

consoante o número de nichos disponíveis (Rossi *et al.* 2005). Aquando a formação da selectina P, a enzima C2 desempenha um papel muito importante na sua formação ao dar origem a eventos de glicosilação. Em ratinhos com falta de enzima C2, o recrutamento de células era menor em relação ao *wild-type*, o que demonstra que a interacção PSGL-1-selectina P é requerida para um recrutamento eficiente mas dependente ao enzima C2 (Rossi *et al.* 2005).

1.4. RelB e LLA-T

Recentemente, foi observado que a proteína RelB desempenha um papel importante na formação de leucemia das células T. Santos, N. R. *et al.* reportam que a expressão de RelB nas células estromais não-hematopoéticas promove a leucemia de células T em ratinhos transgénicos TEL-JAK2 (ratinhos modelo da leucemia linfocítica aguda das células T por mecanismos ainda não clarificados (dos Santos *et al.* 2008)).

As proteínas Rel/NF- κ B são factores de transcrição que desempenham um papel muito importante na regulação de diversos processos celulares que envolvem imunidade inata e adaptativa, desenvolvimento, inflamação, diferenciação e apoptose (Weih *et al.* 1995; dos Santos *et al.* 2008; Vogel *et al.* 2009). Foi mostrado anteriormente que estas proteínas aparecem activadas em alguns cancros e que conseguem activar genes que permitem à célula sobreviver, proliferar, invadir, produzir quimiocinas e formar novos vasos (angiogénese). A activação da via de sinalização de NF- κ B nestas patologias pode dever-se a rearranjos ou mutações nos próprios genes ou em genes de intervenientes da via de sinalização.

As proteínas NF- κ B/Rel pertencem a uma família de reguladores transcricionais capazes de formar dímeros, ligar ao DNA e localizar no núcleo através de uma região conservada com 300 aminoácidos (Weih *et al.* 1995). A capacidade de formar homo ou heterodímeros aumenta a especificidade na ligação ao DNA, e isto é possível ao facto de haver pequenas variações na sequência consensus 5'-GGGGYNNCCY-3' que aumenta as combinações de Rel e a regulação de diferentes genes (Vogel *et al.* 2009). A actividade destes dímeros é modulada por membros da família de proteínas I κ B (inibidores de NF- κ B). Quando complexos NF- κ B/Rel estão

inactivados encontram-se no citoplasma associados aos inibidores I κ B (Vogel *et al.* 2009). Para os dímeros serem libertados da interacção com estes inibidores, é necessário que estes inibidores sejam fosforilados pelas cinases I κ B nos resíduos de serina, seguido de ubiquitinação e degradação pelo proteossoma (dos Santos *et al.* 2008). A família NF- κ B é constituída por RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 e p52/p100, formando dímeros entre si e desta forma dar origem à transcrição dos genes alvo. As proteínas p52 e p50 são formadas a partir de processamento proteolítico das proteínas p100 e 105, respectivamente, e só quando formam heterodímeros com RelA, RelB ou c-Rel é que actuam como activadores transcripcional, senão actuam como repressor transcripcional (dos Santos *et al.* 2008).

Como referido, os complexos NF- κ B encontram-se associados a I κ B e depois de um estímulo (factores, imunológico, etc) os inibidores dissociam-se dos complexos e translocam-se para o núcleo. Duas vias de sinalização estão identificadas na activação de NF- κ B, a via canónica (clássica) e a via não canónica (alternativa). Para a activação da via canónica, em resposta pró-inflamatória, é necessário a ligação aos receptores Toll-*like* ou estimulação por citocinas da superfamília de TNF (factor de necrose tumoral). A activação do receptor leva ao recrutamento de adaptores (p. e. TRAF) que por sua vez recruta o complexo IKK, levando à fosforilação de duas serinas no N-terminal e posterior degradação do I κ B (Figura 12A). Esta via vai activar dímeros NF- κ B como o RelA, c-Rel e p50.

A via alternativa ocorre durante o desenvolvimento de órgãos linfóides na geração de linfócitos T e B. A activação desta via é fraca face a sinais de desenvolvimento e mais lenta em resposta a sinais inflamatórios em comparação com a via clássica (dos Santos *et al.* 2008). A utilização desta via é feita por membros específicos da família de receptores TNF e aquando a ligação do ligando dá-se a activação da NIK (cinase indutora de NF- κ B) que por sua vez, activa o complexo IKK α (formado por duas subunidades IKK α). Após a estimulação do complexo, este fosforila os resíduos de serina do C-terminal do p100 levando ao processamento pelo proteossoma para gerar p52 por ubiquitinação (Figura 12B). A libertação do p52/RelB, p50/RelA e p50/RelB precede a migração para o núcleo. Quando esta via é activada pela ligação do receptor linfotóxina β , regula a expressão de quimiocinas como CXCL12, CCL19, CXCL13 ou CCL12 (Vogel *et al.* 2009).

