

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
REARRANJOS GÊNICOS DE IMUNOGLOBULINAS E
RECEPTORES DE CÉLULAS T EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isabel Agne Souza Leal

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS REARRANJOS
GÊNICOS DE IMUNOGLOBULINAS E RECEPTORES DE
CÉLULAS T EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA**

Isabel Agne Souza Leal

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agne Souza Leal, Isabel

Caracterização molecular dos rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de células T em pacientes com leucemia linfóide aguda / Isabel Agne Souza Leal.- 2016.

54 p. ; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Leucemia Linfóide Aguda 2. Marcadores moleculares
3. Rearranjos gênicos I. Hörner, Rosmari II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Isabel Agne Souza Leal. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: isabel.agneleal@yahoo.com.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

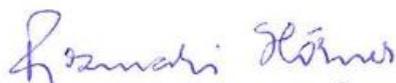
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS REARRANJOS GÊNICOS DE
IMUNOGLOBULINAS E RECEPTORES DE CÉLULAS T EM
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

elaborada por
Isabel Agne Souza Leal

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:



Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Francisco Montagner, Dr. (UFRGS)



Virgínia Maria Cóser, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 22 de janeiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Criador de todas as coisas, por me guiar por caminhos desconhecidos e de conquistas. Por me guardar nas adversidades e me mostrar luz quando parecia haver somente escuridão.

Aos meus pais Orlando (*in memoriam*) e Dalita por terem sonhado o meu sonho e feito tudo o possível para tornar mais leve esta caminhada. Especialmente à minha mãe pela sua figura de força extrema e pela sua presença constante nos meus dias, que tanto me acalenta e auxilia.

Aos meus irmãos Alexandre, Jorge e Deise por serem meus exemplos de conduta.

À Prof. Dr^a. Rosmari Hörner, por ter me recebido de braços abertos como sua orientada, pela paciência, por ter permanecido confiante no nosso trabalho e transmitir paz em momentos turbulentos: muito obrigada.

À querida amiga Patrícia Brites, que esteve junto a mim durante toda esta a jornada (e também antes) me auxiliando tecnicamente, filosoficamente, profissionalmente e de tantas formas quanto fosse possível. Pelos momentos vividos dentro e fora do laboratório, meu respeito e gratidão.

À Dr^a Virgínia Maria Cóser pela sua disposição, interesse e exemplo a seguir. Por seus ensinamentos valiosos, pelas suas inúmeras correções e horas de discussão e humor.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria e aos pacientes com leucemia linfóide aguda, por viabilizarem que este trabalho fosse concluído.

Aos queridos amigos que já fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e me deram força ao longo dos anos: Gilmar, Fernando, Jéssica, Luiz Eduardo, Andrine, Luís Guilherme, Camile, Vanessa, Felipe, Raísa, Bárbara, Nathali e Mari.

Aos amigos de fora do laboratório, pela compreensão e por todos os momentos; aos meus companheiros da música, por me ajudar a manter a paz e, especialmente, à Tais por estar presente nos momentos difíceis e me trazer esperança. À todos, obrigada!

“Durante nossa breve existência nesse mundo devemos nos ocupar de todos os esforços
para que faça sentido nossa vida, senão, seremos apenas mais um ser
que um dia existiu nesse mundo”

Alexsandro Rego

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS REARRANJOS GÊNICOS DE IMUNOGLOBULINAS E RECEPTORES DE CÉLULAS T EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

AUTORA: ISABEL AGNE SOUZA LEAL

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 22 de janeiro de 2016.

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a causa mais comum de câncer infantil e ocorre em 20% dos adultos. Tem como característica o acúmulo de linfoblastos, células leucêmicas que mantêm capacidade de multiplicação, porém, sem diferenciação. O tratamento quimioterápico para LLA tem se mostrado eficaz e levado à remissão em 95% dos casos, no entanto, alguns pacientes podem apresentar recidiva da doença. O diagnóstico preciso é fundamental para o tratamento correto do paciente e, conseqüentemente, elevar a sobrevida. Metodologias de biologia molecular têm contribuído para a detecção precoce de recidivas, principalmente por técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR). Tendo em vista que nas LLA os rearranjos clonais de imunoglobulinas (Ig) ou de receptores de células T (TCR) ocorrem em 90 a 95% dos casos, as análises destes por PCR tem-se mostrado método útil para o acompanhamento do tratamento, detecção de doença residual mínima. O presente estudo teve como objetivo padronizar a técnica de pesquisa de rearranjos de Ig e TCR, e caracterizar a sua frequência na população de pacientes com LLA do Hospital Universitário de Santa Maria. A técnica para pesquisa da prevalência de rearranjos gênicos mostrou-se, depois de ajustadas os devidos detalhes, um procedimento de reprodutibilidade confiável e relativamente fácil execução. A maior frequência de rearranjos foi detectada no gene IgH (82,76%), sendo representada por ampliações nas sequências DH7 (14 amostras), Vg1 (10 amostras), VH3 e V2D3 (9 amostras). Rearranjos de IgK ocorreram em frequência de 31,03%, rearranjos TCRG e TCRD com 41,37% e Sil-Tal em 3,45%.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda, marcadores moleculares, rearranjos gênicos.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Ig AND TCR GENE REARRANGEMENTS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

AUTHOR: ISABEL AGNE SOUZA LEAL

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Defense Place and Date: Santa Maria, January 22th, 2016.

Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) is the most common cause of childhood cancer and occurs in adults in 20%. Lymphoblasts accumulation is a characteristic of the disease since the leukemic cells retain some multiplication ability without differentiation. The chemotherapy treatment for ALL has been proven effectiveness leading 95% cases to remission however, some patients may have recurrence disease. An accurate diagnosis is critical for the correct treatment and therefore longer survival. Molecular biology techniques have contributed to the early detection of recurrence, mainly by PCR method. Considering the high frequency of clonal rearrangements in leukemia (about 90 to 95%) the analysis of clonal immunoglobulin (Ig) or T-cell receptor (TCR) rearrangements by PCR has been shown to be useful for treatment monitoring the minimal residual disease. This study aimed to standardize the PCR for Ig and TCR rearrangements technique and characterize the patients at the University Hospital of Santa Maria, through these analysis. After adjustments the technique was considered a reliable procedure and relatively easy to perform. The higher frequency of rearrangements were detected in IgH gene (82.76%) by the DH7 sequences (14 samples), Vg1 (10 samples), VH3 and V2D3 (9 cases). IgK rearrangements occurred in frequency of 31.03, TCRG and TCRD rearrangements to 41.37%, and Sil-Tal to 3.45%.

Keywords: Acute lymphoid leukemia; molecular markers, genic rearrangement.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – Modelo de imunoglobulina24

Figura 2 – Síntese de uma cadeia pesada μ 25

Figura 3 – Esquema da técnica homo/heteroduplex de rearranjos de Ig e TCR.....27

Manuscrito

Figura 1 – Eletroforese de integridade de DNA em gel de agarose.....33

Figura 2 – Eletroforese de controle endógeno de DNA.....33

Figura 3 – Eletroforese de recombinação V(D)J em gel de poliacrilamida 12%.....37

Outros resultados

Figura 4 – Eletroforese de acompanhamento de tratamento.....49

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nas PCRs ao diagnóstico dos pacientes.....	34
Tabela 2 – Descrição de reagentes e volumes para realização da PCR qualitativa.....	35
Tabela 3 – Volumes necessários para preparação de 1 gel de poliacrilamida 12%.....	36
Tabela 4 – Relação de peso molecular esperado para cada sequência testada.....	36
Tabela 5 – Perfil das amostras, citogenética e transcritos quiméricos dos 28 pacientes diagnosticados com LLA.....	38
Tabela 6 – Frequência de rearranjos encontrados em 29 amostras com relação aos genes envolvidos e o total de amplificações.....	39
Tabela 7 – Rearranjos amplificados em cada amostra.....	40
Tabela 8 – Sequências de rearranjos IgH em relação a diferentes tipos de cariótipos.....	41
Tabela 9 – Sequências de rearranjos IgK em relação a diferentes tipos de cariótipos.....	41
Tabela 10 – Sequências de rearranjos TCRG em relação a diferentes tipos de cariótipos.....	42
Tabela 11 – Sequências de rearranjos TCRD em relação a diferentes tipos de cariótipos.....	42
Tabela 12 – Comparação de frequências de rearranjos com outros estudos.....	42

Outros resultados

Tabela 1 – Condições testadas para aprimoramento de eletroforese.....	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6TG	Tioguanina
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
Ara-C	Citosina arabinoside
CEP	Comitê de ética em pesquisa
Ciclo	Ciclofosfamida
D15	Dia 15 da terapia de indução
D35	Dia 35 da terapia de indução
Dauno	Daunorrubicina
DEXA	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DRM	Doença residual mínima
EtBR	Brometo de etídeo
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias da Infância
Ig	Imunoglobulina
IgH	Cadeia pesada da imunoglobulina
IgK	Cadeia leve da imunoglobulina
L-Asp	Asparaginase
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia linfóide aguda B-derivada
LLA-T	Leucemia linfóide aguda T-derivada
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MTX	Methotrexato
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRED	Prednisona
RQ-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Taq	Enzima <i>Thermus aquaticus</i>

TCR	Receptor de célula T
TCRD	Receptor delta de célula T
TCRG	Receptor gamma de célula T
VCR	Vincristina
VM-16	Etoposídeo
VM-26	Teniposídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
Leucemia Linfoide Aguda	15
Incidência das LLAs.....	19
Tratamento das LLAs	20
Doença residual mínima	21
Linhagem linfoide.....	22
Rearranjo V(D)J.....	23
Técnica de pesquisa de rearranjos clonais.....	25
Justificativa	28
Objetivos.....	28
1.1.1 Objetivo geral.....	28
1.1.2 Objetivos específicos.....	28
MANUSCRITO	29
AVALIAÇÃO DE RECOMBINAÇÕES V(D)J EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	29
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO	31
OBJETIVO	31
MÉTODOS	31
Pacientes	32
Obtenção de células mononucleadas.....	32
Extração de DNA	32
PCR Qualitativo	33
Análise de homo/heteroduplex	35
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	45
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIAS.....	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS.....	48

4 CONCLUSÃO	50
5 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Leucemia Linfoide Aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma doença de caráter maligno, decorrente da linhagem celular linfoide. As células precursoras ou células indiferenciadas linfocitárias apresentam-se em grande número na medula óssea, nos gânglios linfáticos e timo. Característico da doença é o fato de as células leucêmicas manterem certa capacidade de multiplicação, mas não se diferenciarem até formas mais maduras e normais, havendo o acúmulo de células jovens, denominadas linfoblastos (PEREIRA, 2010).

Existem quatro métodos importantes no diagnóstico da LLA: morfológico, imunofenotípico, citogenético e molecular. Os métodos complementam-se frente ao diagnóstico e possuem diferenças de sensibilidade, especificidade e utilização (Van der BERG, 2000).

O hemograma na LLA expressa, geralmente, anemia normocítica (eritrócitos de tamanho normal) e normocrômica (eritrócitos de coloração normal por conter uma normal quantidade de hemoglobina), além de trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas). Existem casos onde pacientes que possuem número diminuído de leucócitos (leucopenia) não apresentam nenhum blasto na circulação sanguínea, bem como aqueles em que o quadro é invertido, demonstrando elevado número de leucócitos (leucocitose) associado com a presença de muitos blastos. Embora seja um ótimo exame de suspeição, o hemograma não possui capacidade de diagnóstico definitivo de LLA, mas sim o mielograma, imunofenotipagem, citogenética e análise por biologia molecular (OLIVEIRA, 2008, PEREIRA, 2010).

