp



Campo Claro

Filtro Egfp

Sobreposição

Figura 36. Expressão da proteína EGFP em células tumorais RMA.Egfp e RMA.BclW.Egfp. As células tumorais infectadas o vetor retroviral vazio e infectadas com o vetor que contém o gene *BclW* foram analisadas por microscopia de fluorescência em campo claro (esquerda) e em campo escuro, com filtro 510 nm (centro). A última coluna mostra a sobreposição das imagens.

A expressão desta proteína também foi verificada por citometria de fluxo, juntamente com a análise da expressão de MHC de classe I por marcação de moléculas de superfície celular com anticorpo anti-H2D^b-PE (Fig.37). A figura mostra que houve detecção de fluorescência em ambas as linhagens celulares, indicando que ambas expressavam tanto a proteína EGFP como a proteína de MHC de classe I.

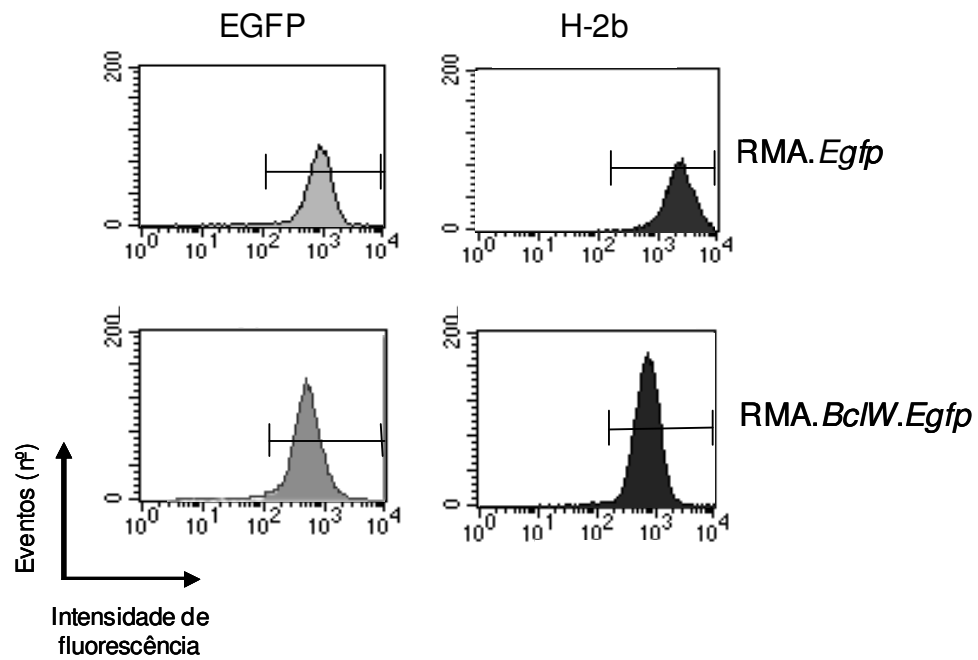


Figura 37. Expressão das proteínas EGFP e MHC classe I (H-2^b) em células infectadas com vetor vazio (RMA.Egfp) ou vetor contendo o gene *BclW* (RMA.BclW.Egfp). As análises foram feitas por citometria de fluxo, utilizando-se filtros FL-1 para detecção de EGFP e FL-2 para a detecção do anticorpo anti mouse H-2^b-PE. Foram adquiridos 10.000 eventos.

A expressão da proteína BCLW foi verificada por *Western Blot*. A figura 38 ilustra um ensaio representativo com as linhagens celulares RMA.EGFP e RMA.BclW.Egfp, onde se verifica a presença de banda de 21 kDa na célula BCLW positiva, indicando que esta linhagem expressa a proteína BCLW enquanto a linhagem infectada com o vetor vazio não expressa essa proteína.

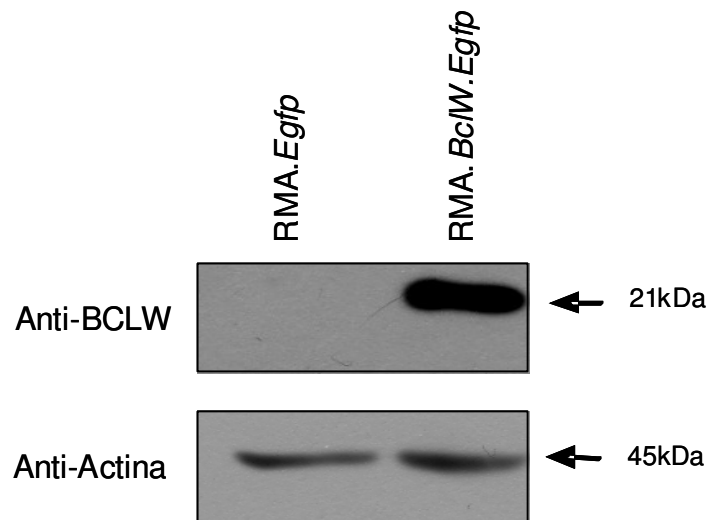


Figura 38. Expressão protéica em lisados de células RMA.Egfp e RMA.BclW.Egfp. As células foram infectadas com o vetor vazio ou vetor recombinante contendo o gene *BclW* e os lisados celulares foram marcados com anticorpos anti-BCLW. A análise foi feita por *Western Blot*. Como controle de expressão foi utilizado anticorpo anti-actina.

Após a verificação de que a linhagem celular RMA.BclW.Egfp expressava as proteínas EGFP, MHC de classe I e BCLW, iniciaram-se os experimentos *in vitro* e *in vivo* descritos a seguir.

4.3.2 Proliferação celular de RMA.BclW.Egfp *in vitro*

Antes de observar o comportamento da linhagem celular RMA.BclW.Egfp *in vivo*, as taxas de proliferação desta linhagem foram comparadas às taxas da linhagem RMA.Egfp, a fim de verificar se a proteína BCLW conferira alteração de proliferação celular *in vitro*. Para isso, foram feitos experimentos de contagem de células totais por períodos de tempo entre 24 e 96 horas.

A análise de um experimento representativo mostra que as taxas de proliferação celular *in vitro* de ambas as linhagens foram semelhantes entre si (Fig.39). A fase de latência

de ambas foi curta e não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de duplicação (15 e 12 horas para células BCLW negativas e positivas, respectivamente).

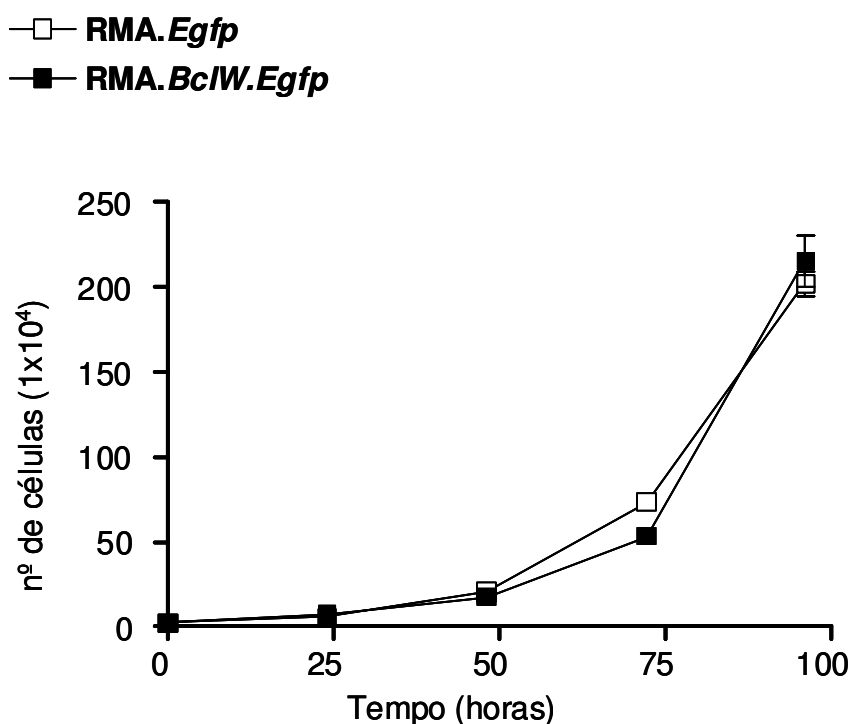


Figura 39. Curva de proliferação de células infectadas com vetor vazio e com vetor contendo o gene *BclW*, *in vitro*. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células de cada linhagem e as contagens dos números totais de células foram feitas a cada 24 horas, em câmara de Neubauer, por até 96 horas (triplicata). O tempo de duplicação de cada linhagem foi calculado em 15,6 e 12,4 horas para RMA.Egfp e RMA.BclW.Egfp, respectivamente (análise de regressão não linear). Os pontos representam média aritmética \pm desvio padrão.

4.3.3 Perfil de resistência à apoptose da linhagem celular RMA.BclW.Egfp *in vitro*

Considerando que a expressão da proteína BCLW confere resistência a apoptose, decidiu-se comparar os perfis de resistência à morte entre as linhagens celulares RMA.BclW positivas e negativas induzida por agentes quimioterápicos, *in vitro*.

Assim como descrito no item 4.1.3, foram utilizadas diferentes concentrações dos agentes quimioterápicos Cicloheximida (inibidor de síntese de proteína), Actinomicina D (inibidor de transcrição de DNA) e Etoposídeo (causador de dano ao DNA). As células foram incubadas com as drogas pelo período de 18 horas (triplicatas). A fragmentação de DNA decorrente do processo de apoptose foi observada por incorporação de Iodeto de Propídeo ao

DNA, aquisição em citômetro de fluxo e análise da porcentagem de células hipodiplóides em cada tratamento.

A Figura 40 ilustra os perfis de resistência à morte das linhagens celulares com as diferentes concentrações de quimioterápicos utilizados. Em todos os casos (tipo de droga e dosagem usada), foi possível observar que a linhagem celular BCLW positiva foi mais resistente a morte do que a linhagem BCLW negativa (teste Two-way ANOVA). Foi observado também um efeito dose-dependente na morte de ambas as linhagens celulares com as três drogas quimioterápicas.

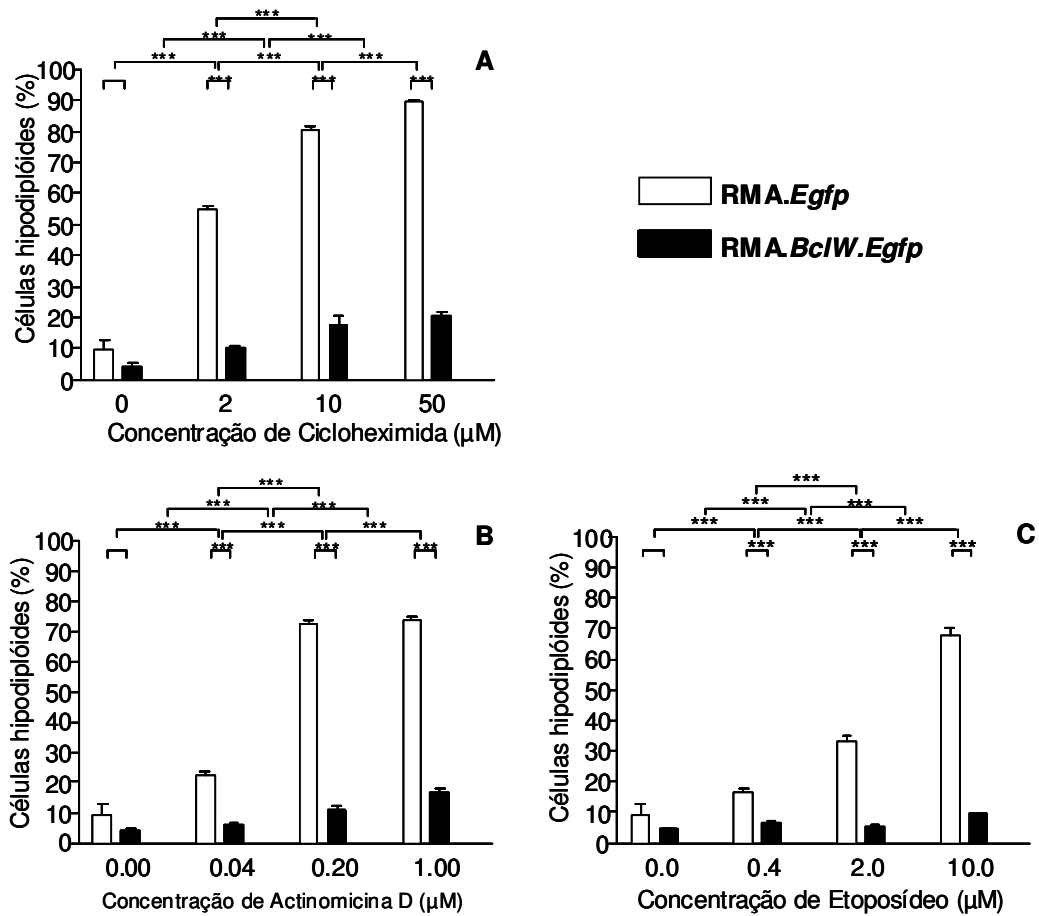


Figura 40. Perfil de resistência à apoptose de células RMA.Egfp e RMA.BclW.Egfp com diferentes quimioterápicos, *in vitro*. Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células de ambas as linhagens e as concentrações de cada droga (A-Cicloheximida, B-Actinomicina D e C-Etoposídeo) foram incubada nas culturas, por 18 horas. As análises de fragmentação de DNA foram feitas em citômetro de fluxo. As barras representam média aritmética \pm desvio padrão ($P < 0,001$ *** - Two-way ANOVA, $n=3$).

4.4 Impacto da expressão de BCLW no modelo murino de paralisia induzido por tumor

4.4.1 Análise da sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA.*BclW.Egfp*

A fim de verificar o impacto da expressão de BCLW na sobrevivência de animais inoculados e.v. com esta nova linhagem celular, foram avaliados e comparados os padrões de sobrevivência de camundongos inoculados com diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp* com os de animais inoculados com a linhagem infectada com o vetor vazio, RMA.*EGFP*. Para isso, diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp* e RMA.*Egfp* (entre 1×10^2 e 1×10^6 células) foram inoculadas e.v. em camundongos da linhagem C57Bl/6 selvagens e a sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente.