A ativação do NF- κ B, em células infiltrantes, está referido como responsável pela iniciação e progressão de tumores. A via clássica foi a primeira a ser detectada em tumores como activadoras da via NF- κ B, mas recentemente a via não canónica foi descrita estando activada em carcinomas da mama, cancro da próstata e leucemia linfóide (Vogel *et al.* 2009).

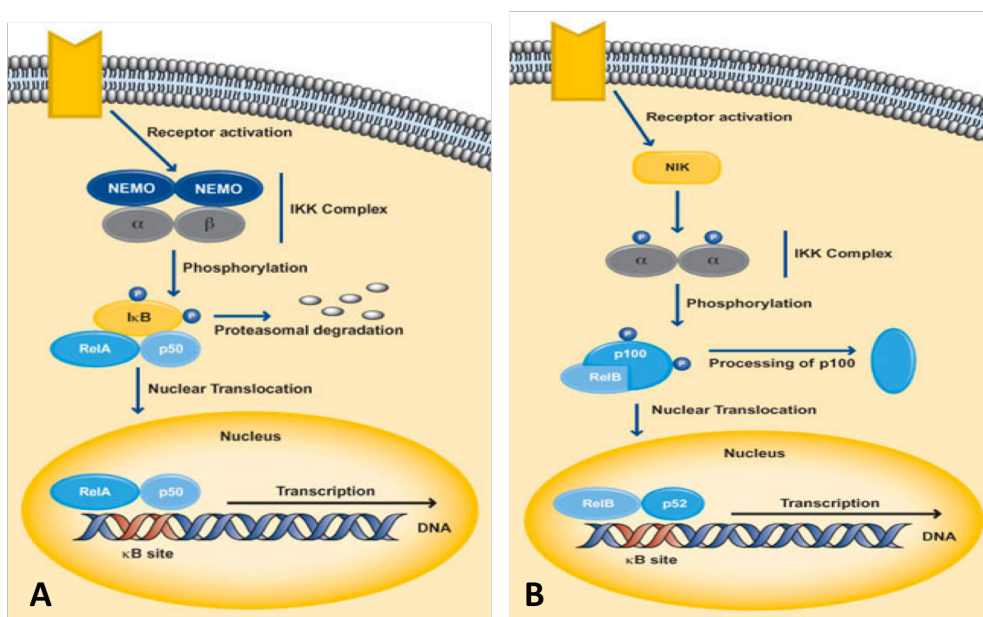


Figura 12 - Resumo das vias de sinalização do NF- κ B.

1.5. O microambiente e o cancro

O microambiente no qual um tumor está inserido não é constituído apenas por células malignas. A maioria dos tumores sólidos contém células estromais e que por vezes, ultrapassa, em número, as células cancerígenas (Balkwill 2004). As células que se encontra mais presente num tumor são os leucócitos (como dito anteriormente), macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.

Aquando a formação do tumor, são recrutadas células que facilitam a migração de células do tumor primário, a sobrevivência em circulação e consequente metastização. Apesar de poder haver muitas células malignas que consigam entrar na circulação, estas ainda tem de conseguir chegar ao local de infiltração. Das poucas células que conseguem entrar, elas têm de encontrar um microambiente que não

reprima seu o potencial metástico. Mas se por acaso houver um distúrbio ao nível do microambiente, células cancerígenas que tenham permanecido num estado dormente, podem “acordar” e proliferar. O microambiente torna-se desta forma importante para que possam proliferar e sobreviver (Joyce *et al.* 2009).

O balanço necessário entre a proliferação e apoptose para manter a homeostase é obtido através de comunicação intracelular. A perda do controlo por parte das células tumorais, não impede a interacção destas com células vizinhas não malignas. Os tumores primários e metásticos atraem células derivadas da medula óssea criando distúrbios sistémicos e promovendo a progressão, sobrevivência, etc (Joyce *et al.* 2009).