O mielograma, exame que se utiliza da punção medular para análise citológica, diagnostica a ocorrência de leucemia linfoide aguda quando se observa a presença de linfoblastos, pelo menos, em 25% das células. É característico de doença a medula estar em quadro hipercelular, com células precursoras mieloides e eritroides residuais com aspecto normal e proliferação de células leucêmicas (FARIAS E CASTRO, 2004; OLIVEIRA, 2008).

Complementarmente ao estudo da morfologia celular, pode-se efetuar reações citotóxicas, como mieloperoxidase, ácido periódico – Shiff (PAS) e Sudan Black,

que têm por objetivo a diferenciação de leucemia linfóide aguda de leucemia mieloide aguda. São, estas, técnicas de coloração, em que o PAS cora o glicogênio da célula e o Sudan Black cora lipídeos e alguns componentes da célula. A diferenciação ocorre pelos resultados negativos que LMA apresenta aos testes, embora PAS possa apresentar resultados variáveis (FARIAS E CASTRO, 2004; OLIVEIRA, 2008).

Outro método de classificação de LLA se dá através da imunofenotipagem, que consiste na identificação imunológica com base na expressão de antígenos específicos. A técnica surgiu na década de 70, quando foram desenvolvidos anticorpos policlonais contra células humanas de origem hematopoética. A pesquisa pode ser executada por imunocitoquímica ou citometria de fluxo, que tem a capacidade de definir o estágio de maturação e a linhagem celular, elevando a 99% a precisão diagnóstica. Além disso, a imunofenotipagem é útil ao prognóstico e monitoramento da doença, por vez que possibilita a detecção de fenótipos aberrantes (OLIVEIRA, 2008; QUIXABEIRA E SADDI, 2008). A diferenciação imunofenotípica caracteriza as linhagens de LLA em tipo B ou T, levando em consideração os antígenos de superfície presentes nas células. Sabe-se, entretanto, que a transformação leucêmica pode ocorrer em diversos estágios da maturação celular de linfócitos, e que é, em 85% dos casos, LLA tipo B-derivada (OLIVEIRA, 2008; GANAZZA, 2009). De acordo com os antígenos de superfície que caracterizam o estágio de diferenciação do linfócito B, as leucemias tipo B-derivadas são classificadas em, ainda, quatro subgrupos: pró-B, pré-B, comum ou pré-pré-B e maduras (GANAZZA, 2009).

A imunofenotipagem utiliza anticorpos monoclonais para análise da parada de maturação celular, característica da leucemia. Descritos em 1976 por Köhler e Milstein, os anticorpos monoclonais têm sido muito utilizados, inclusive em terapias. Linfócitos B secretam anticorpos específicos, determinados ao serem estimulados, e formam um conjunto de anticorpos circulantes no soro. Obtêm-se anticorpos monoclonais da seleção e imortalização de linfócitos B, que sintetizam anticorpos com determinadas características. Os anticorpos monoclonais se agrupam conforme o antígeno reconhecido em um cluster de diferenciação (CD). São ligados a fluorocromos e entram em contato com as células, ligando-se de modo específico e, assim, marcam a célula. Os principais utilizados em leucemias agudas, para a

definição da linhagem são: na linhagem mieloide – CD 15 e CD 33; na linhagem B – CD 10 e CD 19; na linhagem T – CD 2 e CD 7 (EMERENCIANO, 2004).

Embora a imunofenotipagem seja uma metodologia muito útil à classificação da leucemia, as análises citogenética e molecular auxiliam na determinação do estágio da doença e possibilidade da remissão, que é considerada completa quando, através de quimioterapia, o paciente apresenta exame físico normalizado (caracterizando remissão clínica), bem como os exames de sangue e medula óssea deixam de evidenciar células leucêmicas (remissão morfológica) (QUIXABEIRA, 2008).

Na LLA, bem como em outros processos neoplásicos, a expressão ou estrutura gênica anormal atua colaborando na indução ou progressão de tumores. Assim, compreende-se que alterações cromossômicas atuam sobre a modificação dos genes, a nível funcional, e acabam por colaborar para uma transformação celular maligna (MESQUITA, 2009). Ainda, tais alterações constitucionais estão diretamente relacionadas à incidência de leucemia em crianças. Na presença de trissomia do cromossomo 21 (evento que caracteriza a Síndrome de Down), notou-se que as crianças têm de 15 a 20 vezes maior probabilidade de desenvolver leucemia em comparação às sem alteração, entretanto maior incidência leucêmica também ocorre na presença de outras doenças genéticas, como, por exemplo, Síndrome de Bloom e Anemia de Fanconi (LICHTVAN, 2007; GABE et al., 2009).

Anteriormente à melhoria das técnicas citogenéticas, havia grande dificuldade técnica considerando a carência de metodologias efetivas no processamento de cromossomos, contudo houve avanço crescente e estudos de 1984-1985 já identificavam alterações cromossômicas clonais em 80% dos casos de LLA. Dessa forma, estudos citogenéticos colaboraram significativamente na elucidação de mecanismos da gênese leucocitária, vez que ampliam a compreensão dos mecanismos envolvidos na malignidade, indicam o prognóstico do paciente e evidenciam a regressão da doença. Além disso, são importantes no prognóstico das leucemias, bem como na orientação terapêutica e na classificação leucêmica (FARIAS e CASTRO, 2004; LICHTVAN, 2007; QUIXABEIRA, 2008).

Alterações citogenéticas ocorrem em 80% dos casos de LLA (SIMÕES, 2000). Alterações cromossômicas numéricas ou estruturais são associadas aos clones malignos, desaparecendo quando o paciente alcança a remissão hematológica e aparecendo novamente quando há a recidiva. As alterações numéricas podem ser

por ganho (hiperdiploidia) ou perda (hipodiploidia) de cromossomos. Hiperploídia é comumente apresentada em LLA pró-B e hipoploidia é um evento raro, associado a mau prognóstico (FARIAS et al., 2004; LICHTVAN, 2007). Além disso, deleção e amplificação dos genes, avaliação e inativação dos genes por pontos de mutação também fazem parte das mutações genéticas ocorridas nas LLAs. As alterações estruturais decorrem de rupturas promovidas, principalmente, durante a intérfase, momento em que os cromossomos estão distendidos e com alto metabolismo, logo, mais vulneráveis. Após as rupturas, ocorrem fusões, em combinações atípicas. As combinações podem representar rearranjos balanceados e não-balanceados. São não-balanceados quando possuem informação a menos ou a mais, como em deleções (exclusão de uma fração do cromossomo), duplicação, translocação simples (troca de segmentos entre cromossomos, em que somente um perde um segmento para outro), isocromia (exclusão de um braço inteiro do cromossomo com duplicação completa do outro braço), cromossomo em anel (fusão de um cromossomo pelas extremidades livres, após fratura) e cromossomo dicêntrico (com dois centrômeros). Rearranjos balanceados ocorrem quando as informações genéticas estão presentes, em sua totalidade, mas de modo distinto do original, como em casos de translocação recíproca (troca entre cromossomos em que ambos recebem um segmento) e inversão (o cromossomo é quebrado em duas bandas e é reinserido em ordem inversa) e estão presentes em um terço dos casos de LLA (LICHTVAN, 2007; MELLO, 2007). FRÖHLING et al. (2005) afirmam que as células leucêmicas podem decorrer, ao mesmo tempo, de mutações múltiplas, como mutações de ponto (substituição de um único nucleotídeo), rearranjos gênicos e translocações cromossômicas.

Nas LLAs, são quatro as translocações principais. Rearranjo dos genes *BCR/ABL*, *p190*: ocorre na translocação t(9;22)(q34;q11). Está presente em LLAs infantis em 3 – 5% e em adultos em 20%, tendo sua maior ocorrência em LMC (95%). Ocorre, em decorrência da translocação, o aumento da atividade da tirosina quinase, causando desordem leucemogênica, o que leva ao quadro patogênico. Rearranjo dos genes *AF4/MLL*: ocorre na translocação t(4;11)(q21;q23). Geralmente está presente em casos de LLA pré-pré-B em lactentes (60%) e apresenta resposta negativa a quimioterapia convencional, associando-se a um pior prognóstico. Crianças maiores costumam apresentar melhor prognóstico. Os blastos são, em grande parte, do tipo pré-pré-B. Rearranjo dos genes *E2A/PBX1*: ocorre na

translocação t(1;19)(q23;q13) e está presente em LLAs pré-B em 25%, além de caracterizar 5 – 6% dos casos infantis de LLA e 3% de LLA adulta. Está associado a prognóstico desfavorável na ausência de tratamento agressivo. Rearranjo dos genes *TEL/AML1*: a translocação de ocorrência é t(12;21)(p13;q22). Ocorre em 30 – 40% dos casos. Estudos demonstraram que pacientes com tal rearranjo têm boa evolução. Dessa forma, a presença do rearranjo serve para classificar o paciente, quer seja adulto ou criança, em paciente de baixo risco de recidiva (van DONGEN et al., 1999).

Uma das técnicas para identificação de alterações cromossômicas é a citogenética convencional, que consiste na observação microscópica dos cromossomos em metáfase (SCHAFFEL e SIMÕES, 2008).

A técnica de citogenética molecular denominada hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescent in situ hybridization* – FISH) é empregada na identificação de alterações não detectáveis ao método convencional. Utiliza sondas para analisar regiões específicas (MESQUITA, 2009).

Em relação à citogenética, a análise molecular apresenta complementariedade, por ser uma metodologia sensível, rápida e específica. Tem a vantagem de poder-se obter o resultado em algumas horas e possibilita a detecção de uma única célula leucêmica em 10^5 e 10^6 células normais, pelo método de reação em cadeia da polimerase após transcriptase reversa (RT-PCR). Pesquisando-se um rearranjo, é específico, pois somente o determinado rearranjo será amplificado para análise (FARIAS e CASTRO, 2004). Na análise molecular, ainda é possível utilizar o método de Southern blot, embora o método da PCR seja de 400 a 4000 vezes mais sensível. Southern blot foi um método outrora muito utilizado na detecção de DRM, mas é considerado obsoleto, pois além de ter baixa sensibilidade (entre 1 – 5%), é uma técnica trabalhosa e requer marcação radioativa de sondas (SIMÕES, 2000; LICHTVAN, 2007; MESQUITA, 2009).

Incidência das LLAs

A LLA é considerada a causa mais frequente de câncer infantil (em crianças com idade inferior a 10 anos), porém ocorre também em neonatos, durante toda a infância, adolescência e idade adulta, sendo que representa 75 – 80% de todos os

casos de leucemia em crianças e 20% em adultos (CAVALCANTE, 2012; MELLO, 2007). A doença prevalece em homens sobre mulheres e, ao diagnóstico, as mulheres são mais velhas que os homens, em média em 3 anos a mais. O pico de idade parece estar entre 2 a 4 anos (SU, 2015). Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para incidência em 2016 é de 10.070 casos de leucemia no geral, sendo destes 5.540 homens e 4.530 mulheres. Quanto ao número de mortes, estão relatados 6.316 casos, com última atualização em 2013, sendo 3.439 homens e 2.877 mulheres.