A figura 41 ilustra a curva de sobrevivência de camundongos inoculados com os diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp*. Este gráfico representa os resultados de dois experimentos independentes e foi observado que em todos os grupos houve morte dependente do número de células RMA.*BclW.Egfp* inoculadas ($1 \times 10^6 > 1 \times 10^5 > 1 \times 10^4 > 1 \times 10^3 > 1 \times 10^2$ – teste Log Rank $p < 0,0001$). As porcentagens de morte em cada grupo foram de: 1×10^6 - 100%, 1×10^5 - 63,6%, 1×10^4 - 44,4%, 1×10^3 - 25% e 1×10^2 - 20%. A tabela 5 mostra os dados de dois experimentos independentes usados para a construção do gráfico de sobrevivência de camundongos C57BL/6 inoculados e.v. com diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp*.

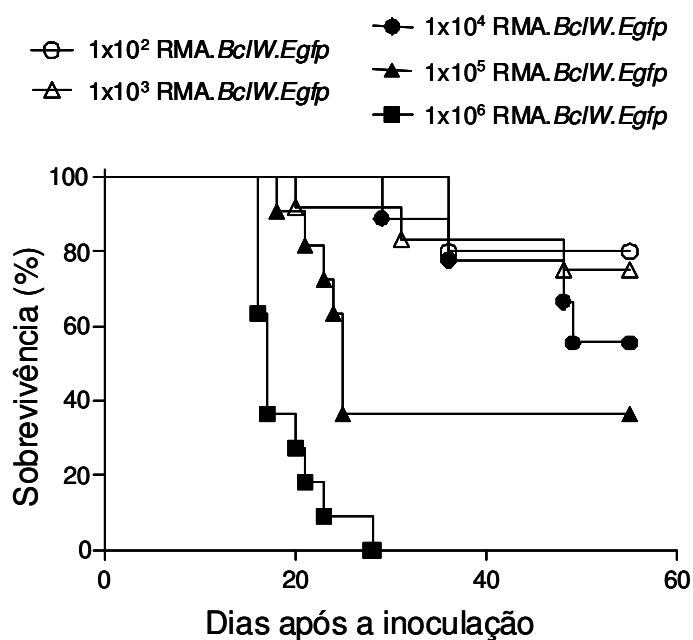


Figura 41. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com diferentes números de células RMA.BclW.Egfp. Os animais foram inoculados com 0,2 ml de solução contendo diferentes números de células RMA.BclW.Egfp. A sobrevivência foi acompanhada diariamente. Os dados são mostrados em forma de gráfico do tipo Kaplan Meyer de um experimento representativo (n=6 para cada grupo de animais). A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank (P< 0,001 entre as curvas).

A figura 42 ilustra o resultado de um experimento onde foram comparadas, paralelamente, as sobrevivências de grupos de animais inoculados com a linhagem RMA.Egfp e grupos inoculados com RMA.BclW.Egfp. Neste gráfico, observa-se que nos grupos inoculados com 1×10^5 e 1×10^6 células RMA.BclW.Egfp, todos os animais morreram enquanto os inoculados com 1×10^5 células RMA.Egfp não apresentou o mesmo resultado (RMA.Egfp: 1×10^5 – 60% e 1×10^6 – 100%; RMA.BclW.Egfp: 1×10^5 e 1×10^6 – 100%). Além disso, o início das mortes foram anteriores em animais inoculados com RMA.BclW.Egfp (RMA.Egfp: 1×10^5 início de mortes em $27 \pm 3,5$ dias e 1×10^6 em $22,5 \pm 0,5$ dias; RMA.BclW.Egfp: 1×10^5 início das mortes em $24,4 \pm 0,9$ dias e 1×10^6 em $16,5 \pm 0,5$ dias). No caso dos grupos inoculados com 1×10^3 células, ambos os grupos apresentaram morte, porém maior quando inoculadas células RMA.BclW.Egfp (RMA.Egfp – 14,3%, RMA.BclW.Egfp – 28,6%).

A tabela 5 lista os experimentos utilizados para a construção desta curva de sobrevivência.

Tabela 5: Inoculação e.v. de diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp* provoca morte de camundongos C57BL/6 WT.

Nº de células inoculadas e.v.	Mortes	Dia da morte (média ± desvio padrão)
1×10^6	11/11	$18,1 \pm 2,6$
1×10^5	7/11	$23 \pm 2,6$
1×10^4	4/9	$40,5 \pm 9,7$
1×10^3	3/12	$33 \pm 14,1$
1×10^2	1/5	36

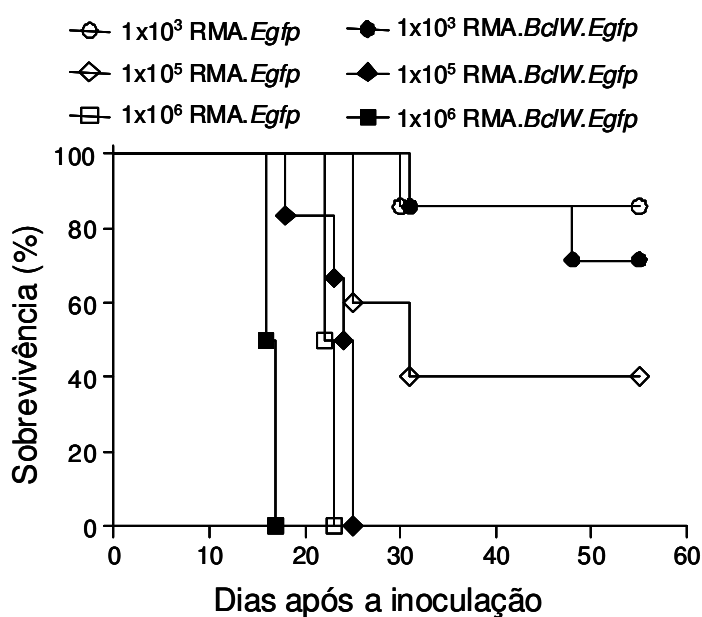


Figura 42. Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp*. Os animais foram inoculados com 0,2 ml de solução contendo diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp*. A sobrevivência foi acompanhada diariamente. O gráfico mostra a comparação entre as curvas de sobrevivência com células RMA.*Egfp* e RMA.*BclW.Egfp*. Os dados são mostrados em forma de gráfico do tipo Kaplan Meyer de um experimento representativo (n=6 para cada grupo de animais). A comparação estatística foi conduzida por teste Log Rank ($P < 0,0001$ entre as curvas).

A tabela 6 lista os experimentos utilizados para a construção desta curva de sobrevivência.

Tabela 6: Inoculação e.v. de diferentes números de células RMA.*BclW.Egfp* provoca paralisia ou inchaço de membros anteriores ou posteriores de camundongos C57BL/6 WT.

Nº de células inoculadas e.v.	Paralisia	Inchaço de membros
1x10 ⁶	6/6	0/6
	5/5	0/5
1x10 ⁵	5/5	0/5
	2/5	0/5
1x10 ⁴	0/5	1/5
	2/5	1/5
1x10 ³	1/7	1/7
	1/5	0/5
1x10 ²	1/5	0/5
	0/5	2/5

4.4.2 Aspectos clínico-patológicos em camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA.*BclW.Egfp*

Sabendo-se que a inoculação e.v. de números $\geq 1 \times 10^4$ células RMA.*Egfp* em camundongos C57BL/6 selvagens causou o aparecimento de paralisia e, ao contrário, a inoculação de números inferiores de células não causou o aparecimento de sinal clínico ou patológico, decidiu-se avaliar se a expressão de BCLW promoveria características nas células RMA capazes de provocar paralisia com a inoculação de números inferiores de células ou se os sinais clínicos e patológicos seriam diferentes. Para isso, dois experimentos independentes foram realizados para analisar o padrão de sobrevivência e os aspectos clínico-patológicos induzidos pela inoculação da linhagem RMA.*BclW.Egfp*.

A inoculação de células RMA.*BclW.Egfp* provocou o aparecimento de paralisia com características semelhantes às descritas quando inoculadas células RMA.*Egfp* (paralisa da região posterior do corpo de forma ascendente, progressiva e irreversível), porém o aparecimento deste sinal e a progressão foram anteriores nos animais inoculados com

RMA.*BclW.Egfp*: 7 dias no grupo RMA.*BclW.Egfp* e 14 dias no grupo RMA.*Egfp* (Figura 43A). Foi observado também o aparecimento de inchaço na região da frente em alguns animais, como observado no modelo de tumor pela inoculação de RMA.*Egfp* (dado não mostrado). Além disso, em alguns animais, foi observado inchaço de membros anteriores ou posteriores, nas regiões do braço ou da coxa, ao invés de paralisia. Observou-se que, em alguns destes casos, não eram os linfonodos que apresentavam tamanho aumentado, mas se tratava de massa envolvendo o músculo e ossos dos membros (dados não mostrados). Porém, não foram feitas análises para verificar o motivo do inchaço destas regiões. A frequência de sinais patológicos observados em cada grupo de animais em dois experimentos independentes foi: a) paralisia – 0% com 1×10^2 , 14% e 20% com 1×10^3 , 40% com 1×10^4 , 40% e 100% com 1×10^5 e 100% com 1×10^6 ; inchaço de membros – 40% com 1×10^2 , 14% com 1×10^3 , 20% com 1×10^4 , 0% com 1×10^5 e com 1×10^6 (Tabela 6).

4.4.3 Variações de peso de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA.*BclW.Egfp*

Da mesma forma como observado em grupos de camundongos inoculados com células RMA.*Egfp*, os grupos de animais inoculados com células RMA.*BclW.Egfp* apresentaram perda de peso após o aparecimento de paralisia de membros posteriores. Porém, de forma geral, o decaimento do peso nos grupos RMA.*BclW.Egfp* foi maior, como mostra o gráfico da figura 43B, onde são apresentadas as médias das variações de peso dos grupos inoculados com 1×10^6 células de ambas as linhagens celulares. O gráfico representa as médias da variação de peso de cada grupo até o momento em que o primeiro animal do grupo morreu.

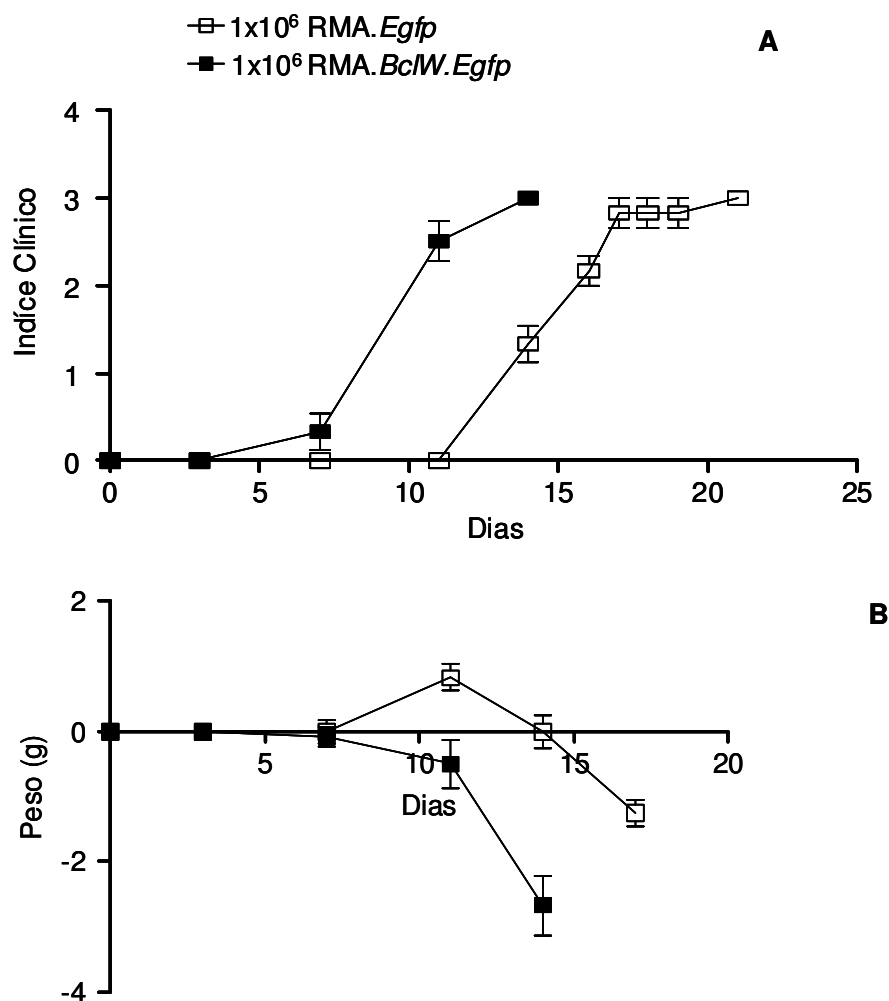


Figura 43. Índice clínico de paralisia e variação de peso de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.Egfp ou RMA.BclW.Egfp. Em (A), índice clínico de paralisia. A ordenada representa o grau de paralisia dos animais de acordo com a classificação citada na figura 12. As curvas representam as médias dos índices clínicos dos animais \pm erro padrão. Em (B), variação de peso. O peso dos animais foi observado diariamente, até o momento em que o primeiro animal de cada grupo morreu. As curvas representam as médias dos pesos \pm erro padrão.

4.4.4 Análise de infiltração tumoral em tecidos de camundongos C57BL/6 selvagens, após inoculação e.v. da linhagem celular RMA.BclW.Egfp

A fim de verificar se a expressão de BCLW promoveria alguma alteração no padrão de infiltração tumoral da linhagem RMA, foram analisados órgãos de camundongos inoculados com esta linhagem em comparação com os de camundongos inoculados com a linhagem RMA.Egfp. Foram utilizadas as mesmas metodologias descritas para análise de infiltração tumoral descritas no item 4.2.4, ou seja, análise macroscópica de órgãos, análise de infiltração

em macerados de tecido pela detecção da fluorescência verde das linhagens tumorais por citometria de fluxo e análise microscópica de lâminas histológicas de tecidos, corados com H&E.