A migração pela corrente sanguínea dá-se com a protecção de plaquetas que produzem um sistema de coagulação e que ajudam as células cancerígenas a alojarem-se nos tecidos alvo (Joyce *et al.* 2009).

Como mencionado, o microambiente e a complexa rede de quimiocinas explorada por células do sistema imune influencia bastante o desenvolvimento, a sobrevivência, a proliferação e a migração. As células malignas tiram, da mesma forma, partido deste sistema. Todas estas provas mostram a importância de estudar os mecanismos e que influência tem nas várias características das leucemia linfocítica aguda das células T.

1.6. Objectivos

O facto da proteína RelB induzir a expressão de quimiocinas, através da via alternativa, e de ter sido demonstrado que as quimiocinas participam na formação de tumores, leva-nos a colocar a questão se as quimioquinas participam no desenvolvimento de LLA-T. Por isso, os objectivos deste trabalho são identificar receptores de quimioquinas expressos em linhas celulares de LLA-T e verificar quais são os efeitos da estimulação do receptor de quimioquina CCR7 nessas mesmas linhas.

2. Material e Métodos

2.1. Linhas celulares

Para este trabalho obtiveram-se 18 linhas celulares humanas. Esta selecção inclui 12 linhas de LLA-T (ALL-SIL, BE-13, CCRF-CEM, DND41, HPB-ALL, JURKAT, KOPTK1, MOLT-3, P12/Ichikawa, PF382, RPMI8402, SUPT1 e TALL-1), 2 linhas celulares de leucemia linfóide aguda das células B (NALM6, RS4;11), 1 de leucemia mielóide crónica (K562) e uma originária de um adenocarcinoma da mama (MCF-7). Para as transfecções, foi utilizada a linha celular de rim embrionária humano 293T. As células foram fornecidas pelo Dr. João Barata do Instituto de Medicina Molecular de Lisboa (HPB-ALL, JURKAT, K562, NALM6 e RS4;11), pela Dr. Hind Medyouf do Laboratório Terry Fox em Vancouver (todas as restantes linhas LLA-T) e pela Dr. Raquel Seruca do IPATIMUP do Porto (MCF-7).

2.2. Cultura

Sendo as linhas de origem hematopoética células em suspensão, estas foram mantidas em meio RPMI-1640 (LONZA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (PAA), penicilina (10000 unidades/mL) e streptomina (10000 µg/mL) e 200 mM L-Glutamina da GIBCO®. As células aderentes como 293T e MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM (LONZA) suplementado da mesma forma que o meio RPMI-1640.

As células foram descongeladas a 37°C e colocadas em meio previamente aquecido, sendo de seguida centrifugadas em tubos de ensaio cónicos de 15 ml durante 5 minutos a 1400 rotações por minuto de modo a retirar o DMSO na sua totalidade. Estas foram então ressuspensas em 5 a 10 ml de meio e colocadas em garrafas T25 da NUNC™ até haver número suficiente de células para fazer passagem para garrafas T75 (NUNC™). Durante todo o processo, o meio era substituído de dois em dois dias antes de haver mudança pronunciada da cor do meio.

Para fazer a contagem de células, pipetou-se 30 μL de 0,5% de azul tripano para um tubo eppendorf e adicionou-se 30 μL de suspensão celular (dissociou-se os agregados de células pipetando várias vezes a cultura com o auxílio de uma pipeta de 10 mL). Pipetou-se 30 μL do total e encheu-se a câmara de Neubauer de 0,0025 mm^2 (Hausser Scientific). Após a visualização da lâmina ao microscópio contaram-se o número de células presentes em quatro quadrados de 1 mm^2 . A equação para determinar o número de células por milímetro cúbico é: média do número de células em cada quadrado \times factor de diluição \times 10.

2.3. Congelação de células

A congelação foi feita em 70% de meio, 20% de BCS (bovine calf serum) da PAA e 10% DMSO (MERCK). As células foram colocadas neste meio em tubos de congelação de 2 mL (Bioline), contendo entre $4\text{-}5 \times 10^6$ células em 0,8 mL. Estes tubos foram colocados num contentor de congelação Nalgene® Cryo 1°C de modo que o processo de congelação se dê de forma gradual (1°C por minuto).