Nos Estados Unidos, o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute – NIH*) tem última estimativa de incidência para 2015 de 54,270 casos e de 24,450 mortes estimadas. Além disso, relata porcentagem de sobrevida por 5 anos de 58,5% (dados de 2005 – 2011). Em 2014, também nos EUA, a incidência de casos novos de câncer pediátrico (dentre eles, a LLA) entre indivíduos de 0 a 19 anos foi de 15,780. Ainda, observa-se que a LLA acomete mais crianças brancas (20,52%), com relação às negras (10%) (HOLMES JR, 2015).

Tratamento das LLAs

Em centros especializados, os pacientes são categorizados em grupos, após o diagnóstico e, a partir daí, recebem tratamento específico. Pacientes que se encontrem em baixo risco, receberão quimioterapia moderada, bem como os que se encaixarem em grupo de alto risco, são expostos a doses tóxicas (ROSE, 2015).

Fatores de baixo risco relacionados a anormalidades genéticas são considerados: alta hiperploídia (51 – 65 cromossomos), t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1; e quanto a perfis alterados de cópia numérica: deleções isoladas de ETV6, PAX5 ou BTG1, ausência de deleção de IKZF1, CDKN2A/B, PAR1, BTG1, EBF1, PAX5, ETV6 e RB1. Quanto a alto risco, são considerados: t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1, translocação MLL/11q23; t(17;19)(q23;p13)/TCF3-HLF, amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (21iAMP21), quaisquer deleções de IKZF1, PAR1, EBF1 ou RB1 (MOORMAN, 2014).

Ainda, critérios de baixo risco incluem número de leucócitos $<50.000/\text{mm}^3$, diagnóstico de LLA-B e idade entre 1 – 9 anos, logo, alto risco é representado por contagens leucocitárias $>50.000/\text{mm}^3$ e idade superior a 10 anos (PEREIRA, 2010).

Os tratamentos atuais levam à cura cerca de 80 – 85% dos casos e a estratificação dos pacientes em grupos se faz útil na antecipação da condução terapêutica ao alto risco, bem como na redução dos efeitos adversos àqueles pacientes com grande probabilidade de cura. Nisso, a DRM (principalmente ao fim do tratamento de indução) se mostra um fator de prognóstico importante para a identificação destes pacientes de alto risco (PAULA, 2015).

As fases do tratamento são divididas em:

- Indução, onde o objetivo é diminuir a carga leucêmica a nível citogenético e recuperar a hematopoiese normal. Os fármacos utilizados nessa etapa são a Vincristina (VCR) e Corticosteroides, principalmente Prednisona (Pred) e Dexametasona (Dexa). Ainda, nessa fase do tratamento podem ser incluídos Asparaginase (L-Asp), Daunorrubicina (Dauno), Methotrexato (MTX), Ciclofosfamida (Ciclo), Citosina Arabinoside (Ara-C), Etoposídeo (VM-16), Teniposídeo (VM-26) e Tioguanina (6TG) (PEREIRA, 2010).
- Intensificação ou consolidação, que objetiva reduzir uma população adicional de células residuais que podem permanecer. Assim, são utilizados diversos fármacos diferentes, conforme o protocolo de tratamento utilizado, sendo estes administrados em altas doses (PEREIRA, 2010).
- Fase de manutenção, também conhecida como continuação: nessa fase, a quimioterapia é menos agressiva e são administrados semanalmente Mercaptopurina e MTX. Ainda, nesse período podem ser utilizados VCR e corticosteroides com intervalos de cerca de 4 semanas (PEREIRA, 2010).

Todo o tratamento geralmente segue por até 3 anos em homens, devido a alta possibilidade de recaída, enquanto que em mulheres, o tratamento dura por cerca de 2 anos e meio. O tratamento varia conforme o paciente responde e conforme a detecção de doença residual mínima. Nisso, observa-se que pacientes que se enquadram em alto risco acabam por custar 47% mais que indivíduos com resposta padrão (KAUL, 2015).

Doença residual mínima

A DRM é utilizada para acompanhamento da resposta ao tratamento e após o tratamento para verificar se o paciente possui alterações clonais das células leucêmicas. Tal proliferação relaciona-se à recaída do paciente e pode estar em

níveis indetectáveis pela metodologia hematológica convencional. A detecção da DRM é importante no monitoramento da remissão e recidiva da doença, além de poder auxiliar na intervenção terapêutica. Apesar da boa resposta à quimioterapia, de 20% a 30% das crianças podem apresentar recidiva, sendo esta, a principal causa de morte de pacientes com LLA, seguidas pelas infecções (BAI et al., 2007; GANAZZA, 2009; CAVALCANTE, 2012).

Atualmente, a DRM pode ser utilizada em 95% dos casos de LLA e é considerada uma ferramenta eficiente para determinar o prognóstico da doença e pode ser acompanhada através de imunofenótipos aberrantes por citometria de fluxo, pesquisa dos rearranjos de Ig e TCR ou através dos genes de fusão associados a anormalidades cromossômicas (HOELZER, 2015).

Os pacientes que atingem remissão molecular após o tratamento de indução apresentam sobrevida livre de doença de 54 – 74%, o que comparado a pacientes DRM positivos (com taxa de 17 – 40%), confere um desfecho muito superior a estes primeiros. Aos que falham após terapia de indução, é indicado o transplante de células tronco hematopoiéticas (HOLZER, 2015).

Sabe-se que a principal causa de falha no tratamento se deve à recaída da doença. Nos países desenvolvidos, as taxas relatadas nas últimas décadas foram de 15 – 20% de recaída, para sobrevida após recaída entre 40 – 70% (OSKARSSON, 2016).

Linhagem linfoide

As principais células participantes do sistema imune são os linfócitos B, cuja função é a de produzir anticorpos para reconhecimento de antígenos, e os linfócitos T, que podem intervir nas atividades do linfócito B, bem como participar de reações de hipersensibilidade tardias e regulação do sistema imunológico. Cada um dos tipos de linfócitos possuem receptores de antígenos específicos, devido à presença de uma sequência única de aminoácidos para cada receptor. Nas células B, os receptores de antígenos são imunoglobulinas, enquanto nas T são denominados receptores de antígenos de células T ou TCR (*T cell receptor*) (CAVALCANTE, 2012).

As imunoglobulinas são moléculas cuja estrutura é constituída de um tetrâmero em forma de Y, composta por duas cadeias leves ou menores (L, do inglês *light*) e

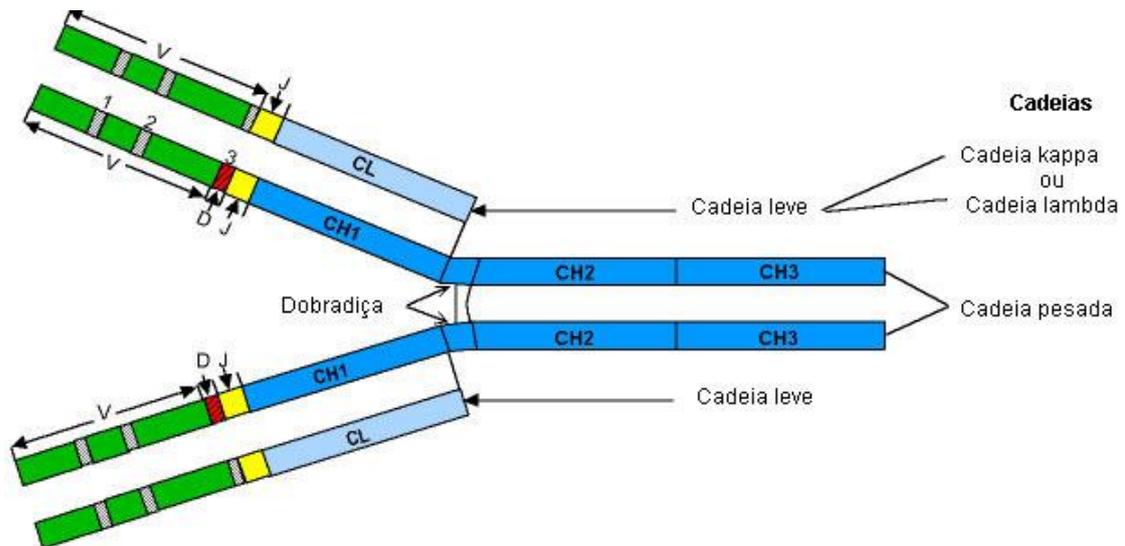
duas cadeias pesadas ou maiores (H, do inglês *heavy*), unidas covalentemente entre si, por pontes de dissulfeto. As cadeias leves têm, aproximadamente, 24kD e podem ser divididas em kappa (κ) e lambda (λ). As pesadas apresentam, aproximadamente, o dobro do tamanho das leves, variando de 55 a 70kD e podem ser divididas em cinco tipos diferentes, conforme a sequência de aminoácidos: alfa (α), gama (γ), mi (μ), delta (δ) e épsilon (ϵ). Surge daí o nome das classes de imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD e IgE, respectivamente. Independente da classe, as imunoglobulinas possuem cadeias leves e pesadas, sendo a variabilidade garantida pelas regiões que ligam os antígenos (TORRECILHAS, 2008).

Todas as cadeias são constituídas por uma região aminoterminal variável (V), participante do reconhecimento de antígenos e responsável por conferir especificidade do anticorpo frente a estes, bem como por uma região carboxiterminal constante (C), responsável pela fixação do complemento e funções efetoras. Ainda, na porção variável, possuem regiões hipervariáveis (regiões determinantes de complementaridade), que interagem com o antígeno. O fato de cada indivíduo possuir bilhões de linfócitos possibilita a existência de resposta a uma grande diversidade de antígenos. Isso se deve às regiões variáveis, que contêm sequências onde as combinações de aminoácidos são variáveis (TORRECILHAS, 2008; CAVALCANTE, 2012).

Rearranjo V(D)J

Alguns fatores colaboram para a variabilidade das imunoglobulinas, dentre eles, a existência de centenas de genes V e vários genes D (diversidades), J (junção entre as regiões variáveis e constantes) e a variação nas regiões de junção entre esses genes, além de combinações entre cadeias leves e pesadas e mutações somáticas nas regiões hipervariáveis (figura 1). Para formar um rearranjo V(D)J é necessário que ocorram dois rearranjos consecutivos, sendo o primeiro a ligação entre um segmento D a um segmento J e o segundo, pela ligação do segmento V ao rearranjo DJ (HSU, 2011).

Figura 1 – Modelo de Imunoglobulina.



