



UNICAMP

# EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS TUMORAIS EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA: UMA BASE PARA IMUNOTERAPIA

Aluno: Fernando Salvetti Valente  
Orientador: Sara Teresinha Ollala Saad



## INTRODUÇÃO

O entendimento de que existe uma resposta imune específica aos antígenos tumorais levando à destruição das células malignas, a identificação de antígenos associados a tumores e os recentes avanços no entendimento de eventos celulares que levam à imunidade mediada pela célula T abriram novas perspectivas para o tratamento de pacientes com neoplasias, em particular com LMA. Dentro desse contexto, alguns antígenos são particularmente importantes: WT1, RHAMM, PRAME, G250 e Survivina. Todos eles contribuem, de alguma forma, para o curso bem-sucedido da doença. É factível a diferenciação de células mononucleares de sangue periférico em células dendríticas em laboratório, capazes de expressar e, consequentemente, apresentar a linfócitos T, todos os antígenos ligados à leucemia e presentes em um determinado paciente. A busca de novos tratamentos para LMA faz-se necessária em vista da incapacidade de alternativas consagradas, como a quimioterapia, de gerarem remissão completa duradoura. É fundamental o uso de tratamentos adjuvantes, que busquem manter os pacientes livres de doença. O objetivo do presente trabalho é verificar a expressão dos antígenos PRAME, RHAMM, WT1, G250 e Survivina em pacientes com LMA do Hemocentro-Unicamp, para uso em futuro tratamento imunoterápico adjuvante empregando-se células dendríticas autólogas em pacientes em remissão completa.

## METODOLOGIA

RT-PCR em tempo real: As amostras de RNA total, contendo 5 µg de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA com uso da enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen). Amplificação em tempo real foi realizada no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Um par de iniciadores específico para a amplificação de cada um dos cinco genes foi padronizado e utilizado para as reações. A expressão de HPRT foi utilizada como controle endógeno. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. Cada reação foi repetida duas vezes no mesmo experimento.

## RESULTADOS

• Treinamento da técnica de PCR em tempo real utilizando WT1 e PRAME e linhagens de célula: Jurkat, HS27, Molt4 e P39. Curvas de Melt (Figura 1) e Curva de amplificação (Figura 2).