Como o início de mortes no experimento de análise de sobrevivência de camundongos selvagens inoculados com 1×10^6 células RMA.*BclW.Egfp* foi de aproximadamente 16 dias, o experimento de análise de infiltrado tumoral em tecidos foi feito após cerca de 15 dias da inoculação de 1×10^6 células de ambas as linhagens celulares. Para isso, os animais foram perfundidos com solução salina pelo coração para a retirada do sangue circulante e, assim, possibilitar a detecção das células tumorais que colonizaram os tecidos.

Na análise macroscópica, foi possível observar que o cérebro, pulmão e timo dos dois grupos de camundongos não apresentaram alterações visíveis, como descrito no item 4.2.4 (dados não mostrados) nem o baço (Fig. 44). Os rins apresentaram característica de infiltração maior e hemorrágica em animais inoculados com a linhagem que expressava a proteína BCLW do que a que não expressava esta molécula (Figura 45). Já havia sido observado que a inoculação da linhagem RMA.*Egfp* provocava o aparecimento de pequenas manchas arredondadas, bem delimitadas e brancas nas bordas do fígado. Comparando-se com este dado, foi observado que a inoculação da linhagem RMA.*BclW.Egfp* provocou o aparecimento de número maior de manchas arredondadas, cobrindo a superfície maior do órgão, porém em alguns casos, estas manchas eram caracteristicamente hemorrágicas após a perfusão (Fig. 46).

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*



Figura 44. Aspecto macroscópico de baço de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo) e os órgãos foram retirados após 17 dias da inoculação.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*



Figura 45. Aspecto macroscópico de rins de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo) e os órgãos foram retirados após 17 dias da inoculação. Cabeça de seta ilustra massa tumoral induzida pela inoculação de RMA.*Egfp* e a seta mostra hemorragia induzida pela inoculação de RMA.*BclW.Egfp*.

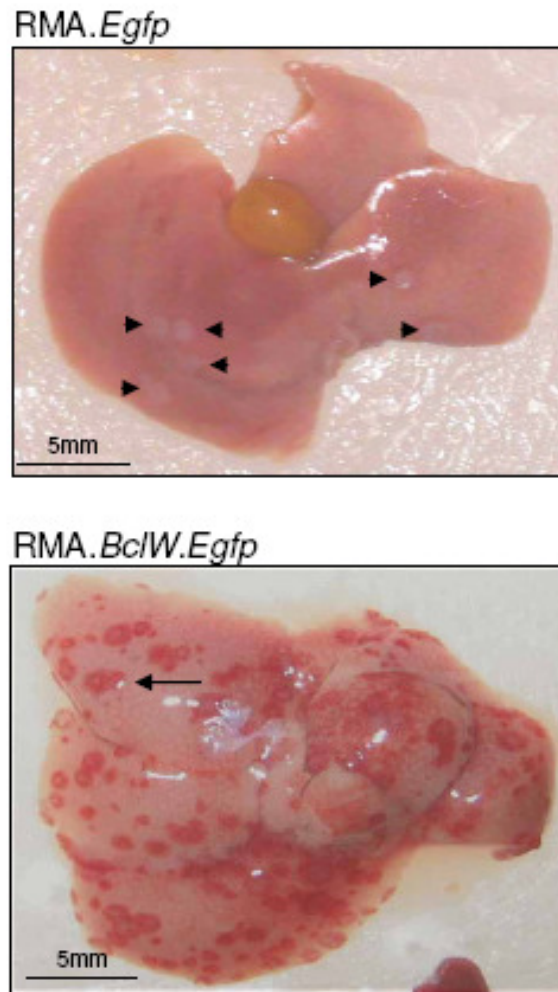


Figura 46. Aspecto macroscópico de fígado de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com linhagens tumorais. Os animais foram inoculados e.v. com 1×10^6 células RMA.Egfp (acima) ou RMA.BclW.Egfp (abaixo) e os órgãos foram retirados após 17 dias da inoculação. Cabeça de seta ilustra massa tumoral induzida pela inoculação de RMA.Egfp e a seta mostra hemorragia induzida pela inoculação de RMA.BclW.Egfp.

A análise de porcentagem de infiltração de células tumorais feita pela detecção de fluorescência verde em macerados de tecidos foi feita após 15 dias da inoculação de forma semelhante ao descrito no item 4.2.4.

A figura 47 ilustra o gráfico da porcentagem de fluorescência verde detectada em tecidos linfóides, onde se observa infiltração de ambas as linhagens celulares na medula óssea, parecendo haver infiltração maior em animais do grupo inoculado com a linhagem RMA.BclW.Egfp (2,26-46,51%) do que no grupo inoculado com RMA.Egfp (0,01-10,16%). Porém, a diferença não foi estatisticamente significativa. No timo e no baço, não houve detecção significativa de células tumorais em nenhum dos dois grupos (RMA.BclW.Egfp –

0,07-071% e 0-0,34%; RMA.*Egfp* – 0-0,01% e 0,02-0,04%, respectivamente). Na análise das amostras de macerados de *pool* de linfonodos, apesar de detectada infiltração pequena nos animais do grupo inoculado com RMA.*BclW.Egfp* (0,17-3,79%) em comparação com o grupo RMA.*Egfp* (0-0,02%), a diferença não foi estatisticamente significativa. Nos casos em que se aplicou o uso de amostras de animais controle, estas foram ajustadas para o valor zero.

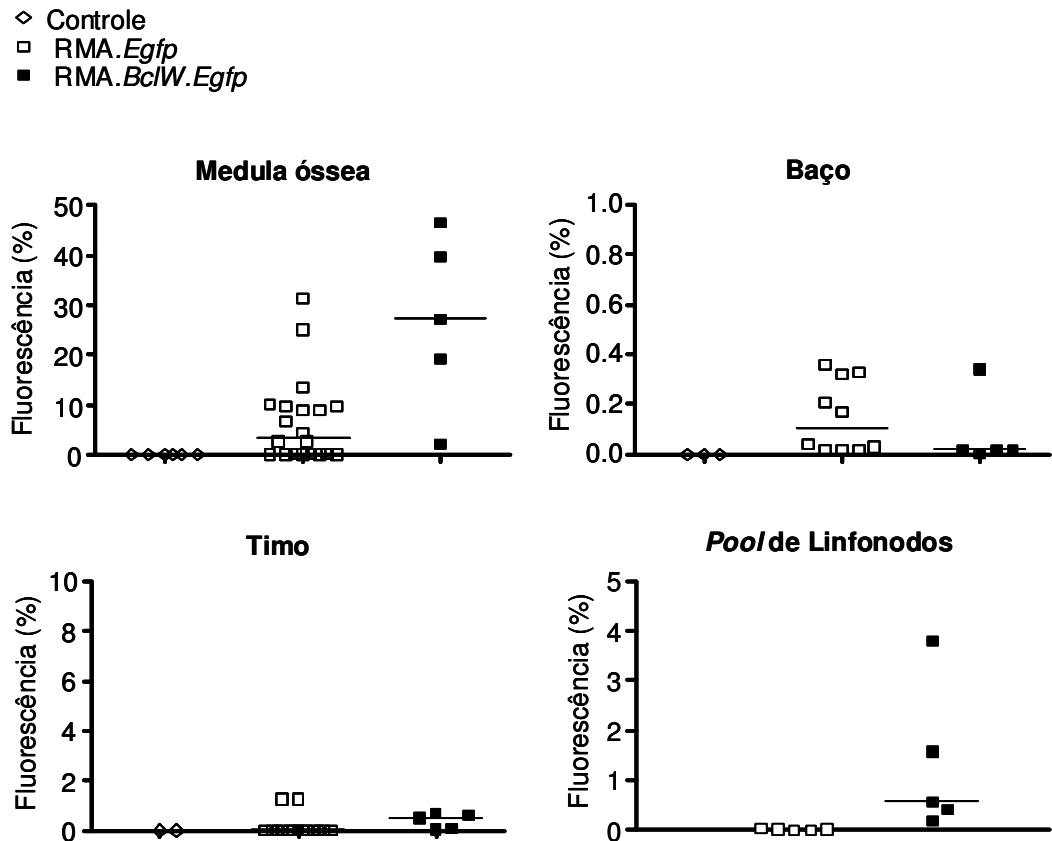


Figura 47. Perfil de infiltração de células RMA.*Egfp* e RMA.*BclW.Egfp* em órgãos linfóides de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. Os animais foram inoculados com 1×10^6 células RMA.*Egfp* ou células RMA.*BclW.Egfp* e os órgãos macerados foram analisados quanto à presença de fluorescência verde, 15 dias após a inoculação de células RMA.*BclW.Egfp* e 15 e 21 dias com células RMA.*Egfp*, por citometria de fluxo, com filtro FL-1. Cada símbolo representa um animal de cada grupo analisado. As barras representam a mediana e o teste estatístico usado foi One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

A figura 48 ilustra a detecção de fluorescência verde em macerados de tecido não linfóides de grupos de animais controle e inoculados com ambas as linhagens celulares. Nesta figura é possível observar que no fígado do grupo RMA.*BclW.Egfp* houve infiltração pequena de células tumorais (0,32-1,62%) enquanto não houve infiltração detectável por esta técnica no grupo RMA.*Egfp* (0,07-0,27%), porém a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Em menor grau, o mesmo ocorreu nas amostras de macerados

de pulmão, onde se observou que o grupo RMA.*BclW.Egfp* apresentou entre 0,01-0,3% de infiltração *versus* 0,01-0,04% no grupo RMA.*Egfp*. Nas amostras de macerados de rins, praticamente não foram detectadas porcentagens de infiltração tumoral por esta técnica (RMA.*BclW.Egfp* – 0,02-0,28% e RMA.*Egfp* – 0,01-0,07% dos casos onde se utilizou amostras de animais controle, estes foram tratadas como descrito acima.

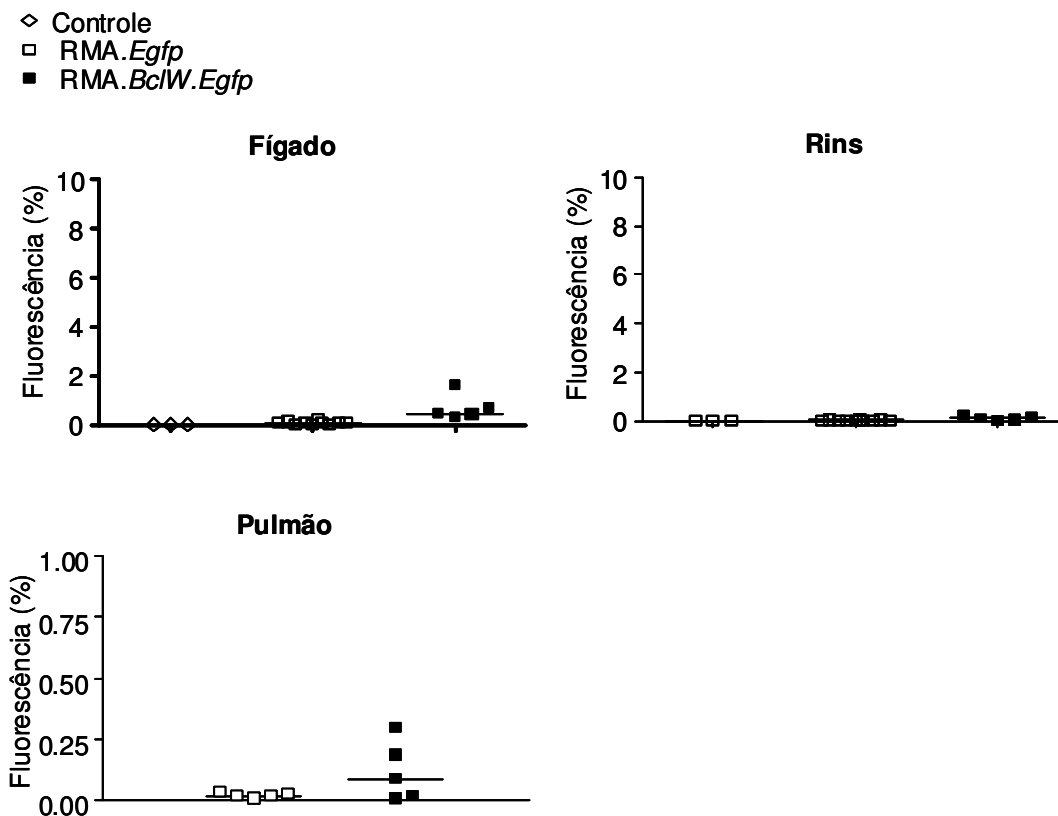
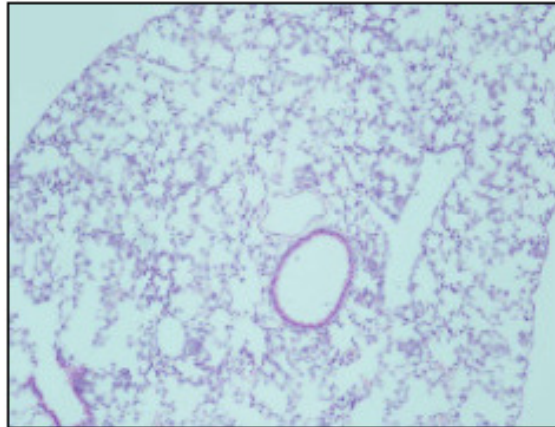


Figura 48. Perfil de infiltração de células RMA.*EGFP* e RMA.*BclW.Egfp* em órgãos não linfóides de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados e.v. Os animais foram inoculados com 1×10^6 células RMA.*Egfp* ou células RMA.*BclW.Egfp* e os órgãos macerados foram analisados quanto à presença de fluorescência verde, 15 dias após a inoculação de células RMA.*BclW.Egfp* e 15 e 21 dias com células RMA.*Egfp*, por citometria de fluxo, com filtro FL-1. Cada símbolo representa um animal de cada grupo analisado. As barras representam a mediana e o teste estatístico usado foi One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

A última forma de avaliar a infiltração das linhagens celulares em tecidos foi a microscópica. Para isso, foram feitas lâminas histológicas de timo, linfonodos, baço, rins, fígado e coluna vertebral de camundongos C57BL/6 selvagens, após 15 dias da inoculação de solução salina (controle) e de ambas as linhagens celulares tumorais. A seguir, são mostradas figuras que ilustram comparações entre fotos de tecidos de grupos inoculados com as linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA.*BclW.Egfp*.