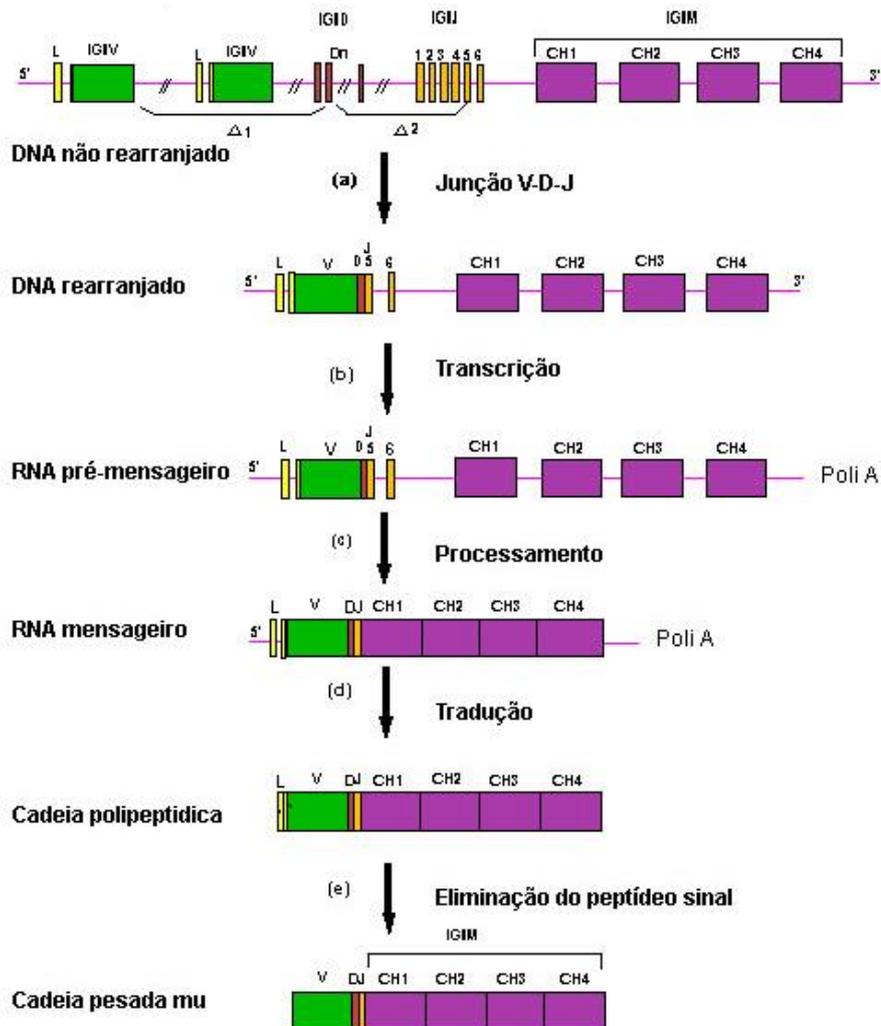
Fonte: International Immunogenetics Information System (IMGT).

Tanto os receptores de células T (TCR) quanto os genes de imunoglobulinas (Ig) passam por rearranjos durante a diferenciação normal dos linfócitos. Na LLA, os blastos sofrem transformação no estágio de diferenciação linfoide e apresentam, dessa forma, rearranjos sem especificidade de linhagem, com o mesmo padrão de rearranjos nas células neoplásicas, de forma que pode ser utilizado como marcador específico de leucemia para cada paciente (GANAZZA, 2009; CAVALCANTE, 2012).

Dessa forma, a utilização da análise de rearranjos de imunoglobulinas e receptores de células T na detecção da DRM resulta no preciso acompanhamento no tratamento da LLA. Os marcadores moleculares para PCR mais utilizados na pesquisa e estudo da DRM em LLA são os rearranjos de cadeia pesada de imunoglobulina (IgH), de cadeia leve (IgK), bem como receptores de célula T gama (TCRG) e receptores de célula T delta (TCRD) (GAIPA, 2013).

Genes IgH localizam-se no cromossomo 14 e sofrem rearranjos durante a formação do linfócito B em cerca de 150 regiões variáveis, 30 regiões de diversidade e 6 de junção. Pelo fato da região VDJ variável da IgH formada após rearranjo ser única para cada linfócito B maduro, esta é considerada um marcador clonal de processos neoplásicos (van DONGEN et al., 2003; CHOI, 1996).

Figura 2 – Síntese de uma cadeia pesada μ . (a) Um dos genes IgHD é unido a um dos 6 genes IgHJ funcionais e depois a um gene IgHV por um rearranjo com o conjunto D-J para formar o conjunto V-D-J. (b) O conjunto V-D-J-Cm é transcrito em um RNA pré-mensageiro. (c) As sequências de RNA correspondente aos íntrons e aos genes J supérfluos são então excisadas por processamento e as sequências codificadoras reunidas de maneira a produzir um RNA mensageiro maduro. (d) O RNA mensageiro é em seguida traduzido em uma cadeia polipeptídica. (e) O peptídeo sinal é eliminado após penetração da cadeia polipeptídica na cavidade do retículo.



Fonte: International Immunogenetics Information System (IMGT).

Técnica de pesquisa de rearranjos clonais

No início da década de 1980 iniciou-se a monitorar a DRM em LLA (principalmente do tipo T, por apresentarem imunofenótipo tímico aberrante na medula óssea e sangue periférico) através de microscopia de imunofluorescência, e logo começou-se a utilizar o método de Southern blotting (mesmo com baixa

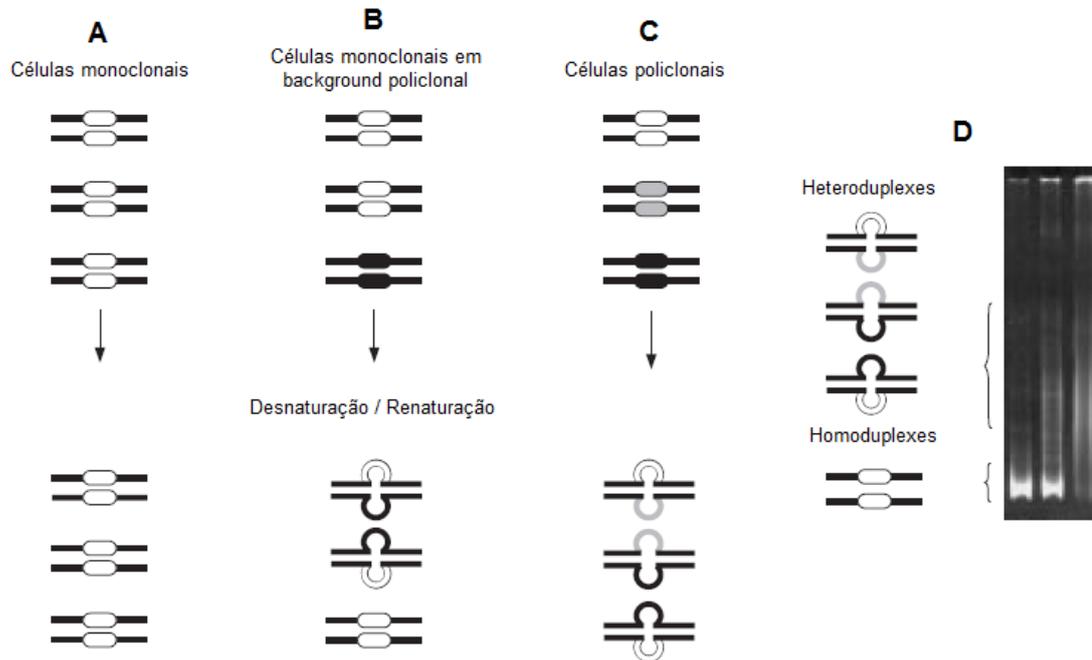
sensibilidade, encontrava-se mais de dois rearranjos para cadeia pesada de Ig) para avaliar clonalidade em processos linfoproliferativos, através do rearranjo de Igs e TCR. Com a descoberta da PCR, no início dos anos 90 os laboratórios introduziram a técnica na detecção da DRM (DAVI, et al., 1996; van DONGEN et al., 2015).

O consórcio BIOMED-2 (van DONGEN et. al. 2003), constituído por um grupo colaborativo de 47 instituições europeias (distribuídas nas cidades de Roterdã, Países Baixos; Salamanca, Espanha; Lisboa, Portugal; Southampton, Reino Unido; Leeds, Reino Unido; Kiel, Alemanha; Paris, França) definiu uma série de recomendações, através da padronização do protocolo para detecção de rearranjos clonais de imunoglobulinas e de receptores de células T, que foram seguidas na execução do presente estudo.

A análise de rearranjos clonais de TCR e Ig é considerada um método vantajoso para pacientes com nível relativamente alto de linhagem clonal no início do tratamento. A formação de bandas homo ou heteroduplexes é induzida pela desnaturação/aquecimento dos produtos de PCR (a 94°C) e rápida (porém progressiva) renaturação/resfriamento (a 4°C) e, desta forma, pode-se constatar se os amplicons são resultantes de populações celulares monoclonais ou policlonais. Após, as bandas são separadas por eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida. A presença de bandas heteroduplexes indica a presença de células linfoides policlonais, uma vez que é formada por regiões juncionais heterogêneas constituintes do amplicon, bastando-se que haja diferença entre um único nucleotídeo de um fragmento para outro para formação de um heteroduplex. Bandas homoduplex migram mais rápido no gel de poliacrilamida que bandas heteroduplex, de forma que quando muitos heteroduplexes são formados, há a visualização de um rastro, decorrente da migração lenta de fragmentos(figura 3D)(van DONGEN et al. 2003; GANAZZA, 2009; CAVALCANTE, 2012; LANGERAK, 1997).

Rearranjos homoduplex são caracterizados pela visualização de bandas únicas, onde os amplicons indicam linfócitos de origem monoclonal (figura 3A). Ao adicionar células monoclonais em um *background* policlonal, bandas homoduplex e heteroduplex serão formadas (figura 3B), enquanto a análise de células policlonais resulta na visualização de bandas heteroduplex, resultantes de regiões de junção heterogêneas (LANGERAK, 1997; CAVALCANTE, 2012).

Figura 3 – Esquema da técnica homo/heteroduplex de rearranjos de Ig e TCR.



Fonte: LANGERAK, 1997, modificado.

A metodologia de PCR com *primers* consenso para as regiões VDJ das imunoglobulinas e TCR associada à análise de homo/heteroduplex é uma ferramenta importante para a avaliação de uma população leucêmica, já que identifica populações celulares com o mesmo padrão leucêmico (clonalidade) e conta com a vantagem de usar uma amostra estável, como o DNA (PAULA et al, 2015). A análise da DRM é tecnicamente reproduzível pela facilidade de execução, rapidez e baixo custo deste método, quando comparado à análise por PCR em tempo real (CAVALCANTE, 2012). No entanto, o método quantitativo apresenta sensibilidade variante entre 10^{-4} – 10^{-5} , enquanto através de PCR convencional seguida de homo/heteroduplex, se chega até a sensibilidade de 10^{-3} , o que pode influenciar no acompanhamento mais confiável dos pacientes (SCRIDELI e TONE, 2015).

No Brasil, como em outros países em desenvolvimento, poucos centros de tratamento conseguem monitorar satisfatoriamente os pacientes através de PCR em tempo real (RQ-PCR), devido ao alto custo de execução, bem como da sua complexidade. Dessa forma, a técnica qualitativa acaba apresentando grande

importância para os centros que possuem menos recursos, principalmente para determinação de risco de recaída (SCRIDELI e TONE, 2015; PAULA et al, 2015).

Assim, percebe-se que a técnica de PCR, no geral, é utilizada satisfatoriamente tanto para diagnóstico da leucemia, como para acompanhamento da remissão da doença, através da análise de rearranjos, de modo sensível e reproduzível (CAVALVANTE, 2012).