2.4. Extração de RNA

Para proceder à extração de RNA contaram-se cerca de 20×10^6 de células e de seguida centrifugaram-se a 1400 rpm durante 5 minutos, a 4°C num tubo de 15 mL. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendia-se vigorosamente em 1 mL de TRIZOL®, transferindo-se para um tubo estéril de 2 mL. Os tubos eram fechados e deixados à temperatura ambiente durante 5 minutos de modo a se dar a dissociação completa dos complexos nucleoproteicos. Após este passo as amostras podiam ser congeladas a -80°C ou então seguia-se imediatamente para a extração. Por cada 1 mL de TRIZOL®, adicionou-se 200 μL de clorofórmio (BDH Prolabo®), agitando-se os tubos à mão durante 15 segundos. Incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. de seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a uma rotação de 12000g, à temperatura de 4°C. Terminada a centrifugação, transferiu-se a parte superior aquosa (~0,6 mL) para um tubo eppendorf limpo de 2 mL e adicionou-se 500

μL de isopropanol (BDH Prolabo) por 1 mL de TRIZOL[®] de forma a precipitar o RNA. Vortexaram-se as amostras e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras eram colocadas na centrífuga a não mais que 12000g a 4°C durante 10 minutos, ficando visível o precipitado no fundo do tubo. Retirou-se o sobrenadante e pipetou-se 1 mL de etanol (AGA) a 75% (livre de RNase). De seguida, vortexaram-se as amostras e centrifugadas a uma rotação não superior a 7500g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado e o pellet secado ao ar durante 5-10 minutos não permitindo a secagem completa de modo a evitar o decréscimo da solubilidade. O RNA era dissolvido em 20-50 μL de água livre de RNase e incubado a 55-60°C durante 10 minutos. Depois desta fase, o armazenamento a longo prazo de RNA foi feito a -80°C.

No fim, verificou-se a qualidade do RNA através da migração num gel de agarose (Seakeam[®]) a 1% numa diluição de RNA de 1/10 em água tratada com DEPC. Para medir a qualidade do RNA, diluiu-se 5 μL da solução de RNA em 495 μL de água tratada com DEPC num tubo de eppendorf estéril. A medição foi feita no espectrofotómetro UV-1700 SHIMADZU a $\lambda=260\text{nm}$. Primeiro pipetou-se 500 μL de água tratada com DEPC numa cuvette de quartzo de 10 mm (Hellma[®]) e ajustou-se a densidade óptica (OD) para zero. De seguida, mediu-se a densidade óptica das amostras. Repetiu-se o mesmo procedimento mas para $\lambda=280\text{nm}$.

A concentração de RNA foi calculada pela equação [] = $OD_{260} \times 100$ (factor de diluição) $\times 40$, obtendo a concentração em ng/ μL . A densidade óptica a $\lambda=280\text{nm}$ foi medida com o propósito de indicar o nível de proteínas contaminantes, sendo calculada através da razão A_{260}/A_{280} .

2.5. RT-PCR

Depois da extracção de RNA e respectiva quantificação, procedeu-se à transcrição reversa para produzir cDNA. Adicionou-se 1 μg de RNA a 1 μL de tampão reacção 10 \times com MgCl_2 (Ferramentas). Prefez-se até aos 9 μL com água tratada com DEPC. Para impedir a contaminação de DNA pipetou-se 1 μL de DNase livre de RNA (Fermentas, #EN0521). De seguida, incubaram-se as amostras a 37°C durante 30 minutos. Fez-se uma breve centrifugação e adicionou-se 1 μL de EDTA a 25mM

(Fermentas) sendo as amostras colocadas a 65°C durante 10 minutos de modo a inactivar a Dnase I. As amostras ficavam assim prontas para a transcrição reversa.

A transcrição reversa foi feita de acordo com o protocolo do kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, #K1621). Depois de completada a reacção, as amostras foram guardadas a -20°C.

Para proceder à amplificação por PCR (*polymerase chain reaction*) preparou-se uma *mix* contendo 2 µL de DNA, 5 µL de tampão GoTaq (1X), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (200 nM), 0,5 µL de cada primer (250 nM), 0,1 µL GoTaq polimerase (0,02U/µL) e prefazendo com água até 25 µL. Esta *mix* foi pipetada para tubos de eppendorf de 0,2 mL e posteriormente colocadas na máquina de PCR *MyCycler* da BIORAD.