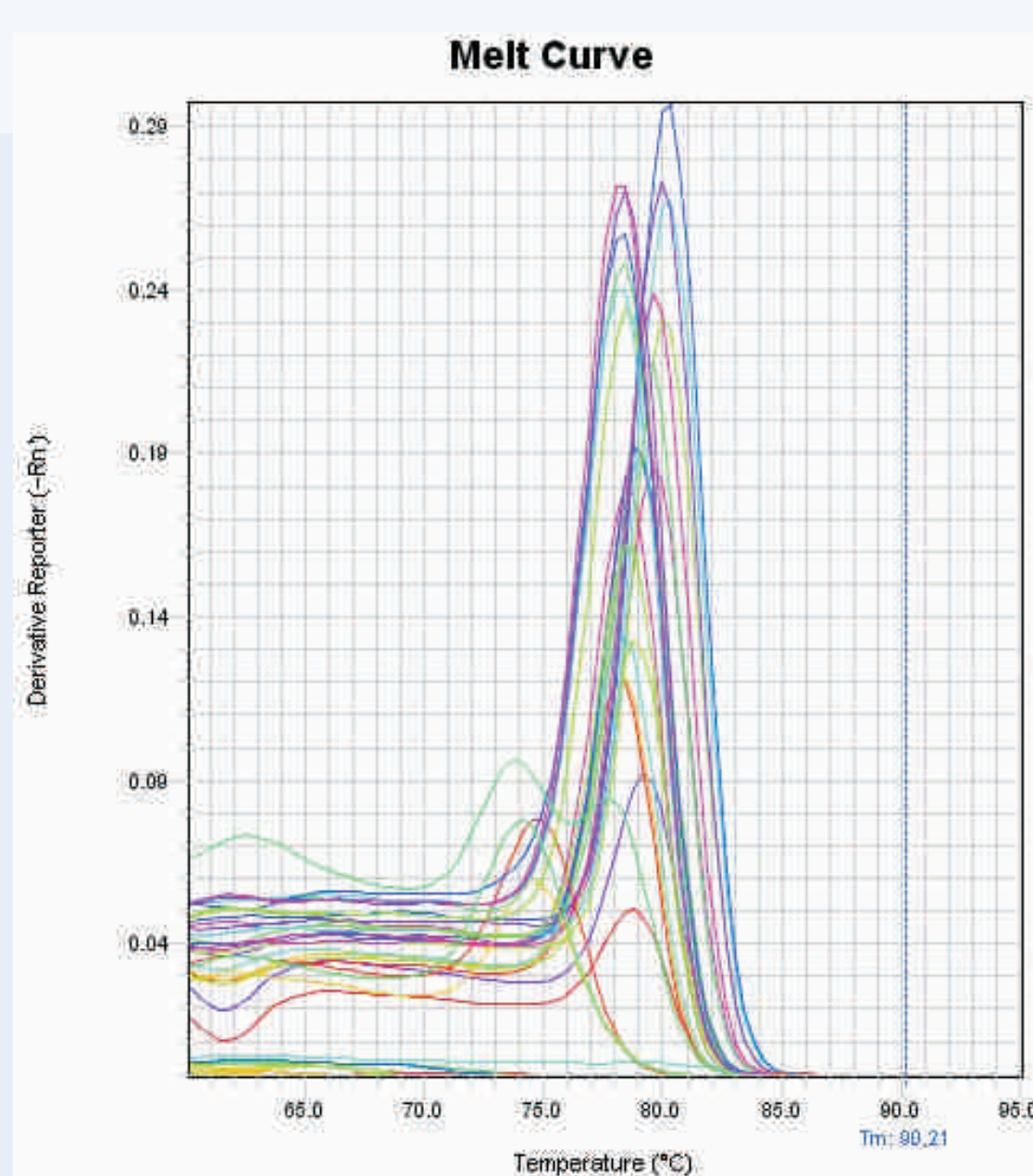


Figura 1: Curva de melt

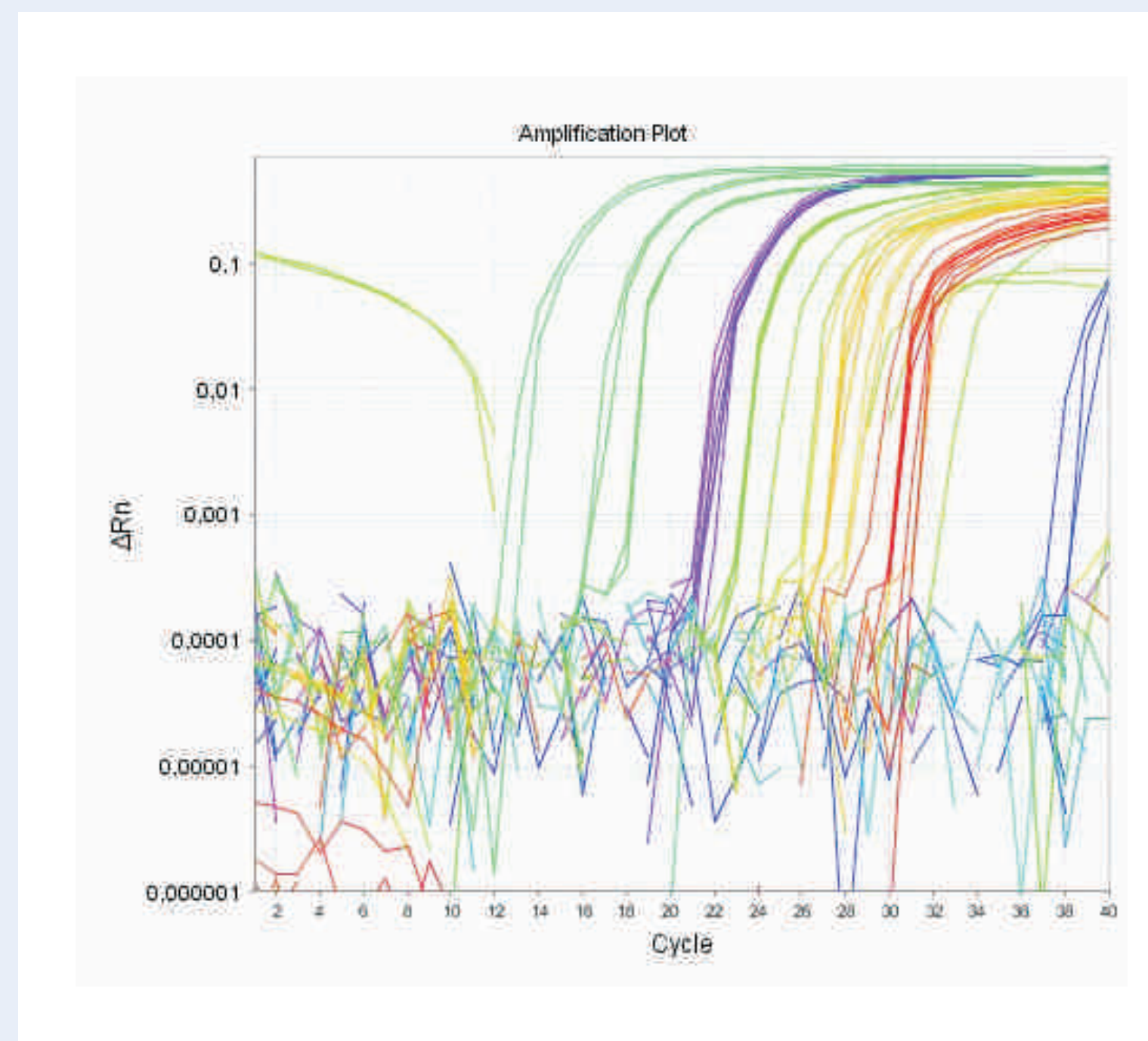


Figura 2: Curvas de amplificação

- Padronização dos 3 primers que não existiam no laboratório (encomendados).
- Curvas de eficiência desses primers. As curvas de eficiência são feitas variando-se a quantidade de cDNA e mantendo-se as concentrações dos primers obtidas na etapa anterior. A eficiência ideal é de 100 por cento com valores toleráveis de 10 por cento a mais ou a menos. Curvas de eficiência de RHAMM, G250 e Survivina (Figuras 3, 4 e 5).