Justificativa

Os rearranjos de imunoglobulinas, bem como os rearranjos TCR, são marcadores importantes em leucemia, devido à alta frequência em leucemias linfoides de tipo B e T. Pelo fato de a leucemia ser uma doença clonal, as células doentes tendem a apresentar o mesmo padrão de rearranjos, o que confere especificidade dos marcadores à doença. Assim, podem ser utilizados na avaliação da doença residual mínima, possibilitando, dessa forma, um monitoramento mais preciso da doença e, ainda, permite a detecção de novos rearranjos adquiridos na recidiva da doença.

Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Determinar o perfil molecular, a partir de análises de recombinações de imunoglobulinas e receptores de células T, de pacientes admitidos com LLA.

1.1.2 Objetivos específicos

- ➔ Adaptar a técnica de pesquisa do rearranjo V(D)J para a rotina do laboratório de Biologia Molecular;
- ➔ Analisar a prevalência de rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de células T dos pacientes estudados.

MANUSCRITO

Este manuscrito será submetido ao São Paulo Medical Journal, Qualis Capes B3 na área da Farmácia.

ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DE RECOMBINAÇÕES V(D)J EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Isabel Agne Souza Leal, BSc, Estudante de mestrado em Ciências Farmacêuticas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Patrícia Chaves Brites, MSc, Bióloga no Setor de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Bárbara Villa, BSc, Biomédica no Setor de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Angelita Bottega, BSc, Estudante de mestrado em Ciências Farmacêuticas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Vanessa Rossini Severo, BSc, Estudante de mestrado em Biociência e Biotecnologia, no Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brasil.

Rosmari Hörner, PhD, Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

AVALIAÇÃO DE RECOMBINAÇÕES DOS GENES V(D)J EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

RESUMO

A Leucemia linfóide aguda é uma doença maligna que acomete, principalmente, crianças. Com o passar dos anos, as técnicas de diagnóstico e acompanhamento melhoraram em sensibilidade, de forma que o presente trabalho buscou abordar uma destas técnicas que apresenta boa reprodutibilidade e que investiga alvos que estão presentes em pelo menos 95% desses pacientes. Foi desenvolvido um trabalho do tipo experimental prospectivo em um Hospital Universitário do sul do Brasil. Para isso foram realizadas PCRs com diferentes primers, para detectar rearranjos nos genes de imunoglobulinas de pacientes com LLA do tipo B. Foram encontradas frequências de rearranjos no gene IgH de 82,76%, no gene IgK de 31,03%, nos genes TCRG e TCRD de 41,37% e no gene Sil-Tal de 3,45%. A alta frequência de marcadores possíveis de serem detectados possibilita o ótimo uso destes no acompanhamento da doença residual mínima durante o tratamento do paciente.

Palavras-chave: Recombinação V(D)J, rearranjo gênico, leucemia linfóide aguda, leucemia da infância, genes de imunoglobulinas.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (linfoides e mieloides) associadas são responsáveis por cerca de um terço de todos os casos de leucemias da infância e são as maiores causas de morte infantil por doenças em países desenvolvidos,⁽¹⁾ de forma que o estudo da doença residual mínima (DRM) tem sido considerado de grande relevância: tanto no acompanhamento da resposta dos pacientes, quanto na realocação destes em diferentes estratégias de tratamento.⁽²⁾

No processo de desenvolvimento normal dos linfócitos há um complexo rearranjo de genes do sistema imunológico (de imunoglobulinas – Ig, e de receptores de células T – TCR), entre as regiões variáveis (V), de diversidade (D), juncionais (J) e constantes (C), para gerar grande variabilidade de resposta imunogênica, já que cada linfócito apresenta após rearranjo, uma combinação específica destes segmentos.^(3, 4)

A pesquisa de rearranjos nos genes de imunoglobulinas tem sido recomendado por este ser útil no diagnóstico e acompanhamento de leucemias e linfomas. O fato de na leucemia linfóide haver amplificação celular clonal, faz com que os genes precursores de Ig e TCR apresentem o mesmo padrão de rearranjos, que é único para cada paciente, tornando-os bons marcadores para acompanhamento da DRM.⁽⁵⁾

OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo adaptar a técnica de pesquisa de rearranjos de imunoglobulinas e TCR e determinar a presença e frequência destes em pacientes com leucemia linfóide aguda, de forma qualitativa através da técnica de PCR convencional, como auxiliares no acompanhamento das LLAs.

MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 0364.1.243.000-11.

Pacientes

Neste trabalho foram alvo de estudo os pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda de um Hospital Universitário público do sul do Brasil. Foi realizado um estudo experimental prospectivo, quanto à presença ou ausência de rearranjos de imunoglobulinas.

Foram considerados os resultados de 29 amostras de leucemia linfóide aguda do tipo B e T no período compreendido entre janeiro de 2012 a dezembro de 2014. Um único paciente teve duas amostras incluídas no trabalho, pois uma representou a amostra do diagnóstico (D0) do paciente e a outra, a amostra da recidiva da doença, após período de remissão.

Obtenção de células mononucleadas

As amostras utilizadas eram provenientes de medula óssea e foram coletadas rotineiramente para exames laboratoriais. Não se fez necessária uma coleta específica para o presente trabalho.

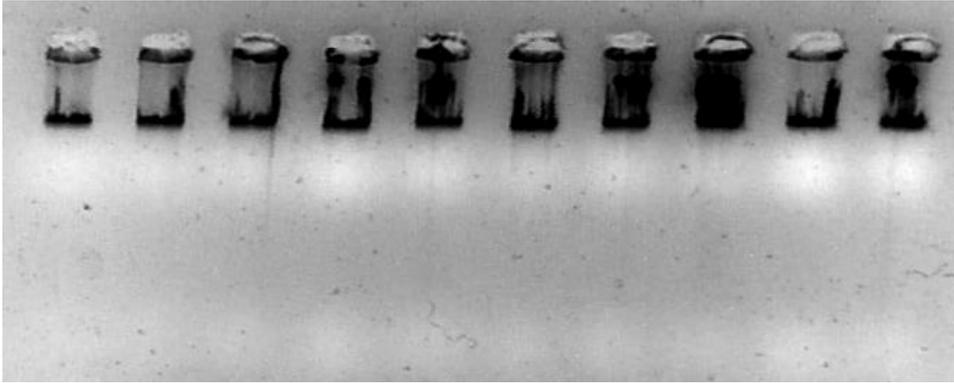
As células mononucleadas utilizadas nos testes foram obtidas através de separação por gradiente de concentração, por Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), onde se usou 4mL de Ficoll para cada 8mL de amostra (4mL de medula óssea diluída em 4mL de salina 0,9%). Durante a centrifugação (20 minutos a 2.000 rpm), os eritrócitos e granulócitos migram através do Ficoll, separando-se das células mononucleadas que permanecem na interface devido à sua baixa densidade, de onde são facilmente recolhidas e lavadas em salina, para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

O DNA das células mononucleadas foi obtido através de extração pelo kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, San Luiz Obispo, Estados Unidos) em 5×10^6 células.

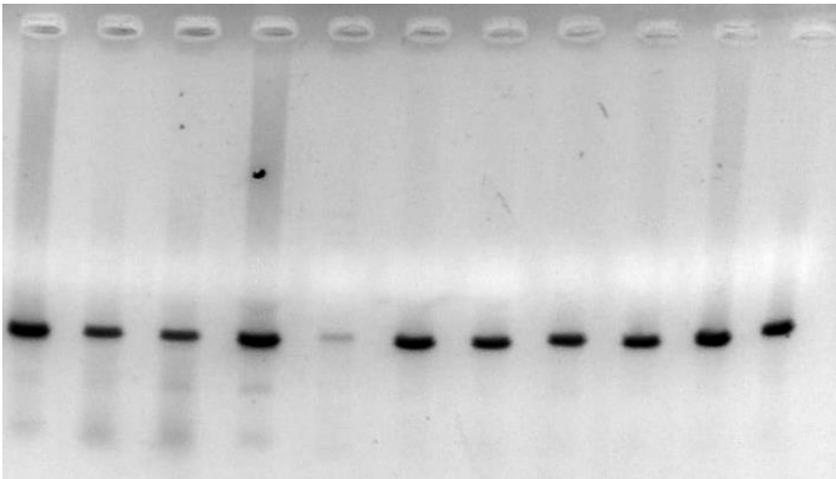
A qualidade das amostras obtidas foi determinada a partir da concentração do DNA extraído e também através da visualização da integridade do ácido nucleico em um gel de agarose a 1% (Figura 1).

Figura 1 – Eletroforese de integridade de DNA em gel de agarose



A concentração das amostras de DNA obtidas foram quantificadas por fluorimetria, através do equipamento QuBit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), kit de alta sensibilidade para DNA dupla fita (dsDNA HS). Ainda, foi realizada a amplificação do gene endógeno beta globina (Figura 2), através de uma PCR convencional e revelação em gel de agarose a 2%, para assegurar a viabilidade do DNA.

Figura 2 – Eletroforese de controle endógeno (beta globina) de DNA



PCR Qualitativo

A PCR é uma metodologia sensível, que tem a vantagem de necessitar de pouco DNA para realização da técnica.⁽⁶⁾ Em nosso trabalho, para cada amostra foi realizada uma PCR singleplex com um conjunto de 19 pares de primers, descritos

por Van Dongen et. al (2003) no protocolo BIOMED-2 e testados por Ganazza (2014), cujas sequencias estão apresentadas na tabela 1. Foi utilizado DNA em uma concentração diluída de 30ng/μL, Taq polimerase GoTaq® Hot Start (Promega, San Luis Obispo, Estados Unidos) e demais reagentes, em volumes referidos na Tabela 2.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nas PCRs ao diagnóstico dos pacientes

Primer Foward	Sequência 5' - 3'	Primer reverso	Sequência 5' - 3'
VH1	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC
VH2	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG	"	"
VH3	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA	"	"
VH4	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG	"	"
VH5	GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG	"	"
VH6	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG	"	"
VH7	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	"	"
DH1	GGCGGAATGTGTGCAGGC	"	"
DH2	GCACTGGGCTCAGAGTCTCT	"	"
DH3	GTGGCCCTGGGAATATAAAA	"	"
DH4	AGATCCCCAGGACGCAGCA	"	"
DH5	CAGGGGGACACTGTGCATGT	"	"
DH6	TGACCCCAGCAAGGGAAGG	"	"
DH7	CACAGGCCCTACCAGC	"	"
VK1/6	TCAAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG	kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA
VK2	GGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC	"	"
VK3	CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC	"	"
INTRON	CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC	"	"
VG1	GGAAGGCCACAGCRTCTT	Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1	GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG + TTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC
VG9	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC	"	"
VG10	AGCATGGGTAAGACAAGCAA	"	"
VG11	AGCATGGGTAAGACAAGCAA	"	"
Vd1	ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT	Jd1	GTTCCACAGTCACACGGGTTTC
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	"	"
Vd3	GTACCGGATAAGGCCAGATTA	"	"
Dd2	AGCGGGTGGTGTATGGCAAAGT	"	"
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	Dd3	TGGGACCCAGGGTGTAGGATAT
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	"	"
Dd2	AGCGGGTGGTGTATGGCAAAGT	"	"
Si15	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA	Tal1	AGAGCCTGTCGCCAAGAA
"	"	Tal2	TTGTAAAATGGGAGATAATGTGCAC

Fonte: Adaptado de Van Dongen, 2003 e Ganazza, 2014.