O PCR foi realizado com os seguintes primers sintetizados pela SIGMA: β-actina, 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3' e 5'-AGGTCCAGACGCAGGATGGCAT-3' (Villablanca *et al*, 2008); CCR7, 5'-GAAAGTCCAGAACTGTTCCACCTGC-3' e 5'-TTCCTCACCAAGCCAAGAAGTCTCCCC-3' (Villablanca *et al*, 2008); CCR9, 5'-CATTGACGCCTATGCCATGT-3' e 5'-GACCTGGAAGCAGATGTCAATGT-3' (Qiuping *et al*, 2003); CXCR4, 5'-CCTTCATCAGTCTGGACCGC-3' e 5'-CCTTGGCCTCTGACTGTTGG-3' (Patel *et al*, 2001); SELPLG, 5'-GAGACAGGCCACCGAATATG-3' e 5'-TGGTGTCAGTGCTGTTCCCTC-3' desenhados com a ajuda do *software* Primer3. A reacção foi feita com a desnaturaçãõ inicial a 94°C durante 5 minutos, com 26 (β-actina) ou 32 (restantes genes) ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturaçãõ), 60°C (annealing) e 72°C (extensãõ), finalizando com 7 minutos a 72°C para a extensãõ final.

A migraçãõ foi procedida em gel de agarose de 1,5% para a β-actina, 2% para o CCR7 e PSGL-1 e 2,5% para o CCR9 e CXCR4. Para isso, carregou-se o gel com 10 µL do volume da reacçãõ e no fim 6 µL de marcador *ladder* 100bp da BIORON . Esta fase foi procedida com a vizualizaçãõ das bandas de DNA num transiluminador UV acoplado a uma câmara Gene FLASH.

2.6. Extraçãõ de proteína com tampãõ RIPA

Cerca de 20×10^6 células foram centrifugadas a 1400 rpm durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e procedeu-se à lavagem da pellet através da ressuspensão com 1 mL de PBS frio. Transferiu-se para um tubo eppendorf de 1,5 mL e após uma breve centrifugação retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o passo anterior. Depois de retirar o sobrenadante, adicionou-se tampão RIPA (10mM Tris, pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X100; 0,5% Na deoxicolate; 0,1% SDS) com inibidores de protease (10 μ g/mL leuptina; 10 μ g/mL aprotina; 1mM PMSF), arrefecido em gelo, numa proporção de 100 μ L por cada 10×10^6 células. Ressuspendeu-se a *pellet* e colocou-se em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, quando depois o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Os tubos foram congelados em azoto líquido e armazenado a -80°C.

Para preparar as amostras para serem carregadas em gel pipetou-se 50 μ L de amostra para um tubo eppendorf e adicionou-se o mesmo volume de 2 \times tampão *sample* (10% SDS, 20% glicerol, 0,1% bromofenol, 5% β -mercaptanol e 0,5M Tris-HCl, pH 6,8). De seguida, ferveram-se as amostras a 100°C durante 5 minutos. Após este passo as amostras foram carregadas no gel, sendo o restante guardado a -20°C.

2.7. SDS-PAGE

O gel de separação foi preparado com 30% de acrilamida (PROTOGEL®), 1M Tris (pH 8,8), 10% SDS, 10% persulfato de amónia (Applichem), TEMED (BDH Electran®) e água destilada. A concentração final do gel foi de 12,5%. Quanto ao gel *stacking* o tampão utilizado foi 0,5M Tris (pH 6,8) e a concentração final 4,5%.

Colocaram-se os géis preparado no suporte do *Mini-Protean* (BioRad) seguindo as indicações do fabricante, e adicionou-se tampão de electroforese Tris-Glicina (25mM Tris, pH 8.3; 192mM glicina; 0.1 % SDS) até os géis estarem completamente submersos. Carregaram-se os géis com 20 μ L de amostra e 5 μ L de marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Standards* (BioRad). A voltagem aplicada para a migração foi de 140V.

2.8. Western Blotting

Para realizar a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 μm (Schleicher & Schwell) seguiu-se as indicações do fabricante, com tampão de transferência (25mM Tris; 192mM glicina; 20% metanol). Colocou-se um suporte com uma placa de gelo e aplicou-se a voltagem de 100V durante 1 hora. Terminada a transferência, bloqueou-se a membrana com 5% de leite em pó magro dissolvido em 10 mL de PBS/0,1% Tween 20 (Prolabo®) durante 10-30 minutos à temperatura ambiente, com agitação. As lavagens da membrana foram feitas com PBS/0,1% Tween 20. De seguida, incubou-se a membrana com o anticorpo primário em 5% leite em pó magro dissolvido em PBS/0,1% Tween 20 durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, com agitação. Lavou-se a membrana e repetiu-se o processo mas com o anticorpo secundário adequado conjugado à peroxidase HRP.