A figura 49 ilustra cortes histológicos de pulmão, onde não foram observadas infiltrações tumorais por nenhuma das duas linhagens tumorais.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*

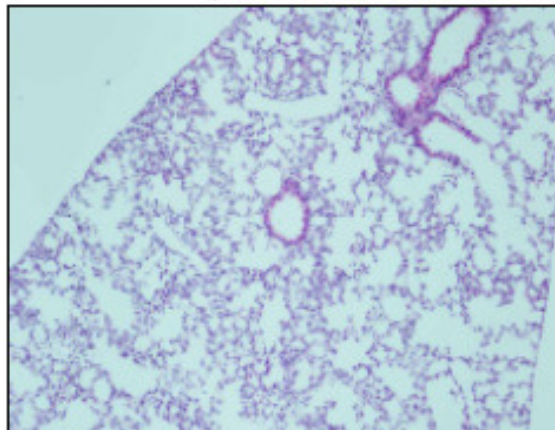
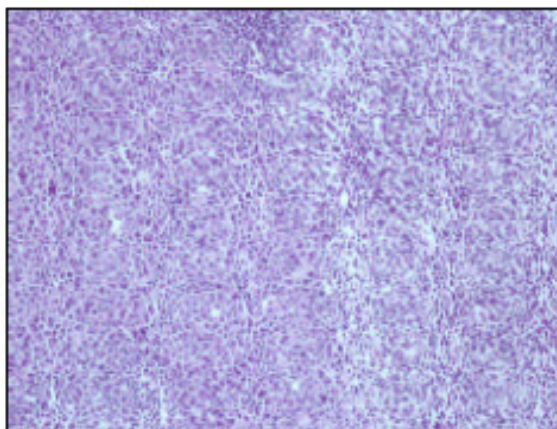


Figura 49. Ausência de células tumorais em cortes histológicos de pulmão de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. As fotos foram tiradas com aumento de 100X.

Na figura 50 é possível observar que o timo foi colonizado tanto pelas células tumorais RMA.*Egfp* quanto pelas RMA.*BclW.Egfp*.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*

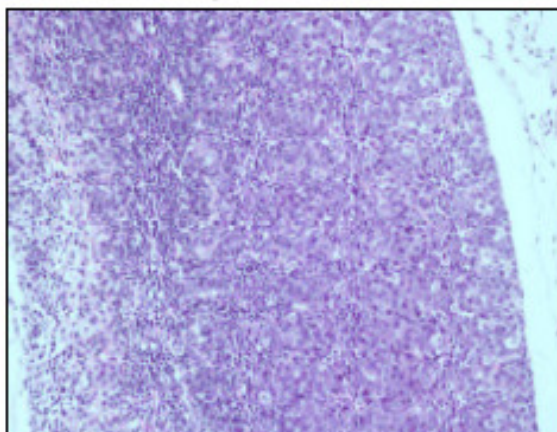
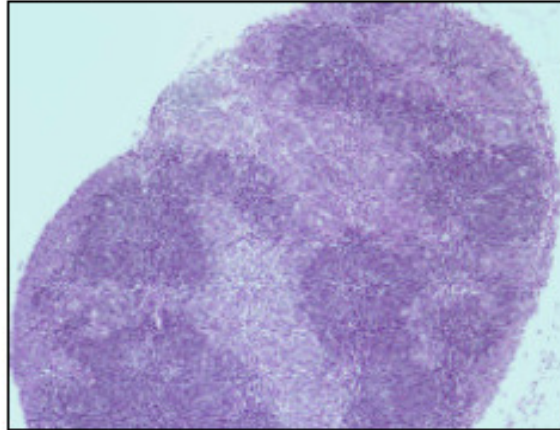


Figura 50. Presença de células tumorais em cortes histológicos de timo de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. As fotos foram tiradas com aumento de 200X.

A figura 51 ilustra a análise de cortes de linfonodo, onde não foi observada infiltração por células RMA.*Egfp* e, ao contrário, foi observada infiltração por células RMA.*BclW.Egfp*, a qual desestruturou o tecido.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*

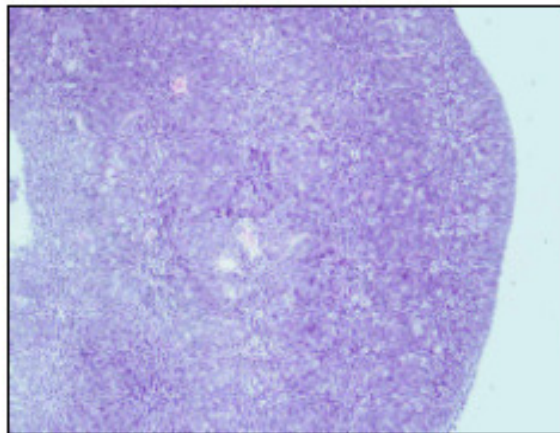
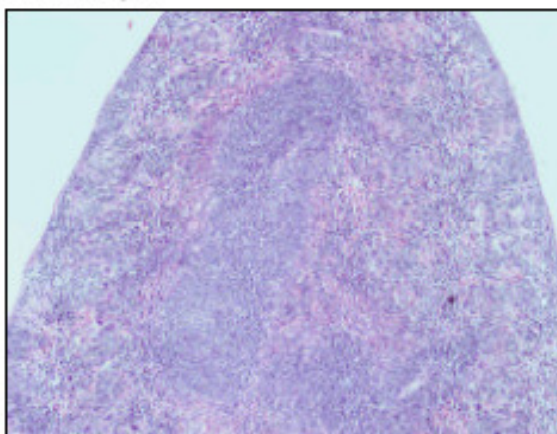


Figura 51. Presença de células tumorais em cortes histológicos de linfonodos de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células RMA.*BclW.Egfp*. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E. As fotos acima e abaixo foram tiradas com aumento de 100X.

A figura 52 ilustra fotos de regiões do baço. Nestas fotos foi possível observar que tanto o baço do animal inoculado com células RMA.*Egfp* como do animal inoculado com RMA.*BclW.Egfp* apresentaram estrutura normal do órgão, com as polpas branca e vermelha bem delimitadas.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*

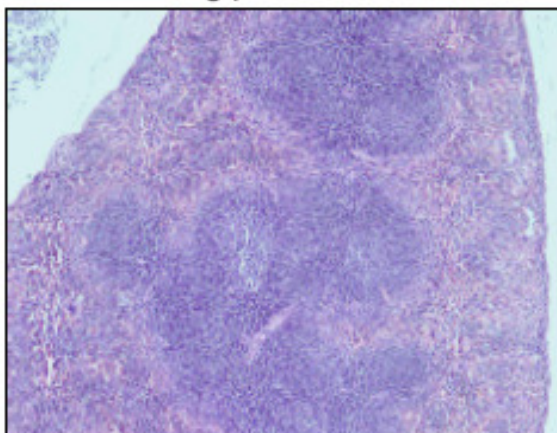
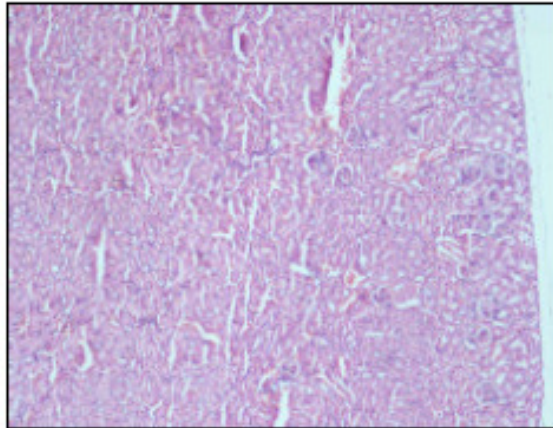


Figura 52. Presença de células tumorais em cortes histológicos de baço de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E.

No caso dos rins, a figura 53 ilustra o córtex renal, onde é possível observar túbulos renais e glomérulos normais. Apesar de a análise macroscópica evidenciar alteração neste órgão, o experimento de retirada de tecido de alguns animais para análise microscópica não mostrou alterações deste tecido, como era esperado.

RMA.*Egfp*



RMA.*BclW.Egfp*

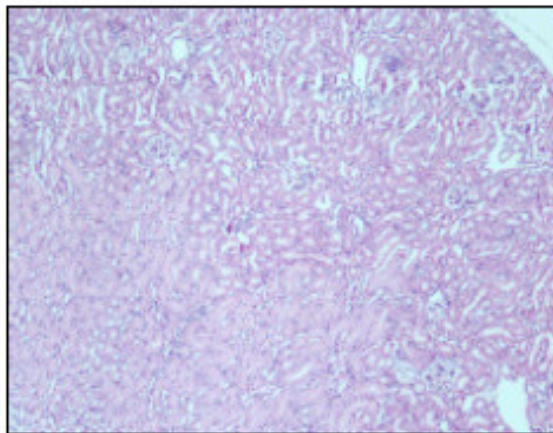


Figura 53. Ausência de células tumorais em cortes histológicos de rim de camundongos C57BL/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E.

No fígado, observou-se pela análise microscópica que ambas as linhagens tumorais infiltraram este órgão (Fig. 54). O fígado de animais inoculados com células RMA.*BclW.Egfp* foi mais infiltrado do que o de animais inoculados com a linhagem RMA.*Egfp*. Na maioria dos cortes histológicos, observou-se que as células tumorais se espalharam a partir de uma veia, depositando-se ao redor destas e se acumularam nas bordas do órgão (ilustrado na foto do fígado de animal inoculado com RMA.*Egfp*). Nos cortes de fígado de animais inoculados com a linhagem RMA.*BclW.Egfp* foi possível observar algumas regiões com características de hemorragia. Em todos os cortes analisados, foram observadas regiões onde a estrutura do órgão ainda estava preservada, com hepatócitos aparentemente normais.

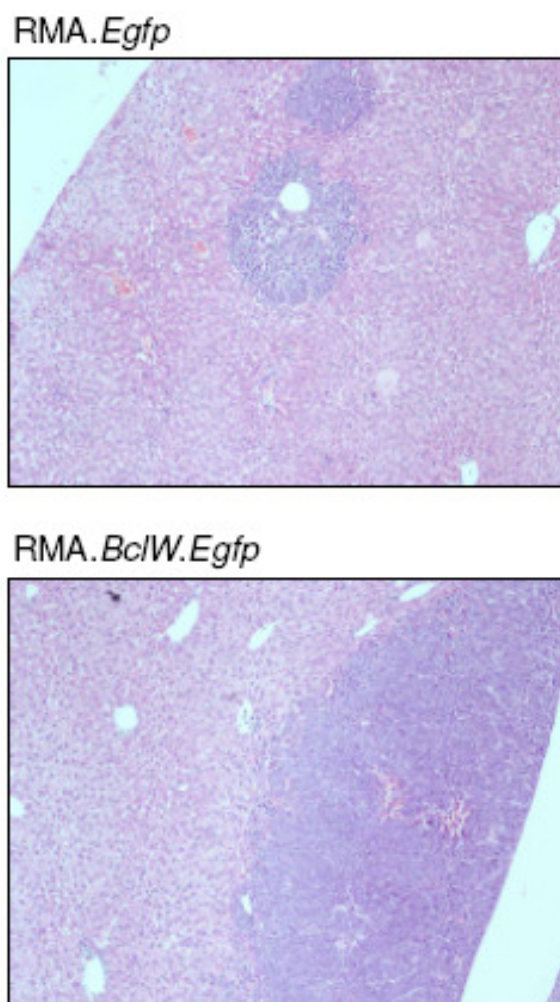


Figura 54. Presença de células tumorais em cortes histológicos de fígado de camundongos C57Bl/6 selvagens inoculados com células tumorais. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*Egfp* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E.

Na análise histológica de cortes de coluna vertebral foi observado que a medula óssea das vértebras foi infiltrada somente nos animais inoculados com células RMA.*BclW.Egfp* (Fig. 55). Neste caso, as características da infiltração tumoral foram semelhantes ao descrito para a infiltração por células RMA.*Egfp* no item 4.2.4.

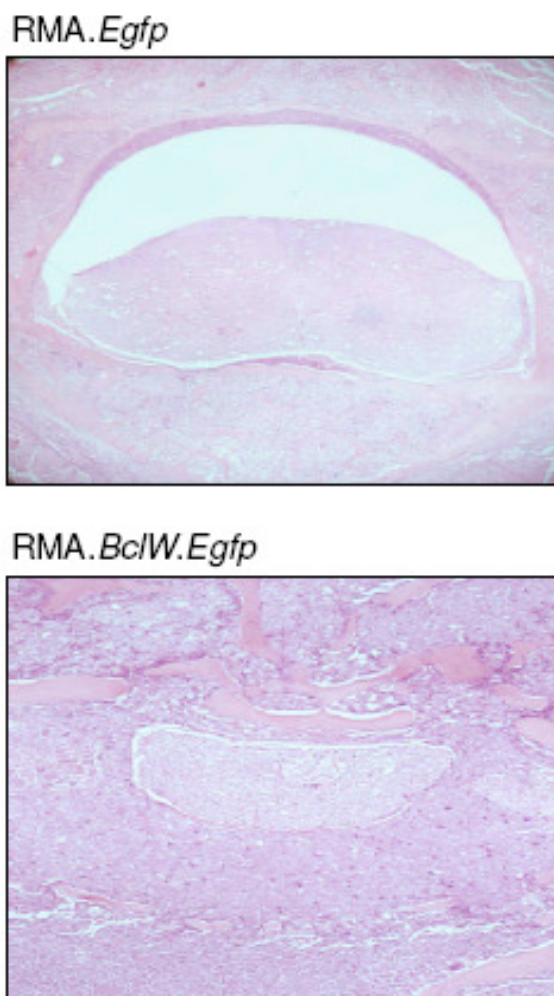


Figura 55. Presença de células tumorais em cortes histológicos de medula óssea paravertebral de camundongos C57Bl/6 selvagens inoculados com células RMA.*BclW.Egfp*. Os animais foram inoculados e.v com 1×10^6 células RMA.*EGFP* (acima) ou RMA.*BclW.Egfp* (abaixo). Após 15 dias das inoculações, os animais foram sacrificados, a coluna vertebral retirados, descladificada e as lâminas com cortes histológicos foram coradas com H&E.