Tabela 2 – Descrição de reagentes e volumes para realização da PCR qualitativa

Reagente	µL por amostra
Tampão com MgCl ₂ 1x	5,0
dNTP 100mM	1,0
Mix de primers (5pmol cada)	2,0
Água Milli-Q	36,0
Taq (1U)	1,0
DNA	5,0
Total	50 µL

A corrida da PCR foi programada para: um ciclo de 95°C por 3 minutos; série de 35 repetições de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e, por fim, extensão final de 72°C por 10 minutos.

Análise de homo/heteroduplex

Após a retirada dos produtos de PCR do termociclador, foi conduzida a técnica de preparo dos homo/heteroduplex. Para isso, utilizou-se 17µL de amplicon associados a 3µL de corante e, novamente, as amostras foram levadas ao termociclador, em um ciclo de desnaturação de 94°C por 10 minutos, seguido de um ciclo a 4°C por um a duas horas.

Essa desnaturação com posterior renaturação das fitas possibilita que a população celular com mesmo padrão de rearranjos seja visível em uma banda monoclonal (homoduplex). ⁽⁸⁾

Eletroforese

Para a revelação do produto de PCR, utilizou-se gel de poliacrilamida a uma concentração de 12%, conforme descrito na Tabela 3, para preparação de um gel:

Tabela 3 – Volumes necessários para preparação de um gel de poli(acrilamida) 12%

Soluções	Volume
Solução de acrilamida/bisacrilamida 40%	8,52 mL
Água Milli-Q	17,95 mL
TBE 10x	3,04 mL
Persulfato de amônia 10%	304,26 uL
TEMED	18,25 uL

As amostras prontas de homo/heteroduplex foram retiradas do termociclador no momento da aplicação no gel e permaneceram sob refrigeração em rack resfriada (*cooler*), para que o aumento da temperatura não desfizesse os rearranjos homoduplex formados.

A eletroforese correu em 6 horas, a uma voltagem constante de 130 e amperagem de 45 mA. Após a corrida, o gel foi retirado da cuba vertical de eletroforese e transferido para uma cuba com solução de brometo de etídeo (EtBR) a 10mg/mL (300mL de água + 30mL de EtBR), por aproximadamente 30 minutos.

Após a coloração, os géis foram fotografados por sistema de documentação de eletroforese Kodak EDAS 290 associado ao software Kodak 1D Image Analysis e foram avaliados os tamanhos de fragmentos, conforme Tabela 4:

Tabela 4 – Relação de peso molecular esperado para cada sequência testada

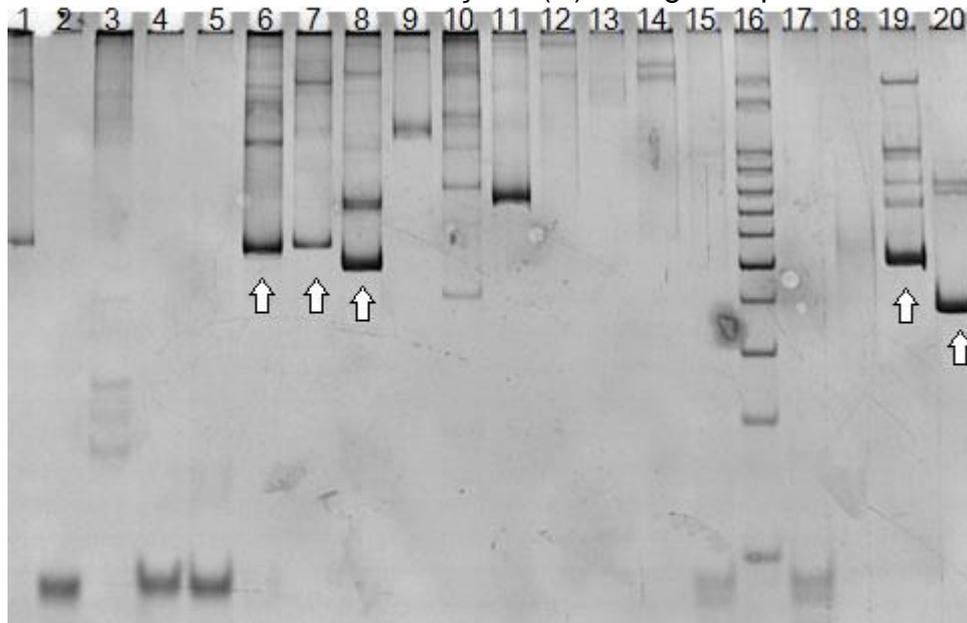
Gene	Sequencia	Tamanho do fragmento (pb)	Gene	Sequencia	Tamanho do fragmento (pb)
IgH	VH1	250-295	IgK	VKI	225-245
	VH2	250-295		VKII	360-390
	VH3	250-295		VKIII	270-300
	VH4	250-295		INTRON	270-300
	VH5	250-295	TCRG	VGI	200-255
	VH6	250-295		VG9	160-220
	VH7	250-295		VG10	145-200
	DH1	260-290		VG11	80-140
	DH2	230-260		TCRD	VD1
DH3	390-420	VD2	200-240		

DH4	175-205	VD3	230
DH5	225-255	D2J1	270
DH6	110-150	V2D3	Aprox. 240
DH7	100-130	D2D3	Aprox. 190
Sil-Tal		Sil-Tal1	300
		Sil-Tal2	359

Fonte: Van Dongen, 2003.⁽⁷⁾

A seguir, na Figura 3, uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de uma das corridas realizadas em 6 horas, onde foi utilizado, um marcador de peso molecular de 50 pares de base. Observar bandas homoduplexes nos poços 6 e 7 (de 250 a 300pb), 8 (até 260pb), 19 (aproximadamente 240pb) e 20 (aproximadamente 190pb).

Figura 3 – Eletroforese de recombinação V(D)J em gel de poliacrilamida 12%



RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2012 a dezembro 2014 foram analisadas 29 amostras de 28 pacientes diagnosticados com LLA, 25 (89,29%) de linhagem B e 3 (10,71%) de linhagem T. Foram 18 (64,28%) do gênero masculino e 10 (35,72%) feminino; com idade média de 13,28 anos e mediana de 9,5 anos (de 1 a 82 anos). Um paciente teve duas amostras incluídas, pois uma foi ao diagnóstico e a outra na recidiva da doença 18 meses após. A Tabela 5 detalha o perfil dos pacientes, a citogenética e os transcritos quiméricos pesquisados ao diagnóstico da leucemia.

Tabela 5: Perfil das amostras, citogenética e transcritos quiméricos dos 28 pacientes diagnosticados com LLA

Caso	Gênero	Idade	Citogenética	BCR/ ABL P190	BCR/ ABL P210	E2A/ PBX1	AF4/ MLL	TEL/ AML1
1	F	14	47,XX,+21c	-	-	+	-	-
2	M	82	mn(31)[15]/mn(56~64)[4]/46,XY[2]	-	-	-	-	-
3	M	19	45,XY,-11	-	-	-	-	-
4	F	22	46,XX	-	-	-	-	-
5	M	4	50,XY,+5,+8,t(9;22)(q34;q11),+13,+der(22)t(9;22)	+	-	-	-	-
6	F	4	53~54,XX,+5,+6,+7,+11,+13,+16,+17,+20,+21,+mar[cp04]	-	-	-	-	-
7	M	15	48,XY,+4,t(4;11)(q21;q23),+11,del(15)(q24)	-	-	-	+	-
8	M	15	46,XY,t(7;9)(q11;p13)	-	-	-	-	-
9	F	10	46,XX	NR	NR	NR	NR	NR
10	M	4	47~49,XY,+14[06],+16[04],+21[04][cp07]/46,XY[02]	-	-	-	-	-
11	M	9	62~64,XXY,add(1)(q34),der(22)t(9;22)(q34;q11)x2/46,XY[02]	-	-	-	-	-
12	M	12	NR	-	-	-	-	-
13	M	14	46,XY	-	-	-	-	-
14	F	4	NR	-	-	-	-	-
15	F	6	NR	-	-	-	-	-
16	M	4	46,XY	-	-	-	-	+
17	F	6	46,XX	-	-	-	-	-
18	M	5	NR	-	-	-	-	+
19	M	9	mn(52~56)[08]/46,XY[03]	-	-	-	-	-
20	M	1	46,XY	-	-	-	-	-
21	M	9	47,XY,+8	-	-	-	-	+
22	M	6	NR	-	-	-	-	-
23	M	4	56~58,XXYY,+6[5],+7[3],+8[5],+9[5],+10[5],+13[4],+14[5],+15[4],+19[2],+20[3]cp[06]	-	-	-	-	-
24	F	15	45~46,XX,t(5;9)(q11;p24),-21,+mar1[cp05]	-	-	-	-	-
25	M	41	42~45,XY,i(9)(q10),-11	-	-	-	-	-
26	F	11	46,XX,add(2)(q37),t(2;21)(q11;q22)/46,XX,sl,+der(2)t(2;21),-4	-	-	-	-	-
27	M	16	46,XY	-	-	-	-	-
28	F	11	NR	-	-	-	-	-

F: feminino; M: masculino; NR: cariótipo não realizado.

Após a análise dos homo/heteroduplex por eletroforese, a detecção de rearranjos gênicos Ig e TCR ao diagnóstico está exposta na Tabela 6. Das 29 amostras, houve uma amostra que não apresentou nenhum rearranjo, mas foi considerada nos resultados, devido à qualidade comprovada do DNA utilizado.

Tabela 6 – Frequência de rearranjos encontrados em 29 amostras com relação aos genes envolvidos e o total de amplificações

Gene	Sequência	Monoclonais	Total
IgH	VH1	7 (7,22%)	55,68%
	VH2	3 (3,09%)	
	VH3	9 (9,29%)	
	VH4	5 (5,15%)	
	VH5	2 (2,06%)	
	VH6	4 (4,12%)	
	VH7	5 (5,15%)	
	DH1	-	
	DH2	3 (3,09%)	
	DH3	2 (2,06%)	
	DH4	-	
	DH5	-	
	DH6	-	
	DH7	14 (14,43%)	
IgK	Vk1/6	5 (5,15%)	13,40%
	Vk2	4 (4,12%)	
	Vk3	2 (2,06%)	
	Intron	2 (2,06%)	
TCRG	Vglf	10 (10,32%)	13,40%
	Vg9	3 (3,09%)	
	Vg10	-	
	Vg11	-	
TCRD	Vd1	-	16,49%
	Vd2	-	
	Vd3	-	
	Dd2	-	
	V2D3	9 (9,29%)	
	D2D3	7 (7,22%)	
Sil-Tal	Sil-Tal1	-	1,03%
	Sil-Tal2	1 (1,03%)	
TOTAL		97	

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados de rearranjos amplificados para cada amostra testada. O “+” equivale à presença do rearranjo na determinada sequência, enquanto o “-” indica ausência de amplificação.

Do total, 96,55% dos pacientes apresentaram pelo menos 1 rearranjo, mas o mais frequente foi os pacientes apresentarem 2 rearranjos distintos (10 casos, em 29 amostras).