Na detecção de quimioluminescência utilizou-se uma mistura, numa proporção de 1:2, de duas soluções do kit *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* nas membranas de nitrocelulose. Colocaram-se estas numa *Hypercassete™* e numa câmara escura expôs-se as membranas a uma película radiográfica (Amersham Hyperfilm™ ELC) durante o tempo necessário de modo a revelar as bandas específicas (evitando o *background*).

A incubação da membrana foi feita com os anticorpos de ratinho anti-tubulina (diluição de 1:10000) da SIGMA®, anticorpo de coelho anti-CCR7 (1:500) da *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* e anticorpo de ratinho anti-PSGL-1 (1:1000) da AbD SEROTEC. Os anticorpos secundários foram utilizados numa diluição de 1:5000 (AbD SEROTEC).

2.9. Transformação de bactérias

Os tubos eppendorf contendo bactérias Top10 competentes foram descongeladas com a mão, sendo depois retirados 50 μL e adicionados a 100ng de

DNA. Estes tubos foram então colocados em gelo durante 20-30 minutos. Após este passo, colocavam-se os tubos a 37°C durante 2 minutos para obter um choque térmico quando colocado de seguida em gelo, sendo adicionados de seguida 150 µL de Luria Broth® (LB) pré-aquecido. Os tubos foram agitados a 200 rpm e a 37°C, durante 30 min. De seguida, centrifugou-se a 6000 rpm, durante 3 minutos e ressuspendeu-se em 50 µL de LB e plaqueou-se numa placa de petri com Luria Broth Agar® (LB Agar) contendo o antibiótico para a selecção. As placas foram mantidas durante a noite a 37°C na estufa.

No dia seguinte, foi feita a verificação da presença de colónias. As colónias foram picadas com o auxílio de uma ponta para micropipetas e colocadas num tubo de ensaio de 15 mL com 5 mL de LB mais antibiótico. A amplificação das bactérias foi feita num agitador a 200 rpm, durante a noite, a 37°C. Para a congelação de cultura de bactérias misturou-se 500 µL de cultura com 500 µL de glicerol a 60% esterilizado e colocou-se a -80°C.

2.10. Extração de plasmídeo

A extração de plasmídeo de culturas de bactérias até 5 mL foi realizada através do método de lise alcalina. Após o crescimento, durante a noite, de bactérias transformadas com plasmídeo de interesse, transferiu-se 1,5 mL da cultura para um tubo eppendorf de 1,5 mL e centrifugou-se durante 1 minuto a 13000 rpm. Este processo foi repetido até 4,5 mL de modo a obter maior quantidade de plasmídeo. Descartou-se o sobrenadante e com o auxílio de um papel absorvente removeu-se as gotas restantes. De seguida, ressuspendeu-se a *pellet* em 200 µL de tampão GTE (50 mM glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris, pH 8.0), suplementado com RNase A (Fermentas) a uma concentração final de 20 µg/mL, pipetando-se várias vezes e vortexando. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. A lise das células e a desnaturação das proteínas e DNA cromossomal foi feita com a adição de 300 µL de 0,2N NaOH/1%SDS (2N NaOH, 10% SDS) preparado na altura. Fecharam-se os tubos e invertendo algumas vezes misturaram-se os conteúdos e incubaram-se em gelo durante 5 minutos (teve-se cuidado para não ultrapassar este tempo). Neutralizou-se o

pH da solução com 300 µL de acetato de sódio a 3M (pH 4.8) frio. Mais uma vez, misturaram-se as amostras invertendo-as várias vezes e incubou-se entre 5 a 30 minutos em gelo. À temperatura ambiente, centrifugaram-se os tubos durante 10 minutos a 13000 rpm de maneira a remover os restos celulares. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Com adição de um volume igual ao transferido de 100% isopropanol e agitando fortemente, precipitou-se o DNA. Para sedimentar o DNA no fundo do tubo centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos e no fim descartou-se o sobrenadante. Este passo foi procedido com a lavagem da pellet com 500 µL de etanol a 70%. Com muito cuidado retirou-se todo o etanol e descartou-se. Na etapa final, deixaram-se os tubos invertidos a secar à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos sobre papel absorvente. Ressuspendeu-se a pellet em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) e guardou-se a -20°C. Para as extracções de plasmídeos de maior dificuldade fez-se extracção em coluna de sílica utilizando o kit Nucleospin® *ExtractII* (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante.