Em resumo, observou-se que a linhagem RMA.*BclW.Egfp* infiltrou tecidos linfóides como a medula óssea, timo e linfonodos, além de tecidos não linfóides como fígado e rins. Em todos os casos, por um ou outro tipo de análise, observou-se que a infiltração foi maior do que a observada pela linhagem que não expressa a proteína BCLW.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Modelos experimentais para o estudo do câncer *in vitro* têm contribuído para o entendimento de diversas características tumorais como a biologia celular dos tumores, definindo vias metabólicas e cascatas de transdução de sinais bioquímicos intracelulares que são ativadas durante o processo de tumorigênese. Os estudos *in vivo* são imprescindíveis para a investigação das bases celulares e moleculares que coordenam a resposta imune contra tumores, dos processos de migração e infiltração tecidual e fisiopatologia dos tumores. Devido a estas possibilidades, o desenvolvimento de modelos murinos de tumores tem progredido de forma surpreendente e, atualmente, os modelos descritos são diversificados e sofisticados, possibilitando o estudo de diversos aspectos que se referem aos tumores. Porém, alguns aspectos ainda não foram completamente elucidados e os modelos de tumor *in vivo* continuam sendo necessários para ampliar o conhecimento nessa área.

Nesse sentido, procurou-se neste trabalho desenvolver e caracterizar modelos murinos para o estudo do câncer, utilizando-se duas linhagens celulares chamadas RMA e RMA-S, as quais foram muito utilizadas para estudos de resposta contra tumores por linfócitos T citotóxicos e células NK. É conhecido que muitos tumores tem expressão da molécula de MHC de classe I reduzida ou completamente ausente (Smith, 1991) e que, dessa forma, o tumor é capaz de progredir por escapar da lise mediada por linfócitos T citotóxicos (CTL). Pensando nisso, os modelos experimentais desenvolvidos neste trabalho visam serem utilizados para investigar as respostas imunes contra tumor mediadas por células NK e CTLs.

Para facilitar o monitoramento dos tumores *in vivo* e aprimorar o estudo de metástases, muitos estudos têm utilizado a tecnologia de transfecção gênica de tumores com proteínas fluorescentes e detecção posterior dos mesmos em modelos animais. Nessa linha, foram publicados trabalhos onde o principal foco de estudo foram os padrões fisiopatológicos e metastáticos de alguns tumores guiados pela expressão de *Egfp in vivo*, tais como o de pulmão (Huang, *et al.*, 2002), cérebro (MacDonald, *et al.*, 1998), mama (Li, *et al.*, 2002), carcinoma de colon (Sturm, *et al.*, 2003), carcinoma adenóide (Xiong, *et al.*, 2005) e micrometástase hepática em modelo de melanoma (Yang, *et al.*, 2008).

Com o mesmo propósito de facilitar a detecção tumoral *in vivo* neste trabalho, as linhagens tumorais RMA e RMA-S foram infectadas com uma construção retroviral que contém o gene da proteína fluorescente verde *Egfp* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). A decisão pelo uso da construção retroviral foi por permitir a integração do DNA plasmidial no

genoma da célula hospedeira, expressão contínua da proteína de interesse na célula-alvo e devido à baixa imunogenicidade causada pelas proteínas retrovirais *in vivo* (Mulligan, 1993). Após a infecção das duas linhagens tumorais com a construção retroviral contendo o gene *Egfp*, as células que expressavam a proteína verde foram selecionadas e as novas linhagens celulares receberam o nome de RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*. Estas novas linhagens expressam a proteína fluorescente verde e podem ser detectadas tanto *in vitro* como *in vivo* através de diferentes técnicas, como microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e lupa de fluorescência. A detecção das células tumorais por várias técnicas simples é interessante, pois torna os modelos experimentais acessíveis e fáceis de serem utilizados para diferentes tipos de estudo. Como a expressão proteica de EGFP nas linhagens estabelecidas é estável, estes modelos experimentais permitem o monitoramento *in vivo* das células injetadas e, com isso, podem ser utilizados para estudos de migração, infiltração e colonização tumoral de tecidos.

Após a obtenção das linhagens EGFP positivas, o passo seguinte foi caracterizá-las *in vitro* quanto a expressão da molécula de MHC de classe I – H-2D^b, a taxa de proliferação celular e a resistência à apoptose frente a agentes quimioterápicos.

Em relação a expressão de MHC de classe I - H-2D^b, como mostra a figura 4, células RMA e RMA.*Egfp* expressam essa molécula na superfície celular enquanto as células das linhagens RMA-S e RMA-S.*Egfp* não expressam. Portanto, as novas linhagens tumorais mantiveram a característica diferencial de expressão de MHC de classe I descrita no trabalho original mencionado anteriormente e, assim, acredita-se que os modelos experimentais descritos neste trabalho podem ser utilizados para estudos de respostas imunes contra tumores que expressam ou não molécula de MHC de classe I. Mais especificamente, no caso do uso de células RMA.*Egfp*, estas seriam alvos potenciais de linfócitos T citotóxicos e as células RMA-S.*Egfp*, alvo de células NK (Townsend e Bodmer, 1989; Ljunggren e Karre, 1990; Hacker, *et al.*, 2006; Zamai, *et al.*, 2007). Além disso, observou-se através da análise de outras proteínas de superfície celular que as linhagens RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* expressam igualmente a proteína CD44 e não expressa as proteínas CD3, CD4, CD8, CD25, CD45R e CD62L. A molécula CD44 é conhecida por estar envolvida em migração e maturação de linfócitos e possui várias isoformas que são relacionadas a metástase. Embora seja descrito que a linhagem RMA expresse de forma heterogênea algumas moléculas como CD3, CD4 e CD8, a ausência da expressão dessas moléculas nas linhagens RMA e RMA-S neste trabalho será considerada como características de células precursoras de linfócitos.

Em relação à taxa de proliferação celular, em primeiro lugar, observou-se que estas linhagens tumorais proliferaram de maneira intensa, devido ao curto período de tempo de

latência (cerca de 2 horas) e de duplicação celular (RMA.*Egfp* - 13,5 horas e RMA-S.*Egfp* - 15,1 horas) *in vitro*. Essa característica de tempo de duplicação curto já havia sido descrito para as linhagens parentais (RMA - 14,4 horas e RMA-S - 14,6 horas) (Ljunggren e Karre, 1985). Na comparação entre as linhagens RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de proliferação. Essa observação foi importante para garantir duas coisas: 1. Tanto o processo de infecção celular com retrovírus quanto conseqüências da expressão de genes da construção retroviral nas linhagens não provocaram, aparentemente, alterações celulares *in vitro* (os dados das linhagens EGFP positivas foram semelhantes aos das linhagens parentais, EGFP negativas. Esses dados não foram mostrados neste trabalho) e 2. As diferenças observadas entre os modelos animais inoculados com as linhagens tumorais podem ser devido a outros fatores que não a uma taxa de proliferação celular diferente entre elas. Porém, estas linhagens tumorais passaram por um processo de mutação gênica e não se sabe sobre a existência de outras alterações além da expressão de MHC de classe I e de p53. Por este motivo, não é descartada a possibilidade de que, *in vivo*, algum fator de crescimento ou outros estímulos possam fazer com que uma linhagem prolifere de forma diferente da outra. De qualquer forma, neste momento não se tem dados que possam esclarecer esta idéia.

Em continuação à caracterização *in vitro*, foram utilizados 3 agentes indutores de morte celular para avaliar o perfil de resistência a apoptose das duas linhagens celulares: Cicloheximida (inibidor de síntese proteica), Actinomicina D (inibidor de transcrição do DNA) e Etoposídeo (causador de dano ao DNA por inibir topoisomerase II). Em geral, as linhagens celulares se comportaram de forma semelhante frente à ação dos agentes, apresentando porcentagem de morte iguais entre elas nas diferentes doses e de forma dose dependente. Uma exceção que vale a pena ser discutida foi a maior resistência a apoptose observada na linhagem RMA-S.*Egfp* ($51 \pm 1,3\%$ de células em apoptose) em comparação com a linhagem RMA.*Egfp* ($67,8 \pm 2,2\%$ células em apoptose) quando usada a dose mais alta do agente indutor de dano ao DNA – Etoposídeo (10uM) (Two-Way ANOVA $p < 0,001$). Uma hipótese para esse comportamento pode ser o fato de haver acúmulo da molécula supressora de tumor p53 no citoplasma da linhagem celular RMA-S e a mesma praticamente não ser expressa no compartimento nuclear, diferentemente do observado na linhagem RMA.*Egfp* (Sabapathy e Nam, 2008). A ausência de p53 no núcleo poderia inibir a transcrição de genes pró-apoptóticos, causando a maior resistência a morte por danos causados ao DNA (Aylon e Oren, 2007) e isso poderia explicar a maior resistência da linhagem RMA-S.*Egfp* em comparação com a linhagem RMA.*Egfp*. Apesar da diferença na expressão de p53 entre as

linhagens celulares, nos outros casos (inibição de síntese protéica e de transcrição de DNA), não foram detectadas diferenças. Porém, como foram feitos três experimentos independentes que resultaram em iguais padrões de morte, talvez a doses utilizadas nestes experimentos não foram suficientes para observar tais diferenças e o uso de doses maiores poderia permitir a observação de tais diferenças nas resistências a morte das linhagens celulares. De qualquer forma, essa informação deve ser levada em consideração quando houver interesse em utilizar estes modelos de tumor para estudo de terapia contra linfoma T.

Após verificar que a expressão de MHC de classe I na superfície de celular das linhagens era condizente com o descrito na literatura, que a expressão de EGFP era estável e que as taxas de proliferação e resistência a morte eram praticamente iguais entre elas, iniciou-se o desenvolvimento dos modelos murinos de tumor.

Nos modelos *in vivo*, observou-se, primeiramente, que o limiar de células inoculadas e.v. que causou sinais de doença e morte foi a partir de 1×10^4 células para ambas as linhagens tumorais. A inoculação de quantidades menores de células das duas linhagens não provocou sinais de doença nem morte e, por isso, sugere-se que números menores ou iguais a 1×10^3 células RMA.*EGFP* e RMA-S.*Egfp* ou morreram ao serem inoculadas ou foram detectadas e destruídas pelo sistema imune dos camundongos.

Focando na descrição dos modelos de tumor induzidos pela inoculação e.v. de números $\geq 1 \times 10^4$ células das linhagens tumorais, observou-se que os camundongos apresentaram padrões de doença distintos dependendo da linhagem tumoral inoculada: quando inoculadas células RMA.*Egfp*, os animais apresentaram paralisia da região posterior do corpo, de forma ascendente, progressiva e irreversível, acompanhada de perda de peso. Já os animais inoculados com células RMA-S.*EGFP* apresentaram, principalmente, ascite e ganho de peso. O fato dos animais perderem peso após apresentarem paralisia não está associado a dificuldade de acesso ao alimento, uma vez que houve o cuidado de fornecer ração ao alcance dos animais dentro das gaiolas assim como feito para os animais que apresentaram ascite e ganho de peso. Em alguns casos de câncer é descrita a perda de peso pela diminuição de ingestão de alimento ou aumento de metabolismo devido a alterações metabólicas causadas pelo tumor (Bosaeus, *et al.*, 2002) e isso pode ter ocorrido nos casos em que houve paralisia. O ganho de peso pode estar associado ao acúmulo de líquido na cavidade peritoneal dos animais que apresentaram ascite assim como descrito para pacientes que apresentam ascite (Lipsky e Sternbach, 1996). A seguir, serão discutidos os sinais observados após a inoculação de cada uma das linhagens tumorais.

Em relação à paralisia induzida nos camundongos pela inoculação de células RMA.*Egfp*, observou-se que as células tumorais infiltraram principalmente a medula óssea. No caso da medula óssea paravertebral, de alguma forma, a partir deste tecido as células tumorais extravasaram para a região extradural (Fig. 29A e B), comprimindo a medula espinhal (Figura 29D) e destruíram também o tecido muscular (Figura 29C). É descrito na literatura a ocorrência deste sintoma em alguns pacientes com linfomas non-Hodgkin, onde há compressão da medula espinhal pela infiltração tumoral extradural, em casos raros – 0.1% à 3.3% dos pacientes (Vanneuville, et al., 2000), onde a expectativa de vida destes pacientes após o diagnóstico do envolvimento da medula espinhal é curta – de 3 à 6 meses (Spinazze, et al., 2005). No caso da infiltração das células tumorais RMA.*Egfp* na medula óssea paravertebral, parece que estas células foram capazes de extravasar a medula óssea e invadir a musculatura paravertebral, causando a necrose deste tecido (Fig.29C). O acúmulo de células tumorais no espaço extradural comprimiu a medula espinhal, causando degeneração e necrose do tecido nervoso também (Fig.29D e E). As células tumorais pareceram ser incapazes de ultrapassar a barreira da dura máter (Fig. 29B) e, assim, o sistema nervoso central ficou protegido de uma infiltração direta, como foi observado pela ausência de células tumorais no cérebro (Fig. 21) e na medula espinhal (Fig. 28 e 29). Contudo, a compressão da medula espinhal e dos nervos das raízes dorsais pelo tumor que se localizou no espaço extradural parece ter sido suficiente para provocar a degeneração nervosa. A causa da morte dos neurônios por compressão pode ter sido direta ou dependeu de isquemia, pois a massa tumoral provavelmente impediu o fluxo de sangue para a região, causando hipóxia e posterior morte neuronal. Diante deste quadro de degeneração muscular e nervosa, os animais apresentaram comprometimento dos movimentos e dificuldade em manter a postura. A causa direta da morte dos animais que apresentaram paralisia não foi elucidada, assim como permanece obscuro o motivo pelo qual este sintoma ocorreu de forma ascendente. Dessa forma, o modelo aqui descrito possibilita sua utilização em estudos para o melhor entendimento de migração de tumores para a medula óssea, de compressão de medula espinhal pelo tumor e de terapias que possam evitar a paralisia induzida por tumor.