Tabela 7 – Rearranjos amplificados em cada amostra

Pac	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	DH1	DH2	DH3	DH4	DH5	DH6	DH7	VK1	VK2	VK3	INTR	VG1	VG9	VG10	VG11	VD1	VD2	VD3	DD2	V2D3	D2D3	Sil1	Sil2	
1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
15	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
17	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
20	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
22	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

11r: Amostra da recidiva da doença do paciente 11

Ainda quanto à frequência, 24 das 29 amostras apresentaram rearranjos no gene IgH (82,76%); 9 de 29 apresentaram rearranjos no gene IgK (31,03%); 12 de 29, no gene TCRG (41,37%), 12 de 29, apresentavam rearranjos de TCRD (41,37%) e 1 de 29 apresentou rearranjo Sil-Tal (3,45%).

Com relação ao gene IgH, para os pacientes com cariótipo não realizado, com cariótipo normal, hipodiploide e hiperdiploide independente de outras alterações estruturais, foram observados 9, 14, 7 e 23 marcadores respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8: Sequências de rearranjos IgH em relação a diferentes tipos de cariótipos

Gene	N	Rearranjo	NR	Normal	Hipodiploide	Hiperdiploide
IgH	7	VH1	1	1	2	3
	3	VH2	1	1	0	1
	9	VH3	3	3	0	3
	5	VH4	0	1	1	3
	2	VH5	0	1	0	1
	4	VH6	0	0	1	3
	5	VH7	0	1	1	3
	3	DH2	2	0	1	0
	2	DH3	0	0	1	1
	13	DH7	2	6	0	5

N: número de ocorrências, NR: cariótipo não realizado.

Em rearranjos do gene IgK, para os pacientes com cariótipo não realizado, com cariótipo normal, hipodiploide e hiperdiploide independente de outras alterações estruturais, foram observados 1, 1, 1 e 10 marcadores respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Sequências de rearranjos IgK em relação a diferentes tipos de cariótipos

Gene	N	Rearranjo	NR	Normal	Hipodiploide	Hiperdiploide
IgK	5	VK1/6	1	1	0	3
	4	VK2	0	0	0	4
	2	VK3	0	0	0	2
	2	INTRON	0	0	1	1

N: número de ocorrências, NR: cariótipo não realizado.

Em rearranjos do gene TCRG, para os pacientes com cariótipo não realizado, com cariótipo normal, hipodiploide e hiperdiploide independente de outras alterações estruturais, foram observados 5, 3, 0 e 4 marcadores respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10: Sequências de rearranjos TCRG em relação a diferentes tipos de cariótipos

Gene	N	Rearranjo	NR	Normal	Hipodiploide	Hiperdiploide
TCRG	9	VG1	4	1	0	4
	3	VG9	1	2	0	0
	0	VG10	0	0	0	0
	0	VG11	0	0	0	0

N: número de ocorrências, NR: cariótipo não realizado.

Em rearranjos do gene TCRD, para os pacientes com cariótipo não realizado, com cariótipo normal, hipodiploide e hiperdiploide independente de outras alterações estruturais, foram observados 2, 2, 3 e 6 marcadores respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Sequências de rearranjos TCRD em relação a diferentes tipos de cariótipos

Gene	N	Rearranjo	NR	Normal	Hipodiploide	Hiperdiploide
TCRD	0	Vd1	0	0	0	0
	0	Vd2	0	0	0	0
	0	Vd3	0	0	0	0
	0	Dd2	0	0	0	0
	8	V2D3	2	1	1	4
	6	D2D3	0	1	2	2

N: número de ocorrências, NR: cariótipo não realizado.

Para a translocação entre os genes Sil-Tal, o paciente positivo para Sil-Tal2 não teve o cariótipo realizado.

A Tabela 12 a seguir compara alguns resultados, onde se percebe que os resultados concordam entre si.

Tabela 12 – Comparação de frequências de rearranjos com outros estudos

	Estudo atual	Assumpção, 2013 ⁽⁶⁾	Poopak, 2014 ⁽⁴⁾
PAÍS	Brasil	Brasil	Irã
IgH	85,71	71	98
IgK	31,03	47	50

TCRG	41,37	60	55
TCRD	41,37	47	40
Sil-Tal	3,45	-	-

DISCUSSÃO

A técnica para a pesquisa de rearranjos clonais de imunoglobulinas e receptores de células T, embora trabalhosa, e depois de adaptada ao laboratório, apresentou ótimos resultados quanto a reprodutibilidade dos testes.

Em comparação à metodologia quantitativa, a pesquisa dos rearranjos através de PCR convencional (metodologia qualitativa) seguida da técnica de homo/heteroduplex é uma técnica aplicável à maioria dos centros de tratamento das LLAs. No entanto, é importante que se almeje o monitoramento molecular quantitativo, através de PCR em tempo real (RQ-PCR), para monitoramento mais sensível dos pacientes, já que esta apresenta detecção de um blasto em 10^{-4} a 10^{-5} células normais, enquanto a metodologia qualitativa chega a uma sensibilidade de 10^{-3} .⁽¹³⁾

Nosso achado de 85,71% dos pacientes (24/28) apresentarem rearranjos de IgH corrobora com as altas frequências descritas na literatura. Stankovic (1995)⁽⁵⁾ cita valores de mais de 40% dos pacientes com LLA-B oligoclonais para genes de cadeia pesada. BAI et al. (2007)⁽⁹⁾ utilizaram a identificação do rearranjo dos genes de Ig e TCR em 71 pacientes diagnosticados com LLA, para acompanhamento da DRM. Nesse estudo foi verificado que 82,7% dos pacientes apresentaram o rearranjo IgH. KOLENOVA et al. (2010)⁽¹⁰⁾ identificaram 106 rearranjos em 44 pacientes analisados, sendo que em 95% foram identificados os rearranjos IgH.

No estudo de Scrideli et al (2004)⁽¹¹⁾, rearranjos de células T gamma (TCRG) são observados em mais de 90% dos casos de LLA-T ao contrario dos achados deste trabalho que achou 66,66%, provavelmente por termos somente 3 pacientes. Em 50 a 60% nos casos de LLA-B, o que também difere da nossa frequência detectada de 36,00%.

O trabalho de Scrideli⁽¹²⁾ de 2009 ter apresentado em 96,4% das amostras a amplificação de pelo menos um rearranjo, bem como o trabalho de Poopak⁽⁴⁾, que detectou 95%, vão ao encontro dos achados deste estudo, onde essa taxa foi de 96,16%.

Entende-se que as metodologias citogenéticas e moleculares complementam-se entre si e, tendo isto em vista, a utilização da pesquisa de rearranjos gênicos de Ig e TCR tem sua importância em situações onde, por qualquer motivo, não tenha sido possível realizar a citogenética do paciente ou esta esteja normal, bem como quando não forem detectados transcritos quiméricos por técnicas de biologia molecular nas células de LLA do paciente.

Neste trabalho, quando as sequências gênicas pesquisadas são analisadas em relação ao cariótipo, observou-se que em IgH a prevalência se deu nos pacientes com cariótipo hiperdiploide com 23 marcadores (43,40%); bem como no gene IgK, com 10 marcadores (73,92%); em rearranjos de gene TCRG houve prevalência de ocorrência em situações onde o cariótipo não foi realizado (5 marcadores, 41,66%); no TCRD a prevalência se deu em cariótipo hiperdiploide (6 marcadores, 42,86%) e rearranjo Sil-Tal foi observado em uma única amostra em cariótipo não realizado. Nas outras séries da literatura estes dados não têm sido analisados, talvez porque tenham significados diversos, porém servem para reforçar a importância da pesquisa dos rearranjos gênicos de Ig e TCR em situações em que há falha na detecção de alterações que possam ser seguidas, pela citogenética e/ou biologia molecular.

CONCLUSÃO

Foi encontrada alta frequência de sequências do gene IgH, seguida por sequências de TCRD, IgK, TCRG e Sil-Tal. Logo, as sequências de IgH mostram-se como marcadores preferenciais para teste em LLAs.

Não houve nenhuma amplificação da sequência DH1, DH4, DH5, DH6, Vg10, Vg11, Vd1, Vd2, Vd3, Dd2 e Sil-Tal1. Como a maioria destes primers é utilizada para amostras de LLA-T e foram testadas poucas amostras (3), mais testes fazem-se necessários, principalmente nesta população, para que se possa determinar a real vantagem dos primers pouco frequentes nas PCRs ao diagnóstico.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes tratados no Hospital Universitário, cujas amostras serviram como instrumento desta pesquisa. À equipe do Laboratório de Biologia Molecular: Bárbara Villa, Vanessa Severo, Jéssica de Rosso Motta, Raísa Albuquerque, Camile Minello. Aos médicos do Serviço de Hematologia-Oncologia: Waldir Veiga Pereira, Virgínia Maria Cóser, Thereza Cristina S. Lafayette, Mauber Schultz Moreira, Ederson José Reis, Paula Kieling, Pâmela Poletto, Cristian Dias Barbosa. À toda a equipe do Serviço de Hematologia-Oncologia e aos amigos envolvidos direta ou indiretamente com esta pesquisa, especialmente à Rosmari Hörner e Patrícia Brites, pela parceria.

REFERÊNCIAS

- 1 Rose K, Walson PD. The contributions of the European Medicines Agency and its pediatric committee to the fight against childhood leucemia. *Risk management and Healthcare policy* 2015,8:185–205.
- 2 van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grunmayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, zurStadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJM. Analysis of minimal residual disease by the Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007,21:604-11.
- 3 Scrideli CA, Kashima S, Cipolloti R, Defavery R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leucemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leukemia Research* 2002,26:431-8.
- 4 Poopak B, Saki N, Purfatholah A, Najmabadi H, Mortazavi Y, Arzanian MT, Khosravipour, Haghnejad F, Salari F, Shahjehani M. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor- δ/γ gene rearrangements in Iranian children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2014,19(5):259-66.
- 5 Stankovik T, Mann JR, Darbyshire PJ, Taylor AMR. Clonal diversity, measured by heterogeneity of Ig and TCR gene rearrangements, in some acute leukaemias of childhood is associated with a more aggressive disease. *European Journal of Cancer* 1995,31A(3)394:401.
- 6 Assumpção JG, Paula FDF, Xavier SG, Murao M, Neto JCA, Dutra AP, Lima ER, Oliveira BM, Viana MB. Gene rearrangement study for minimal residual disease monitoring in children with acute lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013,35(5):337-42.
- 7 van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van

- Krieken JHJM, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003,17:2257-2317.
- 8 Ganazza MA. Estudo da doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da criança e do adolescente. Campinas. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Unicamp, 2014.
- 9 Bai Y, Yu H, Lin W, Zhou DF, Xiao Y, Wu XY, Jin RM, Fei HB. Detection of minimal residue disease in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia and its prognostic significance. *World Journal of Pediatrics* 2007,3(4):290-4.
- 10 Kolenova A, Hikkel I, Ilencikova D, Hikkelova M, Sejnova D, Kaiserova E, Cizmar A, Puskacova J, Bubanska E, Oravkinova I, Gencik M. Minimal residual disease detection using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: Slovak experience. *Neoplasma* 2010,57(6):552-61.
- 11 Scrideli CA, Queiróz RGP, Kashima S, Sankarankutty BOM, Tone LG. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. *Leukemia Research* 2004,28:267-273.
- 12 Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, Araujo M, Toledo SR, Lee MLM, Delbuono E, Petrilli AS, Queiróz RP, Biondi A, Viana MB, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 2009,94(6):781-9.
- 13 Scrideli CA, Tone LG. Qualitative polymerase chain reaction versus quantitative polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015,37(6):366-368.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

Durante o processo de padronização do protocolo para detecção dos rearranjos gênicos clonais ao diagnóstico, uma série de testes e PCRs foram realizadas.