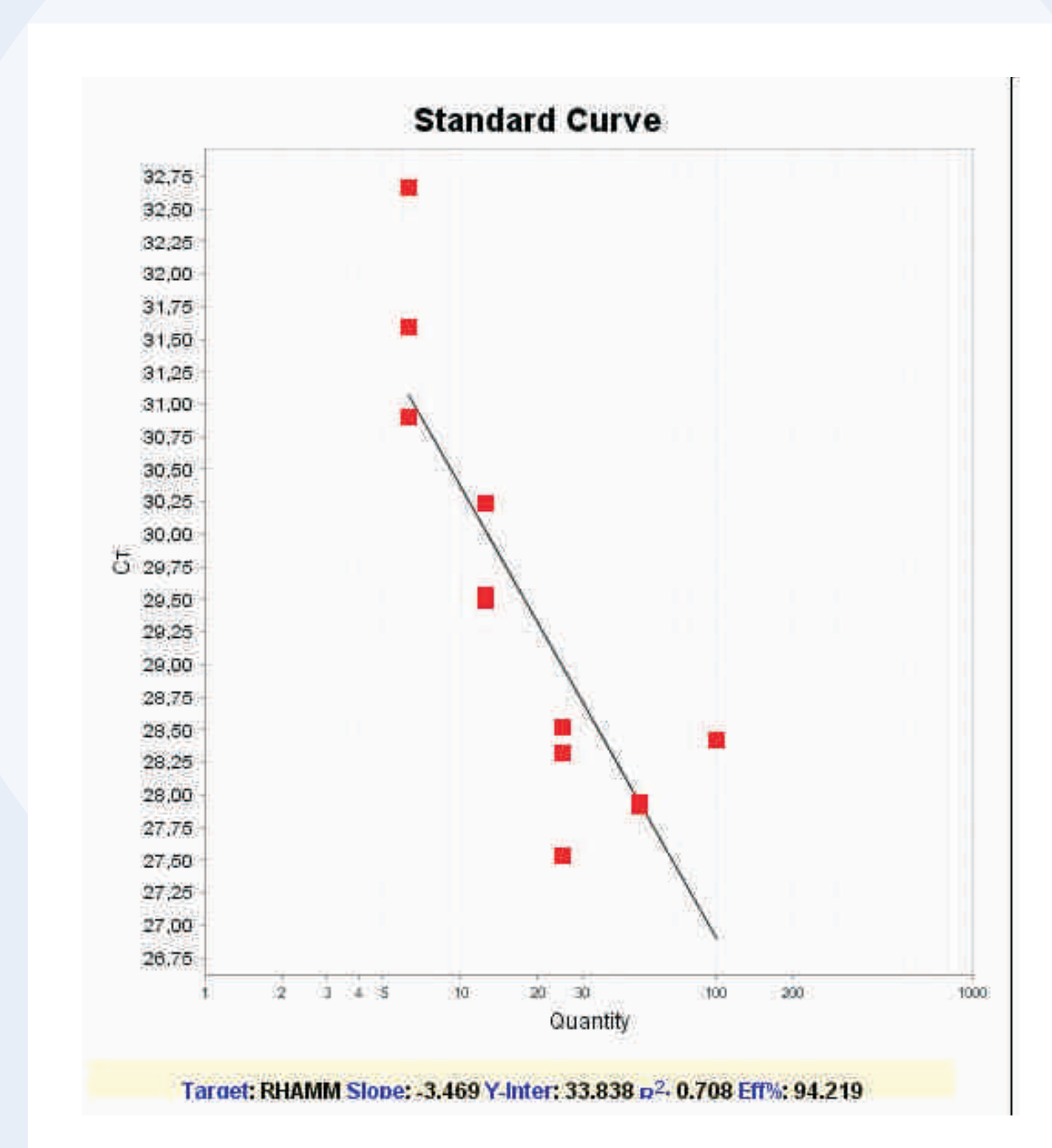


Figura 3: Curva de eficiência de RHAMM

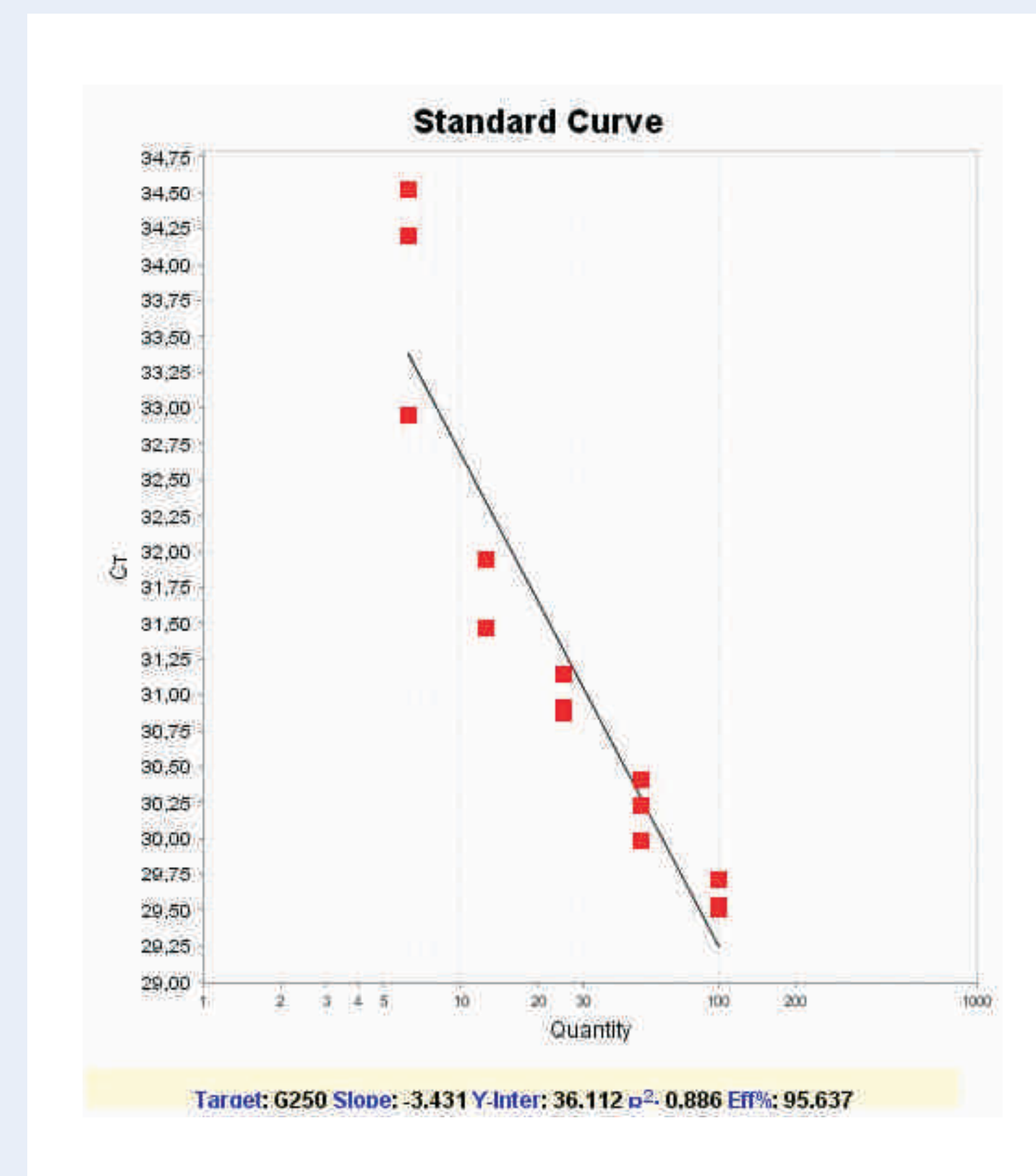


Figura 4: Curva de eficiência de G250

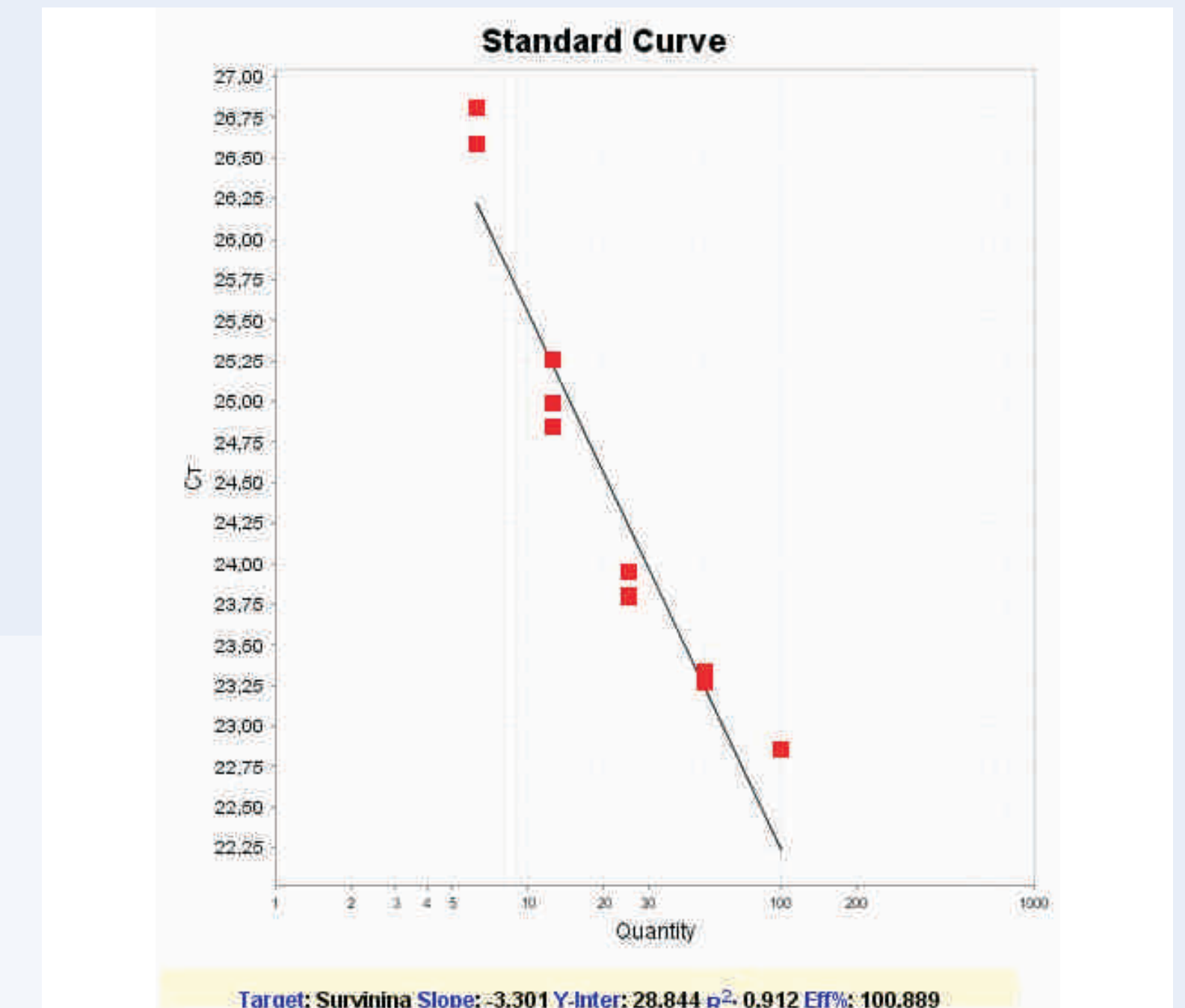


Figura 5: Curva de eficiência de Survivina

- Início do trabalho com as amostras de RNA de pacientes do Hemocentro com LMA: Transcrição reversa, PCR convencional e RT-PCR.

### Transcrição reversa e PCR convencional:

Pelo fato de as amostras dos pacientes serem de RNA, foi necessária a realização de transcrição reversa e PCR convencional antes da etapa do PCR Real Time. Se, na etapa de PCR convencional, houver amplificação, significa que a transcrição reversa funcionou. Essa amplificação se verifica na eletroforese em gel de agarose.

### RT-PCR:

Verificação da expressão dos genes WT1, PRAME, G250, RHAMM e Survivina

Expressão gênica em 5 amostras (Figura 6)