Como a medula óssea foi danificada pela infiltração tumoral, é possível que os camundongos apresentassem um sério prejuízo na manutenção da homeostasia de células mielóides e linfóides, o que dificultaria a resposta imune anti-tumoral. Apesar de análises de dados de hemograma e/ou mielograma acrescentarem mais dados a esta idéia, o comprometimento da medula óssea observado na histologia foi evidente e sugere que isto pode ter ocorrido. Com o possível *déficit* de células do sistema imune, pode ser que

difícilmente os tumores seriam contidos, pelo menos nos animais inoculados com o maior número de células tumorais (1×10^6 células), onde 50-100% dos animais apresentaram infiltração da medula óssea e comprometimento da medula espinhal e musculatura paravertebral.

A outra linhagem celular - RMA-S.*Egfp*, não infiltrou a medula óssea, pelo menos nas observações dos fêmures (Fig. 18) e das vértebras (Fig. 28), e isto faz com que se pense nas seguintes hipóteses: ou a linhagem RMA-S.*Egfp* foi capaz de migrar para a medula óssea, mas foi destruída pelo sistema imune inato neste local ou esta linhagem não migrou para este local devido a diferenças na expressão de receptores de *homing* que a outra linhagem poderia expressar. Sabe-se que o receptor de quimiocina 4 (CXCR4) está envolvido no *homing* de linfócitos e tumores hematopoéticos para a medula óssea (Wang, *et al.*, 2006; Burger e Burkle, 2007), bem como isoformas da molécula CD44 estão relacionados a este fenômeno (Khaldoyanidi, *et al.*, 1996; Vermeulen, *et al.*, 1998; Dimitroff, *et al.*, 2001). Apesar de ambas as linhagens celulares expressarem a molécula de CD44 (Fig.5 e Tabela 1), não foi feito um estudo de quais isoformas são expressas por estas linhagens. O processo de mutação pelo qual a linhagem RMA-S foi submetida com EMS (Etilmetilsulfonato) poderia ter alterado a expressão destas moléculas, o que justificaria a migração diferencial das duas linhagens tumorais. Porém não se têm dados neste trabalho nem na literatura sobre a expressão destas moléculas em células RMA e RMA-S que suportem esta idéia e a análise da expressão de CXCR4 e de isoformas de CD44 em ambas as linhagens celulares seria necessária para esclarecer esta dúvida.

Nos grupos de animais inoculados com 1×10^5 e 1×10^4 células RMA.*Egfp*, houve menor porcentagem de animais com paralisia e morte, menor índice clínico de paralisia e manifestação tardia em comparação a inoculação de 1×10^6 células, mostrando a dose dependência de número de células inoculadas e a indução de paralisia (Tabela 2 e Figuras 8 e 12). Em conjunto com os dados de que a inoculação de números iguais ou menores do que 1×10^3 células de ambas as linhagens tumorais não provocaram doença nem morte, pode-se dizer que estes modelos de tumor apresentam limiar de indução e agressividade de doença bem definidos.

Em continuação à descrição do modelo murino de paralisia induzido por tumor (no caso, por células RMA.*Egfp*), observou-se nos animais paralisados que houve colonização de outros órgãos além da medula óssea, tais como baço, timo, linfonodos, rins e fígado. Porém, nestes órgãos a infiltração foi menor ou observada somente em alguns animais. Em 1991, Hoglund e colaboradores observaram que as células RMA infiltraram o pulmão e o fígado e,

em menor proporção, o baço, após 15 minutos da inoculação e.v. Após 24 horas da inoculação, eles observaram que restaram menos que 1% do total de células detectadas inicialmente e que, portanto, estas células passaram por estes órgãos, provavelmente por terem sido inoculadas e.v., mas não permanecem infiltradas nos mesmos. No presente trabalho, não foram detectadas infiltrações tumorais no cérebro nem no pulmão (Figuras 23 e 24, respectivamente). No baço, apesar de ter sido detectada uma pequena infiltração desse órgão tanto na análise de fluorescência por citometria de fluxo no caso de alguns animais (Fig. 18) quanto na análise histológica de um animal (Fig. 25), considera-se que este órgão foi muito pouco infiltrado pelas células tumorais. No caso do timo, apesar de não terem sido observadas alterações pela análise macroscópica (dados não mostrados) e no ensaio de detecção de fluorescência em macerados de tecidos ter sido observada a presença de células tumorais em apenas um animal (Fig. 18), foi detectada infiltração pela análise histológica deste órgão (Fig. 23). Sabe-se que os precursores da linhagem de linfócitos T são capazes de migrar para o timo e expressam na superfície celular o fenótipo $LIN^- SCA-1^+ C-KIT^+ CD25^- CD44^+$, além da glicoproteína ligante de P-selectina – PSGL-1 (Rolink, *et al.*, 2006; Wu, 2006). Sabe-se que ambas as linhagens tumorais utilizadas neste trabalho apresentam o fenótipo $CD25^- CD44^+$ (Fig.5 e Tabela 1) e que a linhagem *RMA.Egfp* não expressa SCA-1 (dado não mostrado), porém não se sabe a respeito da expressão de C-KIT e PSGL-1. Como estas moléculas parecem ser essenciais para o *homing* de células precursoras para o timo, talvez a linhagem *RMA.Egfp* expresse as moléculas C-KIT e PSGL-1 o que, juntamente com CD44, seria suficiente para promover a migração para este local, porém não se tem dados que suportem esta idéia. No caso dos linfonodos, não foram observadas alterações de tamanho pela análise macroscópica (dado não mostrado) nem foram detectadas células fluorescentes na análise de macerado de órgãos (Fig. 18). Apesar disso, para a maioria dos animais, observou-se que alguns dos linfonodos examinados apresentavam uma pequena infiltração quando analisados histologicamente (Fig. 24). Apesar de ter sido analisado somente o padrão global de expressão de moléculas CD44 na superfície das células *RMA.Egfp*, sem, no entanto, identificar suas diferentes isoformas, pode-se sugerir que a capacidade dessas células de migrar tanto para a medula óssea como para os linfonodos estaria associada à expressão de CD44, uma vez que diversos trabalhos mostraram a relação dessa proteína e de suas variantes com *homing* e invasão de linfomas para esses sítios (Zahalka, *et al.*, 1995; Naor, *et al.*, 2008). No caso do rim, é descrito que este órgão pode ser invadido pela periferia em alguns tipos de linfomas humanos (Urban e Fishman, 2000). No modelo experimental aqui descrito, a inoculação de células *RMA.Egfp* promoveu alterações macroscópicas neste órgão em uma minoria dos

animais do grupo (Fig. 15), os quais apresentaram infiltração tumoral detectada na análise histológica (Fig. 26). Nesta última análise, observou-se que a infiltração era caracteristicamente peri-renal. Porém, em grande parte dos animais, não houve detecção de infiltração deste órgão, como ilustrado na figura 19. Em relação ao fígado, observou-se pequena infiltração deste órgão devido a inoculação de células RMA.*Egfp*. Neste órgão foram detectadas alterações macroscópicas superficiais somente em alguns animais (Fig. 16), porém essa infiltração não foi detectada pela análise de fluorescência (Fig. 19), somente pela macroscópica e análise histológica (Fig. 27).

Em alguns animais paralisados foi observada, ainda, uma massa tumoral localizada sobre o osso da fronte (Fig. 11). Pacientes com linfoma do tipo nasal apresentam acúmulo de células tumorais próximo da cavidade nasal, incluindo o aparecimento de massa tumoral no nariz, em regiões sino-nasais, da naso-faringe e palato (Lee, *et al.*, 2003). Embora no modelo apresentado neste trabalho tenha sido observado o acúmulo de células na região da fronte, o fato de não se ter analisado em maior profundidade o interior da cavidade nasal nos animais afetados, a causa de tal acúmulo de células e a dimensão da infiltração, impede que se afirme que o modelo de tumor de células RMA.*Egfp* inoculada pela via e.v. se assemelhe ao linfoma humano do tipo nasal. Sabe-se somente que foi uma característica observada repetidas vezes em alguns dos animais inoculados com esta linhagem tumoral.

Com os resultados descritos acima, conclui-se que a linhagem RMA.*Egfp* quando inoculada e.v. em camundongos C57BL/6 selvagens, coloniza tecidos linfóides, com prevalência na medula óssea e, em raros casos, coloniza tecidos não linfóides.

Em relação à patologia induzida pela inoculação da linhagem celular RMA-S.*Egfp*, a característica mais marcante foi a indução de ascite (Fig. 10). Assim como o observado com as células RMA.*Egfp*, não foram detectadas células tumorais no cérebro nem no pulmão (Fig. 21 e 22, respectivamente). No caso do baço, apesar de ter sido detectada pequena proporção de células tumorais pela análise de células fluorescentes em macerado de órgãos (Fig. 18), não foram observadas alterações macroscópicas (Fig. 14) nem de células tumorais pela análise histológica (Fig. 25). Novamente vale citar que Hoglund e colaboradores (1991), mostraram que o baço e o fígado de camundongos C57BL/6 foram infiltrados por células RMA-S após 15 minutos da inoculação e.v. Apesar de observarem decaimento na detecção das mesmas após 4 horas, essas proporções de infiltrações foram mantidas até 24 horas e, no fígado, foram detectadas mais células tumorais do que no baço, o qual a detecção foi muito pequena. Em relação ao timo, apesar de detectada fluorescência deste tecido em um animal (Fig. 18), não

foram observadas alterações macroscópicas (dado não mostrado) nem infiltrados pela análise histológica na maioria dos animais (Fig. 23).

No caso dos linfonodos, não houve alterações macroscópicas (dados não mostrados) e, apesar de ter sido detectada infiltração deste tecido em dois animais no ensaio de detecção de fluorescência em tecidos (Fig. 18) e pela análise histológica (Fig. 24), este não foi um padrão observado quando inoculada esta linhagem tumoral. Este fato pode estar relacionado à expressão diferencial de isoformas da molécula CD44, como discutido anteriormente, uma vez que a não expressão de alguma isoforma pela linhagem RMA-S.*Egfp*, em função do processo de mutação pelo qual a linhagem RMA-S sofreu, poderia impedir ou deixar de promover a migração e infiltração de medula óssea e linfonodos. Nos animais que apresentaram ascite mais acentuada foi observado o acúmulo de massas tumorais ao redor dos rins e hemorragia (Fig. 15). A análise de fluorescência em macerados de órgãos mostrou também que em alguns animais os rins apresentavam infiltração pelo tumor (Fig. 19). Apesar deste órgão conter uma cápsula de mesotélio protetora, pela análise histológica foi possível observar que a infiltração foi peri-renal, provavelmente devido ao acúmulo de massa ao redor do órgão (Fig. 26). Essa característica de acúmulo de massa ao redor dos rins e infiltração peri-renal também é observada em alguns linfomas humanos que atingem os rins (Urban e Fishman, 2000). O acúmulo de massa tumoral ao redor do rim pode ter sido um evento que ocorreu após o acúmulo de células tumorais no peritônio, o que poderia ter exposto os rins às células tumorais. Porém, não podemos afirmar que a colonização destes órgãos foi, de fato, devido ao acúmulo inicial de células tumorais na cavidade peritoneal, uma vez que houve uma pequena proporção de infiltração no fígado, baço e rins, após a inoculação da linhagem celular RMA.*Egfp*, a qual não provoca nenhum grau de ascite ou de acúmulo de células tumorais no peritônio.

No caso da patologia observada pela inoculação de RMA-S.*Egfp*, tem sido descrito na literatura que a associação de linfomas com a ocorrência de ascite é um evento raro. Quando ocorre, há uma hiper celularidade no líquido peritoneal associada a um comprometimento do fígado. Porém, a falência deste órgão parece ser mais incomum e de pior prognóstico (Karaosmanoglu *et al*, 2008; Vakar-Lopez e Yang, 1999; Kanbay *et al*, 2004; Lettieri and Berg, 2003; Dellon *et al*, 2006). De forma semelhante, a inoculação e.v. de células RMA-S.*Egfp* provocou o acúmulo de células tumorais e de líquido na cavidade peritoneal (Figs. 19 e 20) e alterações no fígado, com acúmulo de tumor na superfície do mesmo (Fig. 16). A infiltração deste órgão pelo tumor também foi observada por análises de detecção de células

fluorescentes em macerados do órgão (19) e análise histológica (Fig. 27), onde se constatou esse padrão na maioria dos animais.

Portando, de acordo os resultados descritos acima, conclui-se que a linhagem RMA-S.*Egfp* quando inoculada e.v. em camundongos C57BL/6 selvagens, preferencialmente infiltra e coloniza tecidos não-linfóides, com prevalência no fígado e cavidade peritoneal.

Como citado anteriormente, a inoculação das linhagens tumorais provocou doenças com características distintas e exclusivas, ou seja, a inoculação de RMA.*Egfp* induziu paralisia e a inoculação de RMA-S.*Egfp*, ascite. A ausência de ascite após inoculação das células RMA.*Egfp* não ocorreu por incapacidade destas células em colonizar a cavidade peritoneal, uma vez que, quando administradas diretamente neste local, induziam um grau de ascite ainda mais intenso do que as próprias células RMA-S.*Egfp* (dados não mostrados). Neste sentido, acreditamos que é o padrão de migração celular que está modificado nestas duas linhagens. Portanto, é provável que, além da expressão de p53 e TAP (e conseqüente expressão de MHC classe I), estas linhagens diferem também na expressão de molécula(s) de adesão e *homing receptor(s)*.

Uma vez que as linhagens tumorais inoculadas apresentaram indução de padrões de doenças e infiltração tecidual específicos e reprodutíveis, acredita-se que estes modelos experimentais possam ser utilizados no entendimento da fisiopatologia e migração dos linfomas, bem como ferramentas para estudos de terapias contra esses tumores.