2.11. *Real time PCR*

Para a realização deste protocolo utilizou-se o *iQ™ SYBR®Green Supermix*. Por cada linhagem analisada, foi preparado cDNA em diluições de 1:20 e em triplicado. Então, numa placa de 96 poços (ABgene®), foi pipetado em cada poço 2 µL de DNA, 5 µL de *5x qPCR Master*, 0,4 µL de primer *forward* e *reverse* (200nM) e prefazendo-se com H₂O até 25 µL. De seguida, foi colocado um filme adesivo (Abgene, ref. AB-0558) sobre a placa para evitar a evaporação do conteúdo. Misturou-se tudo e centrifugou-se de modo a sedimentar o conteúdo. A placa foi colocada num termociclador IQ5 e realizou-se o PCR com um primeiro passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos. Seguindo-se com mais uma desnaturação a 95°C durante 2 minutos, passou-se para a fase de amplificação incluindo novamente um passo de desnaturação (15 segundos) e a fase *annealing* a 60°C durante 30 segundos. Estes dois últimos passos foram repetidos 45 vezes. Durante estes passos, programou-se a máquina para fazer a leitura da fluorescência emitido pelo corante de DNA *SYBR-Green* no fim da fase de *annealing*.

Quanto à realização da curva de desnaturação, esta foi feita com um último passo onde se submeteu a temperaturas de 50-95°C com intervalos de 0,5°C.

Foram analisados os genes CCR7, CCR9, PSGL-1 e utilizou-se a β -actina como gene de referência. Quanto aos primers foram usados os mesmos que para o RT-PCR (ver acima).

2.12. Citometria de fluxo

Num tubo de polistireno de 5 mL (BD Biosciences nº352052), colocaram-se entre $0,5-1 \times 10^6$ de células e adicionou-se 1 mL de PBS/3%FBS/10mM NaN_3 . Centrifugaram-se os tubos a 300g durante 5 minutos a 4°C e de seguida aspirou-se o sobrenadante. A *pellet* foi ressuspensa em 37,5 μL de PBS/3%FBS/10mM NaN_3 e adicionou-se 12,5 μL de anticorpo fazendo 50 μL como volume final. Incubou-se no gelo durante uma hora no escuro. Após incubação, lavaram-se as células com um 1 mL de PBS/3%FBS/10 mM NaN_3 , centrifugou-se a 300g a 4°C durante 5 minutos e por fim retirou-se o sobrenadante (este passo foi realizado duas vezes). Finalmente a *pellet* foi ressuspensa em 1 mL de PBS/10 mM NaN_3 . Para a fixação das células em paraformaldeído procedeu-se da seguinte forma. Centrifugaram-se as células a 300g durante 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. De seguida, lavaram-se as células duas vezes com PBS por centrifugação, numa proporção de 1 mL por 10^6 células, e repetiu-se o passo anterior no intervalo das lavagens. Adicionou-se 0,5 mL de paraformaldeído a 0,5% à *pellet* e imediatamente vortexou-se a solução. As células fixadas foram guardadas no escuro a 4°C até à análise.

Para proceder à marcação intracelular com anticorpos, foram centrifugadas cerca de 1×10^6 células sendo depois ressuspensas em 1 mL de PBS/3%FBS/10 mM NaN_3 frio. Centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 200 μL frios de paraformaldeído a 0,5%, de modo a fixar as células. Deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 20 minutos. A adição de PBS/0,5% BSA/0,1% saponina foi seguida de uma centrifugação e aspiração do sobrenadante. Este passo foi feito duas vezes. A saponina atua aumentando a permeabilização das membranas das células e o BSA (albumina sérica bovina) ajuda na

recuperação das células. Foi então adicionado 100 μL PBS/0,5% BSA/0,1% saponina, contendo o anticorpo diluído, e deixou-se a incubar durante 1 hora no gelo. O passo seguinte foram duas lavagens com PBS/0,5% BSA/0,1% saponina. Mais uma vez, as células foram ressuspendidas em 100 μL de PBS/0,5% BSA/0,1% saponina mas desta vez possuindo o anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo. Incubou-se, no escuro, durante 1 hora em gelo. Para finalizar o protocolo, lavaram-se as células duas vezes com PBS/0,5% BSA/0,1% saponina e adicionou-se 1 mL de PBS/10 mM NaN_3 .