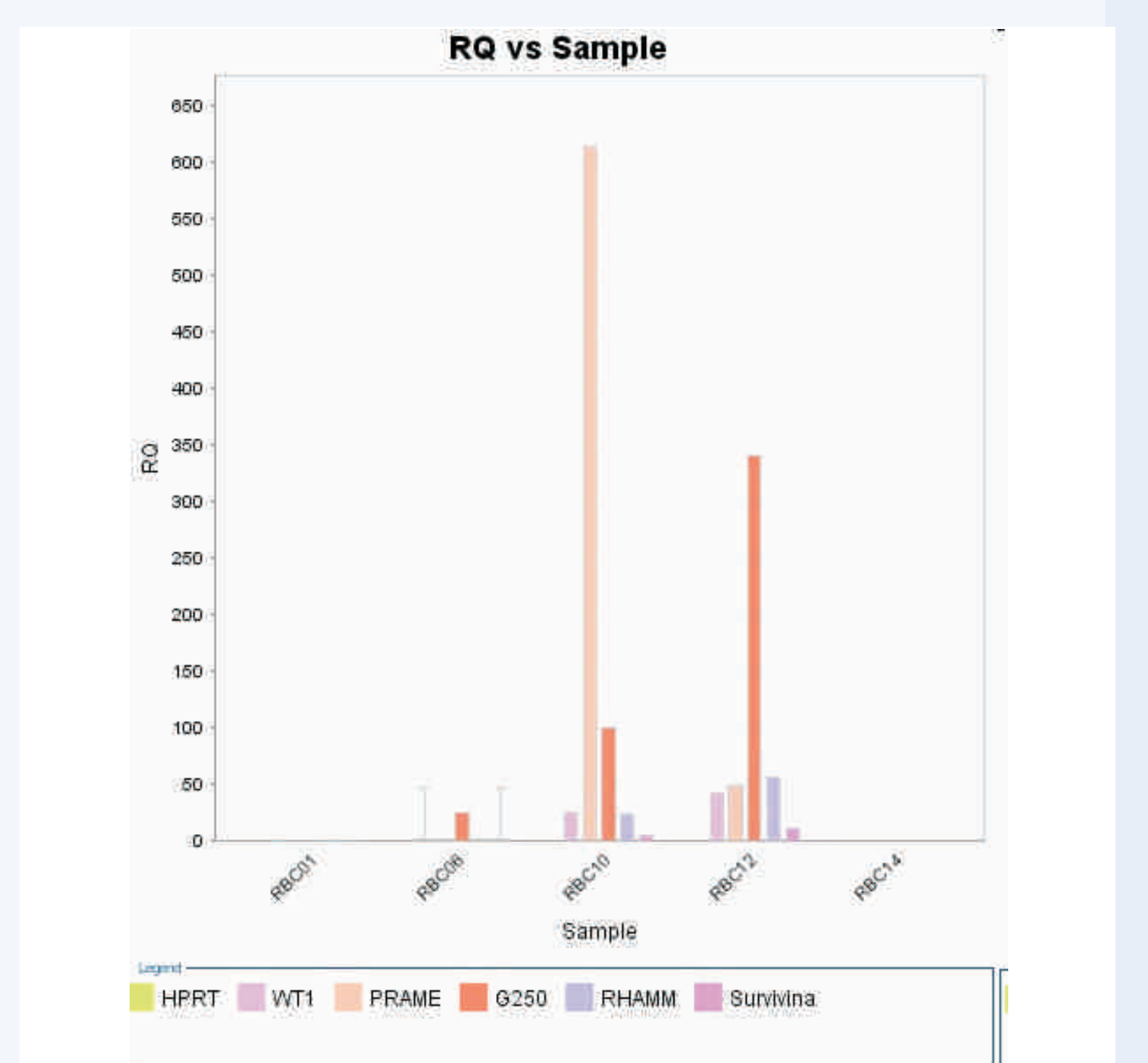


Figura 6: Expressão gênica em 5 amostras de pacientes. HPRT é controle. Percebe-se que nenhuma das amostras expressou o gene HPRT, o controle, apesar de ser notadamente muito expresso em tecidos animais. Provavelmente a qualidade do Primer utilizado nesse experimento específico não estava muito boa. Apesar disso, três das cinco amostras expressaram pelo menos um dos genes pesquisados, sendo que duas delas expressaram todos.

## CONCLUSÃO

Verificou-se que, das cinco amostras estudadas até o momento, houve expressão dos genes procurados em três. Duas delas expressaram todos eles. Esse parece ser um resultado promissor no que diz respeito à aplicação de diferentes imunoterapias que tenham esses genes como alvo. Isso parece ser ainda mais certo nas duas amostras que apresentaram expressão de todos os genes. A utilização de mais de um deles garantiria melhores resultados. Em outros trabalhos já foi verificada a expressão de todos esses genes, separadamente, mas, até agora, não havia um estudo da expressão de todos concomitantemente.