Pensando-se no uso do modelo de paralisia induzido por tumor como ferramenta de estudo da resposta imune anti-tumoral, além do uso do par de células que podem ser alvo de CTLs ou de células NK, investigou-se indiretamente a capacidade de geração de memória imunológica contra tumores. Para isso, foram inoculados número de células RMA.*Egfp* capazes de provocar paralisia em camundongos que haviam sido previamente expostos à números pequenos de ambas as linhagens tumorais e que não apresentaram sinais de doença. Após a prévia exposição a números iguais ou inferiores a 1×10^3 células de ambas as linhagens tumorais e posterior inoculação de 1×10^6 células RMA.*Egfp* (número de células que causou paralisia em 50-100% dos animais em experimentos prévios), observou-se que alguns animais não apresentaram sinais de paralisia nem morte. Por outro lado, o grupo de animais previamente expostos à solução salina apresentou paralisia em 100% dos animais após a inoculação de 1×10^6 células RMA.*Egfp*, os quais morreram cerca de uma semana após o aparecimento dos sinais de paralisia. A partir desses resultados, sugere-se que deve ter ocorrido a geração de memória imunológica efetora, a qual foi capaz de proteger alguns animais dos sinais de doença e morte após a re-inoculação. Dessa forma, sugere-se também

que a inoculação de números iguais ou inferiores a 1×10^3 células de ambas as linhagens celulares, apesar de não causarem doença nem morte, são detectadas pelo sistema imune dos camundongos e são destruídas pelo mesmo, com conseqüente geração de memória imunológica. Vale ressaltar que os grupos expostos a números maiores de ambas as linhagens celulares (1×10^3 células) apresentaram maior porcentagem de animais sem sinais de doença do que os grupos expostos previamente a números menores de células, o que aponta para um efeito dose-dependente da proteção/imunização. Além disso, a inoculação de 1×10^2 e 1×10^3 células RMA.*Egfp* protegeram uma porcentagem maior de animais do que a inoculação de mesmos números de células RMA-S.*Egfp*.

Além disso, outro aspecto da possibilidade de utilização do modelo de paralisia induzido por tumor como ferramenta para o entendimento e manipulação da reposta imune contra tumores, foi o fato da linhagem RMA.*Egfp* expressar MHC de classe I na superfície e, assim, induzir uma resposta do sistema imune adquirido. Nesse sentido, foram iniciadas análises da importância de subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) na resposta anti-tumoral. Para abordar esta questão, foram inoculadas 1×10^6 células RMA.*Egfp* em camundongos com o mesmo *background* das células tumorais – C57BL/6 (H-2b) - *knockouts* de linfócitos T CD4 ou de linfócitos T CD8 em comparação a inoculação em animais selvagens C57BL/6. Alguns parâmetros foram avaliados neste experimento, tais como sobrevivência, aparecimento de doença e variação de peso. Em relação à sobrevivência dos animais *knockouts* de linfócitos T CD4 e de T CD8, as curvas apresentaram uma queda anterior à queda observada nos animais selvagens (Fig. 31), mostrando que a ausência de linfócitos T CD4 e CD8 foram importantes no combate ao tumor quando inoculado o número de um milhão de células tumorais. Os animais *knockouts* apresentaram paralisia com características semelhantes às observadas nos animais selvagens, ou seja, ascensão do aparecimento do sintoma e de acordo com o índice clínico utilizado neste trabalho. A ausência de populações de linfócitos nos animais *knockouts*, no entanto, antecipou o aparecimento da paralisia e pareceu provocar a piora do quadro clínico tanto em relação a paralisia quanto a perda de peso em comparação aos animais selvagens, principalmente no caso de *knockouts* de linfócitos T CD4 (Fig. 32). Porém, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os próprios animais selvagens apresentarem comprometimento da medula óssea e, em conseqüência, algum grau de imunossupressão que justifique a incapacidade de combate ao tumor e semelhança do aparecimento do sintoma em relação aos *knockouts*. Para elucidar a questão proposta de estudo do papel dos linfócitos T na resposta anti-tumoral contra as células RMA.*Egfp*, seriam necessários estudos em animais

selvagens e *knockouts* de linfócitos inoculados com números menores de células tumorais, como, por exemplo, números de células tumorais limitantes de aparecimento ou não de paralisia e morte observadas em animais selvagens (1×10^3 e 1×10^4 células tumorais). Assim, enquanto os animais selvagens inoculados com estes números menores de células tumorais se mostraram capazes de conter o aparecimento de doença e morte, a importância das populações de linfócitos do hospedeiro poderia ser analisadas nos animais *knockouts* de linfócitos inoculados nas mesmas condições. De qualquer forma, esses resultados apresentaram uma tendência de que a presença de linfócitos T CD4 e CD8 está associada a uma maior sobrevivência dos animais inoculados com o tumor RMA.*Egfp* e que os linfócitos T CD4 teriam um papel mais importante do que os CD8 para evitar o rápido aparecimento de paralisia e a queda brusca de peso. Uma vez que os linfócitos T CD4 atuam ajudando na ativação dos linfócitos T CD8, a ausência desta população de linfócitos implica na piora da função efetora dos linfócitos citotóxicos, o que poderia explicar o pior quadro clínico e sobrevivência dos animais *knockouts* de linfócitos T CD4.

De acordo com o discutido até o momento, sugere-se que os modelos murinos de tumor aqui descritos podem ser utilizados também como ferramentas para o entendimento e manipulação da resposta contra tumores.

Como o último objetivo deste trabalho era avaliar o impacto da expressão ectópica de genes relacionados a apoptose no comportamento *in vivo* da linhagem celular RMA.*Egfp*, alguns genes humanos foram clonados no vetor pMX.IRES.*Egfp*, dentre eles o gene *BCLW*. Após a clonagem, verificou-se, primeiramente, se a sequência do gene clonado havia sido alterada durante o processo de amplificação do gene por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), o que poderia provocar alterações na expressão da proteína de interesse. Embora a sequência do DNA de *BCLW* tenha apresentado 3 substituições de bases, isso não acarretou em alterações na sequência de aminoácidos da proteína codificada. Dessa forma, o vetor pMX.*BCLW.Egfp* foi utilizado para gerar a linhagem celular RMA.*BCLW.Egfp*. Acredita-se que o uso do gene humano para estudar o impacto no modelo murino de tumor não acarrete resposta imune alogênica, uma vez que a sequência deste genes entre humanos e camundongos é altamente conservada (Fig. 35).

Após a infecção e separação de células RMA.*BCLW.Egfp*, verificou-se que a nova linhagem celular expressava as proteínas EGFP, MHC de classe I na superfície celular e *BCLW*, como ilustram as figuras 36, 37 e 38, respectivamente. Dessa forma, garantiu-se que nos modelos murinos de tumor essa nova linhagem celular poderia ser observada pela detecção da proteína fluorescente, possivelmente sofreriam ataque por linfócitos T

citotóxicos, pois continuaram a expressar MHC de classe I como a linhagem parental e o impacto da expressão de BCLW *in vivo* poderia ser avaliado.

Antes de iniciar o estudo do comportamento *in vivo* desta nova linhagem celular, ela linhagem foi caracterizada *in vitro* para avaliar possíveis alterações de comportamento geradas pela expressão de BclW.

É descrito na literatura que a expressão de BCLW causa diminuição na proliferação celular em células de testículo (Yan, *et al.*, 2003). De acordo com os de proliferação celular, a expressão de BCLW não alterou a taxa de proliferação quando superexpresso em células RMA. Neste ensaio, as linhagens celulares RMA.*Egfp* e RMA.*BclW.Egfp* apresentaram período de latência curto (cerca de 2 horas) e tempo de duplicação de 15 e 12 horas, respectivamente.

Em relação à resistência a apoptose, é descrito na literatura que membros anti-apoptóticos da família BCL-2, como BCLW, conferem resistência a apoptose frente a diversos estímulos de morte (Huang, *et al.*, 1997). Para verificar se no modelo experimental descrito neste trabalho a expressão de BCLW conferia resistência a morte como descrito na literatura, foram feitos ensaios de resistência a apoptose utilizando-se como indutores de morte celular Cicloheximida, Actinomicina D e Etoposídeo, assim como procedido com as linhagens RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp*. Como mostra a figura 40, a linhagem celular que expressava a proteína BCLW (RMA.*BCLW.Egfp*) foi mais resistente a morte do que a linhagem que não expressava a proteína (RMA.*Egfp*) exposta a todas as drogas utilizadas e em diferentes doses (Two-Way ANOVA $p < 0,001$). Como esperado, a expressão de BCLW conferiu resistência a apoptose induzida por diferentes agentes indutores de estresse celular.

Após verificar as características celulares conferidas pela expressão da proteína BCLW *in vitro* e sabendo do potencial oncogênico de membros da família BCL2, iniciou-se o estudo das possíveis modificações que a expressão da proteína BCLW poderia causar *in vivo*.

Em relação à sobrevivência de animais inoculados com a linhagem RMA.*BCLW.Egfp*, observou-se que a inoculação de quantidades a partir de 1×10^2 células desta linhagem celular causou morte de camundongos C57BL/6 selvagens, ao contrário do observado no modelo padronizado de paralisia induzido por tumor pela inoculação de RMA.*Egfp*. A fim de comparar os efeitos da expressão ou não da proteína BCLW *in vivo*, foi feito um experimento onde foram inoculados camundongos C57BL/6 selvagens com células RMA.*Egfp* ou com células RMA.*BclW.Egfp*. Observou-se que a expressão de BCLW promoveu a antecipação das mortes dos camundongos, acompanhada pela apresentação de sinais de paralisia anterior e perda de peso mais acentuada. A infiltração tecidual também foi pior quando inoculada a

linhagem RMA.*BclW.Egfp* e houve o aparecimento de inchaço de membros anteriores ou posteriores em alguns animais inoculados com esta linhagem (dados não mostrados). Este sinal pode ter sido devido ao extravasamento de células tumorais da medula óssea dos ossos dos membros. Porém, não foi feito um estudo aprofundado sobre este sinal. Esses aspectos de antecipação de aparecimento de paralisia e morte pode ter ocorrido devido a maior resistência das células RMA.*BclW.Egfp* ao processo de apoptose, tornando-a capaz de sobreviver em condições adversas que dificultaram de alguma forma a sobrevivência ou atrasaram a colonização de células RMA.*Egfp*.

Em relação à infiltração tumoral de tecidos pelas células RMA.*BCLW.Egfp*, foi observado que os tecidos infiltrados foram praticamente os mesmos descritos para a linhagem RMA.*Egfp*, porém a primeira infiltrou num período de tempo mais curto do que o observado com a segunda linhagem (15 e 21 dias após a inoculação, respectivamente) e parece ter induzido a infiltração do pulmão (observado pela análise de fluorescência em macerado de órgãos). Como foi feito somente um experimento para análise de órgãos tanto histologicamente como para detecção de fluorescência, a observação da infiltração pulmonar deve ser vista com cautela e é necessários que outros experimentos sejam feitos para avaliar se a expressão de BCLW promove infiltração deste órgão. Além disso, alguns órgãos como o rim e o fígado apresentaram características de hemorragia quando inoculada a célula que expressava BCLW. A infiltração da medula óssea mostrou que mesmo com 15 dias houve infiltração por células que expressavam BCLW ao contrário do observado com células que não expressavam esta proteína neste mesmo período de tempo. Mais uma vez pode ser discutido que essas características de infiltração em período mais curto de tempo pode ser devido a maior resistência a morte conferida pela expressão de BCLW e que a linhagem RMA.*Egfp*, por ser menos resistente, precisou de maior período de tempo para induzir essas características.

De acordo com o que foi discutido acima, sugere-se que a expressão de BCLW promova maior resistência às células RMA, permitindo a sobrevivência das células *in vivo*, mesmo quando inoculadas em quantidades que normalmente não promovem sobrevivência quando não há expressão desta proteína. A expressão desta proteína também pareceu promover maior colonização de tecidos e de forma mais rápida, provavelmente também devido à maior resistência destas células a morte. É descrito que a superexpressão de membros da família BCL2 sozinhos não são muito oncogênicos e que o processo de malignidade requer outras mutações sinérgicas (Cory, et al., 2003). O fato do fenômeno de malignidade requerer outras mutações sinérgicas, como a ausência de p53 (Hanahan e

Weinberg, 2000), leva a sugestão de que a superexpressão de BCLW em células RMA-S, as quais não possuem p53 no compartimento nuclear, possa elucidar outras alterações que esta molécula pode induzir no modelo de ascite induzido pela inoculação de células RMA-S.*Egfp*.

Por fim, estes modelos podem ser utilizados como plataforma para estudos sobre migração e metástase de tumores, resposta imune antitumoral e impacto da expressão de genes no comportamento *in vivo* de tumores.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Células RMA.*Egfp* e RMA-S.*Egfp* apresentaram padrões de migração diferentes quando inoculadas e.v. em camundongos singênicos selvagens e deficientes. Enquanto a primeira infiltrou a medula óssea e tecidos linfóides, a segunda colonizou preferencialmente o fígado, rins e peritônio, e não foi encontrada na medula óssea;
2. Provavelmente como resultado destes padrões diferentes, estas linhagens induziram patologias distintas nos animais inoculados. Enquanto RMA.*Egfp* causou paralisia ascendente e progressiva, a linhagem RMA-S.*Egfp* induziu ascite;
3. Quantidades iguais ou inferiores a 1×10^3 células de ambas linhagens não foram capazes de induzir qualquer sinal patológico. Interessantemente, uma parte dos animais inoculados desta maneira ficou protegida da re-inoculação com a dose patogênica (1×10^6) de células RMA.*Egfp*.
4. Camundongos deficientes em linfócitos T CD4 ou CD8 desenvolveram uma doença mais grave quando inoculados com células RMA.*Egfp*, apresentando maior gravidade da paralisia, perda de peso mais intensa e mortalidade mais rápida. Camundongos deficientes de linfócitos T CD4 apresentaram maior gravidade da paralisia e perda de peso do que os deficientes de linfócitos T CD8.
5. A expressão da proteína BCLW em células RMA promoveu aumento de resistência a apoptose *in vitro*;
6. A inoculação e.v. de células RMA.*BclW.Egfp* induziu um quadro clínico mais maligno, provocando o aparecimento de inchaço de membros e hemorragia no fígado e nos rins, além de um maior grau de paralisia com antecipação da morte dos animais, demonstrando que este membro da família Bcl-2 apresenta, de fato, um potencial tumorigênico *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2007 Oct; 19(5):488-96.

Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Sep; 32(9):1053-61. Review.

Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol.* 1998b; 161(5):2333-8.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion. *Blood.* 1998a; 91(2):623-9.

Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am J Pathol.* 1993 Apr; 142(4):1187-97.

Attaya M, Jameson S, Martinez CK, Hermel E, Aldrich C, Forman J, Lindahl KF, Bevan MJ, Monaco JJ. Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature.* 1992; 355:647-49.

Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell.* 2007 Aug 24;130(4):597-600. Review.

Bae IH, Park MJ, Yoon SH, Kang SW, Lee SS, Choi KM, Um HD. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res.* 2006 May 15; 66(10):4991-5.

Bernardi R, Grisendi S, Pandolfi PP. Modelling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications. *Oncogene.* 2002 May 13; 21(21):3445-58.

Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting- Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999 Dec; 17(12):3835-49.

Bosaeus I, Daneryd P, Lundholm K. Dietary intake, resting energy expenditure, weight loss and survival in cancer patients. *J Nutr.* 2002 Nov; 132(11 Suppl):3465S-3466S.

Brox A, Shustik C. Non-Hodgkin's lymphoma of the spleen. *Leuk Lymphoma.* 1993; 11(3-4):165-71. Review.

Hann B, Balmain A.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Burger JA, Burkle A. The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *Br J Haematol.* 2007; 137 (4):288-96.
- Chang CC, Campoli M, Ferrone S. HLA class I antigen expression in malignant cells: why does it not always correlate with CTL-mediated lysis? *Curr Opin Immunol.* 2004; 16(5):644-50. Review.
- Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 39(1):69-86.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24; 22(53):8590-607. Review.
- Dellon ES, Morris SR, Tang W, Dunphy CH, Russo MW. Acute liver failure due to natural killer-like T-cell leukemia/lymphoma: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol.* 2006; 12 (25): 4089-92.
- Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol.* 2001 Jun 11;153(6):1277-86.
- Donehower LA. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin Cancer Biol.* 1996 Oct; 7(5):269-78. Review.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21(2):137-48. Review.
- Epelbaum R, Haim N, Ben-Shahar M, Ben-Arie Y, Feinsod M, Cohen Y. Non-Hodgkin's lymphoma presenting with spinal epidural involvement. *Cancer.* 1986; 58(9):2120-4.
- Grufman P, Karre K. Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur J Immunol.* 2000; 30(4):1088-93.
- Günthert U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1993; 184:47-63. Review.
- Hacker UT, Schildhauer I, Barroso MC, Kofler DM, Gerner FM, Mysliwietz J, Buening H, Hallek M, King SB. Gene transfer preferentially selects MHC class I positive tumour cells and enhances tumour immunogenicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 May;55(5):547-57.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1):57-70. Review.
- Hann B, Balmain A. Building validated mouse models of human cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(6):778-84. Review.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA,

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994 Sep 1; 84(5):1361-92. Review.

Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, *et al.* Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med*. 2006 Apr; 12(4):466-72.

Hoglund P, Glas R, Ohlen C, Ljunggren HG, Karre K. Alteration of the natural killer repertoire in H-2 transgenic mice: specificity of rapid lymphoma cell clearance determined by the H-2 phenotype of the target. *J Exp Med*. 1991; 174(2):327-34.

Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene*. 1997 Jan 30; 14(4):405-14.

Huang MS, Wang TJ, Liang CL, Huang HM, Yang IC, Yi-Jan H, Hsiao M. Establishment of fluorescent lung carcinoma metastasis model and its real-time microscopic detection in SCID mice. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(4):359-68.

Humblet C, Greimers R, Boniver J, Defrense MP. Stages in the development of radiation-induced thymic lymphomas in C57 BL/Ka mice: preleukemic cells become progressively resistant to the tumor preventing effects of a bone marrow graft. *Exp Hematol*. 1997 Feb; 25(2):109-13.

Jakic-Razumovic J, Aurer I. The World Health Organization classification of lymphomas. *Croat Med J*. 2002.43 (5):527-34.

Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*. 2001 Apr 26; 410(6832):1111-6.

Kanbay M, Gur G, Korkmaz M, Demirci B, Boyacioglu S. Hepatic lymphoma metastasis presenting with severe acute liver failure: a rare case. *Turk J Gastroenterol*. 2004; 15 (2): 94-6.

Kaneko K, Yano M, Yamano T, Tsujinaka T, Miki H, Akiyama Y, Taniguchi M, Fujiwara Y, Doki Y, Inoue M, Shiozaki H, Kaneda Y, Monden M. Detection of peritoneal micrometastases of gastric carcinoma with green fluorescent protein and carcinoembryonic antigen promoter. *Cancer Res*. 2001; 61(14):5570-4.

Karaosmanoglu D, Karcaaltincaba M, Oguz B, Akata D, Ozmen M, Akhan O. CT findings of lymphoma with peritoneal, omental and mesenteric involvement: Peritoneal lymphomatosis. *Eur J Radiol*. 2008 May 28; Suppl.:S52-5.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986; 319:675-8.

Kaufmann T, Schinzel A, Borner C. Bcl-w(edding) with mitochondria. *Trends Cell Biol*. 2004 Jan; 14(1):8-12. Review.

- Khaldoyanidi S, Denzel A, Zöller M. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leukoc Biol.* 1996 Nov;60(5):579-92.
- Kim YM, Ramirez JA, Mick JE, Giebler HA, Yan JP, Nyborg JK. Molecular characterization of the tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in tax transactivation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(26):18750-7.
- Klausner RD. Studying cancer in the mouse. *Oncogene.* 1999 Sep 20; 18(38):5249-52. Review
- Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature.* 1992 May 28; 357(6376):342-4.
- Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:10962-66.
- Lairmore MD, Silverman L, Ratner L. Animal models for human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection and transformation. *Oncogene.* 2005; 24(39):6005-15. Review.
- Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358,15-16.
- Lee HJ, Im JG, Goo JM, Kim KW, Choi BI, Chang KH, Han JK, Han MH. Peripheral T-cell lymphoma: spectrum of imaging findings with clinical and pathologic features. *Radiographics.* 2003; 23(1):7-26. Review.
- Lettieri CJ, Berg BW. Clinical features of non-Hodgkins lymphoma presenting with acute liver failure: a report of five cases and review of published experience. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98(7):1641-6.
- Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death and differentiation.* 2006; 13:1027-36.
- Li X, Wang J, An Z, Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun F, Moossa AR, Hoffman RM. Optically imageable metastatic model of human breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19(4):347-50.
- Lipsky MS, Sternbach MR. Evaluation and initial management of patients with ascites. *Am Fam Physician.* 1996 Sep 15; 54(4):1327-33.
- Ljunggren HG, Karre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants: analysis of the mechanism. *J Exp Med.* 1985; 162:1745-59.
- Ljunggren HG, Karre K. In search for the missing self: MHC class I molecules and NK recognition. *Immunol Today.* 1990; 11:237-44. Review.

- MacDonald TJ, Tabrizi P, Shimada H, Zlokovic BV, Laug WE. Detection of brain tumor invasion and micrometastasis in vivo by expression of enhanced green fluorescent protein. *Neurosurgery*. 1998; 43(6):1437-42.
- Malmberg KJ, Ljunggren HG. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin. Cancer Biol.* 2006; 16(1):16-31. Review.
- Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(5):485-64. Review.
- Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiol Clin North Am.* 2008 Mar; 46(2):175-98. Review.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell.* 1989 Apr 7; 57(1):79-88.
- McKenna RW, Hernandez JA. Bone marrow in malignant lymphoma. *Hematol. Oncol Clin North Am.* 1988; 2(4):617-35. Review.
- Miyakoshi N, Shimada Y, Suzuki T, Hongo M, Itoi E. Magnetic resonance imaging of spinal involvement by hematopoietic malignancies requiring surgical decompression. *J Orthop Sci.* 2003; 8(2):207-12.
- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science.* 1993 May 14; 260(5110):926-32. Review.
- Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol.* 2008 Aug; 18(4):260-7.
- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer.* 1982 May 15; 49(10):2112-35.
- O'Reilly LA, Print C, Hausmann G, Moriishi K, Cory S, Huang DC, Strasser A. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ.* 2001; 8:486-94.
- Pals ST, de Gorter DJJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood.* 2008; 110: 3102-3111.
- Pals ST, Koopman G, Heider KH, Griffioen A, Adolf GR, Van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Horst E. CD44 splice variants: expression during lymphocyte activation and tumor progression. *Behring Inst Mitt.* 1993 Aug; (92):273-7. Review.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1; 1644(2-3):83-94. Review.

Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, Piccaluga PP, Gamberi B, Zinzani PL, Leoncini L, Falini B. The pathologist's view point. Part I-indolent lymphomas. *Haematologica*. 2000 Dec; 85(12):1291-307. Review.

Pileri SA, Milani M, Fraternali-Orcioni G, Sabattini E. From the R.E.A.L. Classification to the upcoming WHO scheme: a step toward universal categorization of lymphoma entities? *Ann Oncol*. 1998 Jun; 9(6):607-12. Review.

Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*. 1991; 354(6354):528-31.

Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Köntgen F, Adams JM, Cory S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13; 95(21):12424-31.

Ren R. Modeling the dosage effect of oncogenes in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2004 Jan;11(1):25-34. Review.

Resor L, Bowen TJ, Wynshaw-Boris A. Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):669-75.

Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 107(4):1255-64. Review.

Rogers BB. Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Semin Oncol Nurs*. 2006; 22(2):67-72. Review.

Rolink AG, Massa S, Balciunaite G, Ceredig R. Early lymphocyte development in bone marrow and thymus. *Swiss Med Wkly*. 2006; 136:679-83. Review.

Roodman GD. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer*. 1997 Oct 15; 80(8 Suppl):1557-63.

Roos E. Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1991; 10(1):33-48. Review.

Rosenberg SA. Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 1994 Sept 1; 84(5): 1359-60.

Russell LD, Warren J, Debeljuk L, Richardson LL, Mahar PL, Waymire KG, Amy SP, Ross AJ, MacGregor GR. Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. *Biol Reprod*. 2001 Jul; 65(1):318-32.

Sabapathy K, Nam SY. Defective MHC class I antigen surface expression promotes cellular survival through elevated ER stress and modulation of p53 function. *Cell Death Differ*. 2008 15(9):1364-74.

Smith MEF. MHC class I expression in colorectal tumors. *Semin Cancer Biol*. 1991; 2:17.

Sturm JW, Keese MA, Petruch B, Bönninghoff RG, Zhang H, Gretz N, Hafner M, Post S, McCuskey RS. Enhanced green fluorescent protein-transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and quantification. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(5):395-405.

Tanabe KK, Saya H. The CD44 adhesion molecule and metastasis. *Crit Rev Oncog*. 1994; 5(2-3):201-12. Review.

Terpe HJ, Störkel S, Zimmer U, Anquez V, Fischer C, Pantel K, Günthert U. Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol*. 1996 Feb; 148(2):453-63.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28; 281(5381):1312-6. Review.

Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7:601-24. Review.

Trisciuglio D, Desideri M, Ciuffreda L, Mottolose M, Ribatti D, Vacca A, Del Rosso M, Marcocci L, Zupi G, Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth. *J Cell Physiol*. 2005; 205(3):414-21.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984 Nov 30; 226(4678):1097-9.

Urban BA, Fishman EK. Renal lymphoma: CT patterns with emphasis on helical CT. *Radiographics*. 2000 Jan-Feb; 20(1):197-212. Review.

Vakar-Lopez F, Yang M. Peripheral T-cell lymphoma presenting as ascites: a case report and review of the literature. *Diagn Cytopathol*. 1999; 20(6):382-4.

van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer*. 1991 Apr 22; 48(1):85-91.

Vanneuville B, Janssens A, Lemmerling M, de Vlam K, Mielants H, Veys EM. Non-Hodgkin's lymphoma presenting with spinal involvement. *Ann Rheum Dis*. 2000; 59(1):12-4.

Vermeulen M, Le Pesteur F, Gagnerault MC, Mary JY, Sainteny F, Lepault F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1998 Aug 1; 92(3):894-900.

Wang J, Loberg R, Taichman RS. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis*. 2006. 25(4): 573-87. Review.

Wu L. T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:121-26. Review.

- Xiong T, Zhang Z, Liu BF, Zeng S, Chen Y, Chu J, Luo Q. In vivo optical imaging of human adenoid cystic carcinoma cell metastasis. *Oral Oncol.* 2005 Aug; 41(7):709-15.
- Yan W, Huang JX, Lax AS, Pelliniemi L, Salminen E, Poutanen M, Toppari J. Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control. *Mol Endocrinol.* 2003 Sep; 17(9):1868-79. Epub 2003 Jun 13.
- Yang H, Fang G, Huang X, Yu J, Hsieh CL, Grossniklaus HE. In-vivo xenograft murine human uveal melanoma model develops hepatic micrometastases. *Melanoma Res.* 2008 Apr; 18(2):95-103.
- Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *PNAS.* 2000; 97(3):1206-11.
- Yang Y, Fruh K, Chambers J, Waters JB, Wu L, Spies T, Peterson PA. Major histocompatibility complex (MHC)-encoded HAM2 is necessary for antigenic peptide loading onto class I MHC molecules. *J Biol Chem.* 1992; 15; 267(17):11669-72.
- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2001.
- Zahalka MA, Okon E, Gosslar U, Holzmann B, Naor D. Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44 and hyaluronate-dependent. *J Immunol.* 1995; 154(10):5345-55.
- Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. *J Immunol.* 2007 Apr 1; 178(7):4011-6. Review.
- Zhang C, Chakravarty D, Sakabe I, Mewani RR, Boudreau HE, Kumar D, Ahmad I, Kasid UN. Role of SCC-S2 in experimental metastasis and modulation of VEGFR-2, MMP-1, and MMP-9 expression. *Mol Ther.* 2006; 13(5):947-55.
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Oct 23; 227(3):707-11.
- Zhao S, Tang QL, He MX, Yang F, Wang H, Zhang WY, *et al.* A novel nude mice model of human extranodal nasal type NK/T-cell lymphoma. *Leukemia.* 2008 Jan; 22(1):170-8. Epub 2007 Sep 13.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001 Oct; 92(1):57-70.