O anti-hCCR7-APC (R&D Systems) foi utilizado numa diluição de 1/2000, o anti-hCD3-FITC (Miltenyi Biotec) a 1/80, IgG2a-APC numa diluição 1/100 e a 1/80 o anticorpo IgG2a-FITC.

2.13. Transfecção das células 293T

O método utilizado neste procedimento foi o método fosfato de cálcio. Para isso, pipetou-se 3 mL de meio DMEM/10% FBS contendo $2,5 \times 10^5$ num placa de 6 cm de diâmetro 18-24 horas antes da transfecção. Quando faltavam 1-3 horas fez-se a renovação do meio. Entretanto, prepararam-se diluições de 100 ng/ μL de plasmídeo com água MilliQ estéril e num tubo eppendorf de 2 mL preparou-se um mix com 125 μL de água MilliQ, 100 μL de plasmídeo (10 μg no total) e 25 μL 2,5M CaCl_2 totalizando 250 μL (misturou-se bem pipetando repetidamente). Pipetou-se 250 μL de 2 \times HEBS (0,28M NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na_2HPO_4) gota a gota para a mistura do DNA com o CaCl_2 e incubou-se durante 10 minutos para se formar precipitados de DNA/ CaPO_4 . Este precipitado foi então adicionado gota a gota no meio com as células. As células foram mantidas na incubadora sendo previamente agitadas para distribuir o precipitado uniformemente. 16-22 horas depois, procedeu-se à renovação do meio de cultura. Cerca de 48 horas após a adição do precipitado, fez-se a recolha das células e extraíram-se as proteínas com tampão RIPA. A eficiência da transfecção foi verificada com pAcGFP-N1 fornecido pela Dr. Luísa Pedro do IBB/CBME e transfectou-se, para extracção de proteína, o plasmídeo NBI-CCR7-FLAG (fornecido por Trudy Kohout da *Neurocrine Biosciences Inc.*).

3. Resultados

3.1. Determinação dos níveis de expressão dos genes CCR7, CCR9, CXCR4 e PSGL-1 por RT-PCR semi-quantitativo

De modo a verificar quais os níveis de expressão dos genes dos receptores de quimiocina CCR7, CCR9, CXCR4 e do gene PSGL-1 em linhas celulares derivadas de LLA-T, foram realizadas análises por RT-PCR (12 linhas celulares LLA-T e 4 derivadas de outras neoplasias). As bandas esperadas para cada uma delas eram de 202 bp para a β -actina, 74 bp no caso do CCR7, 70 bp no CCR9, 89 bp para PSGL-1 e por fim 62 bp no CXCR4. A determinação dos níveis de expressão dos genes em estudo foi feita utilizando a expressão do gene de *housekeeping* (β -actina) como marcador da quantidade total de RNA em cada amostra. Foram feitas três diluições consecutivas de 1:3 em cada amostra. Desta forma, podemos fazer uma análise semi-quantitativa da expressão dos genes-alvo. A amplificação por PCR foi feita com 32 ciclos e pudemos observar a presença de bandas correspondentes ao cDNA do CCR7 em 6 das 16 linhas testadas (Figura 13). Todas elas do tipo LLA-T (ALL-SIL, BE13, CEM, HPB-ALL, KOPTK1 e P12). Este número, representa assim, 50% das linhas de LLA-T testadas. Utilizou-se a linha de melanoma MDA-435S como controlo positivo (Shields *et al*, 2007), mas apesar de haver amplificação para outras amostras não foi possível visualizar a presença de qualquer banda (Figura 13-E).

Quanto ao cDNA do CCR9, a amplificação foi positiva em 69% das linhas celulares, onde só a MOLT3, no que respeita às linhas das linhas de LLA-T, é que não mostrou a presença de produto (11 das 12 linhas celulares). As linhas BE-13 e HPB-ALL (só um dos géis é que houve banda) foram as que apresentaram uma amplificação mais fraca em comparação com as outras linhas.

A amplificação dos genes PSGL-1 e CXCR4 foi detectada em todas as linhas de leucemia linfocítica aguda das células T, tendo apenas a linha celular JURKAT mostrado

um fraco sinal da expressão destes dois genes. Nas linhagens K562, NALM6 e RS4;11 (controlos negativos) não ocorreu a amplificação de CCR7, CCR9 e PSGL-1. Quanto à presença de CXCR4 nas linhagens K562 e NALM6, esta foi positiva. Tal como esperado podemos verificar que nas diferentes diluições para os diferentes genes existe um decréscimo na intensidade dos produtos de PCR.