Para otimizar o tempo de migração das amostras no gel de poli-acrilamida 12%, foram realizadas 15 eletroforeses, nas diferentes condições:

Tabela 1 – Condições testadas para aprimoramento de eletroforese

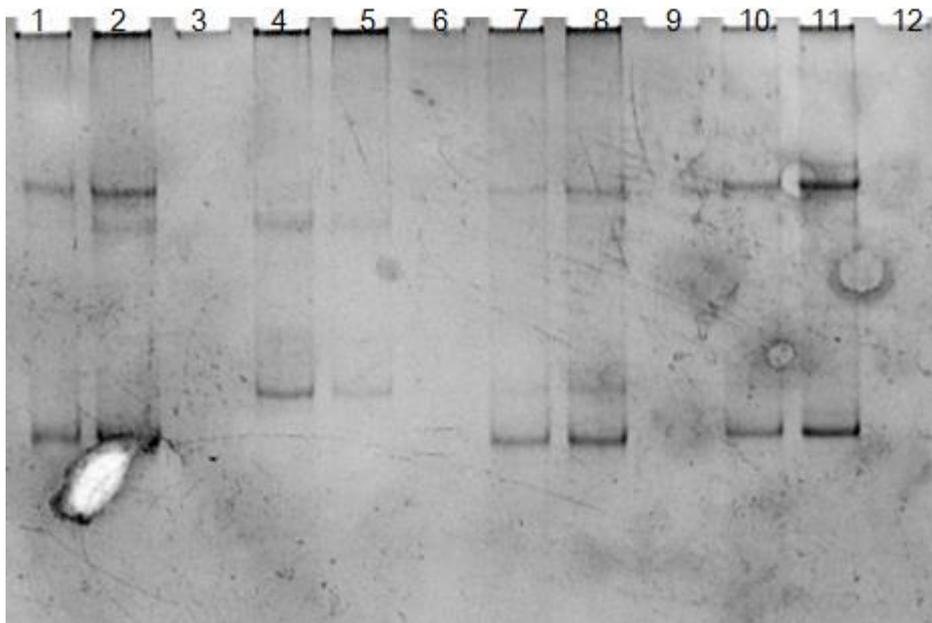
Amostra	Voltagem (V)	Amperagem (mA)	Tempo de migração (h)
1	120	25	7
2	130	50	5:30
3	120	50	6
4	120	38	6
5	130	45	5
6	130	50	6
7	130	43	6
8	130	55	5:10
9	130	45	4:30
10	130	40	5
11	130	50	5
12	130	40	5:30
13	130	45	5
14	130	45	6
15	130	45	6

Observou-se que, nas condições do laboratório, as melhores situações para atingir boa qualidade de resolução e separação das bandas no gel se deram a uma voltagem de 130 e amperagem de 45, em 6 horas de corrida. Utilizou-se marcador de 50 pares de base para melhor interpretação dos resultados, o que auxiliou

também, na visualização de separação de bandas próximas durante o processo de padronização.

Ainda, foram realizados 10 testes de acompanhamento qualitativo da DRM, através da análise comparativa de PCRs do diagnóstico dos pacientes e amostras do seguimento do tratamento, nos dias de tratamento D15 e D35, conforme figura 4. Amostras foram consideradas positivas ao apresentarem o mesmo padrão de migração e peso molecular da amostra de diagnóstico.

Figura 4 – Eletroforese de acompanhamento de tratamento.



Poços 1, 4, 7 e 10 correspondem a uma amostra de diagnóstico. Poços 2, 5, 8 e 11 são referentes a segunda amostra do paciente, no dia 15; e, por fim, poços 3, 6, 9 e 12, correspondentes a amostra de dia 35 de tratamento.

Nota-se que, qualitativamente, as amostras referentes ao dia 35 já não mais apresentam rearranjos visíveis.

De uma forma geral, as amostras do seguimento confirmam a reprodutibilidade da técnica, por vez que os pacientes, em grande parte dos casos ainda apresentam os mesmos rearranjos aparentes no diagnóstico. Em alguns casos, os rearranjos ainda são aparentes, porém a intensidade da banda é mais fraca. E houveram casos em que as amostras subsequentes ao diagnóstico deixaram de apresentar alguns rearranjos pelo método qualitativo, de forma que

poderiam ser acompanhados satisfatoriamente por PCR em tempo real, com maior sensibilidade.

4 CONCLUSÃO

A técnica para pesquisa da prevalência de rearranjos gênicos mostrou-se, depois de ajustadas os devidos detalhes, um procedimento de reprodutibilidade confiável e relativamente fácil execução.

Foi determinado o perfil molecular dos pacientes com LLA que são atendidos no Hospital, onde se constatou que a maior frequência de ocorrência se dá nas sequências do gene de cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH).

A maior frequência de rearranjos foi detectada no gene IgH (82,76%), sendo representada por ampliações nas sequências DH7 (14 amostras), Vg1 (10 amostras), VH3 e V2D3 (9 amostras).

Rearranjos de IgK ocorreram em frequência de 31,03%, rearranjos TCRG e TCRD com 41,37% e Sil-Tal em 3,45%.

5 REFERÊNCIAS

BAI, Y. et al. **Detection of minimal residue disease in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia and its prognostic significance.** World Journal of Pediatrics, v. 3, n. 4, 290 – 294, 2007.

CAVALCANTE, Larissa. **Padronização de método molecular para detecção de doença residual mínima (DRM) em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda tratadas no Distrito Federal.** 2012. 97 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012.

CHOI, Y., et al., **Clonal evolution in b-lineage acute lymphoblastic leukemia by contemporaneous VH-VH gene replacements and VH-DJH gene rearrangements.** Blood, vol. 87, n° 6, p. 2506 – 2512, 1996.

DAVI, F., et al., **Lymphocytic progenitor cell origin and clonal evolution of human b-lineage acute lymphoblastic leukemia.** Blood, vol. 88, n° 2, pag. 609 – 621, 1996.

EMERENCIANO, M. et al. **Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas.** Revista Brasileira de Cancerologia, vol. 50, n° 3, pag. 183 – 189, 2004.

FARIAS, M. G; CASTRO, S. M. **Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 40, n. 2, p. 91 – 98, 2004.

FRÖHLING, S. et al. **Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications.** Journal of Clinical Oncology, vol. 23, n° 25, pag. 6285 – 6295, 2005.

GABE, C.; ALMEIRA, D.; SIQUEIRA, L. **Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, vol. 31, n° 2, pag. 74 – 79, 2009.

GAIPA, G. et. al. **Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** Cytometry Part B (Clinical Cytometry), vol. 84, p. 359 – 369, 2013.

GANAZZA, Mônica Aparecida. **Estudo da doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da criança e do adolescente**. 2009. 113 f. Dissertação (Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GBTLI (Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil). **Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças**. Soc. Bras. Oncol. Pediatr. 2009.

HOELZER, D. **Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia**. Haematologica, vol. 100, n. 7, pag. 855 – 858, 2015.

HSU, Ellen. **The invention of the lymphocytes**. Curr Opin Immunol, ed. 23, vol. 2, pag. 156 – 162, 2011.

INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM – IMGT. Disponível em: <www.imgt.org>. Montpellier, França. Acessado em: 12 de novembro de 2015.

Instituto nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia>>. Acesso em: 11 de dezembro de 2015.

HOLMES JR, L. et al. **Epidemiologic, racial and healthographic mapping of Delaware pediatric cancer: 2004 – 2014**. Int. J. Environ. Res. Public Health, vol.13, pag. 49 – 63, 2016.

KAUL, S., et al., **A retrospective analysis of treatment-related hospitalization costs of pediatric, adolescent, a Young adult lymphoblastic leukemia**. Cancer medicine, doi: 10.1002/cam4.583, 2015.

LANGERAK, A. et al. **Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations**. Leukemia, v. 11, p. 2192 – 2199, 1997.

LICHTVAN, Leniza Costa Lima. **Citogenética nas leucemias linfóides agudas**. 2007. 164 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MELLO, Mariana Rezende Bandeira. **Avaliação imunofenotípica, estudo de índice de DNA e de alterações moleculares em células blásticas de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda diagnosticados na Fundação Hemope.** 2007. 69 f. Dissertação (Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MESQUITA, Débora Rabello. **Diagnóstico citogenético e molecular das alterações genéticas recorrentes em leucemias da infância, no Distrito Federal.** 2009. 133 f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MOORMAN, A. V. et al., **A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric lymphoblastic leukemia.** Blood, vol. 124, nº 9, pag. 1434 – 1444, 2014.

National Cancer Institute – NIH. Surveillance, epidemiology and end results program. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016.

OLIVEIRA, Solange. **Perfil clínico-epidemiológico das crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda (LLA) em um hospital pediátrico de Fortaleza – CE.** 2008. 80 f. Dissertação (Curso Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

PEREIRA, Waldir Veiga. **Aspectos epidemiológicos, biotipologia e evolução do tratamento da leucemia linfocítica aguda na infância e adolescência no Rio Grande do Sul.** 2010. 303 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OSKARSSON, T., et al. **Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome.** Haematologica, vol. 101, nº 1, pag. 68 – 76, 2016.

PAULA, F. D. F. et al. **Comparison between qualitative and real-time polymerase chain reaction to evaluate minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter, vol. 37, nº 6, pag. 373 – 380, 2015.

QUEIROZ, D. A. **Estudo do perfil da expressão gênica global em leucemias linfoides agudas de linhagens de células B e T.** 2004. 83 f. Dissertação (Instituto de Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

QUIXABEIRA, V. B.; SADDI, V. A. **A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão de literatura.** Revista Brasileira de Análises Clínicas, vol. 41, nº3, 199 – 202, 2008.

ROSE, K.; WALSON, P. D. **The contributions of the European Medicines Agency and its pediatric committee to the fight against childhood leukemia.** Risk Management and Healthcare Policy, vol. 8, pag. 185 – 205, 2015.

SU, Y. L. et al. **Clinical characteristics of acute lymphoblastic leukemia in male and female patients: a retrospective analysis of 705 patients.** Oncology Letters, vol. 10, pag. 453 – 458, 2015).

TORRECILHAS, A.; ALVES, M.; COLLI, W. **Anticorpos como ferramentas biotecnológicas.** In: ULRICH, H. et al. Bases moleculares da biotecnologia. São Paulo: Roca, 2008, 218 p.

Van der BERG, H.; Van der LELIE, J. **Acute lymphoblast leukaemia in puberty and adolescence.** Ann Oncol, vol. 11, nº 11, pag. 1375 – 1379, 2000.

Van DONGEN, J. J. M. et al. **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.** Leukemia, vol. 13, nº 12, pag. 1901 – 1928, 1999.

Van DONGEN, J. J. M. et al. **Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast and standardized technologies.** Blood, vol. 125, nº 26, pag. 3996 – 4009, 2015.

SCRIDELI, C. A.; TONE, L. G. **Qualitative polymerase chain reaction versus quantitative polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter, vol. 37, nº 6, pag. 366 – 368, 2015.