Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências de Botucatu

Henrique Aldar

Padronização e implementação da Técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu e correlação da presença do transcrito bcr-abl nos pacientes com doença mieloproliferativa crônica.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Orientadora: Dra. Paula de Oliveira Montandon Hokama

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Aldar, Henrique.
Padronização e implementação da técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu e correlação da presença do transcrito bcr-abl nos pacientes com doença mieloproliferativa crônica / Henrique Aldar. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008
Orientadora: Paula de Oliveira Montandon Hokama

1. Biologia molecular 2. Hematologia 3. Mieloma

Palavras-chave: Biologia Molecular; BCR-ABL; DMPCr; JAK2V617F; Padronização

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família. Ao meu pai, sempre racional, mas nem por isso deixando de ser afetuoso, que sempre esteve ao meu lado incentivando e dando todo o apoio não só financeiro como também emocional, pontos fundamentais para o objetivo alcançado. À minha mãe, levada mais pela emoção, que sempre soube usar a palavra certa em momentos cruciais, promovendo injeção de ânimo chave para esta longa caminhada de quatro anos. E à Mayra, minha irmã encrenqueira, porém presente em grande parte desta trajetória fantástica tornando este processo muito mais divertido e prazeroso, disposta a todo instante a “arrumar” algum programa que aliviasse minha tensão e fizesse com que eu abstraísse um pouco da responsabilidade.

Agradecimentos

Sou muito grato à Dra. Paula, pessoa que me deu a oportunidade de realizar este trabalho e esteve sempre presente durante o ano, não só para a iniciação científica mas em momentos particulares de angústia, acolhendo com um ombro amigo e palavras confortadoras.

Agradeço às meninas do laboratório: Ju Cappanacci, Camila, Patrícia, Chiara e Bete, por aturar este trapalhão que por um ano perturbou todas vocês mas é muito grato. Tudo que eu sei de prática em biologia molecular devo a essas pessoas incríveis, que também me ensinaram o que é fazer parte de um grupo e que todos os membros deste grupo estão dispostos a promover o bem-estar de um de seus integrantes.

Quero deixar um “abraço daqueles de amassar a roupa” a todas as pessoas fantásticas que conheci durante esses quatro anos e que de alguma forma marcaram minha vida. Não vou citar nomes (não caberiam todos e mesmo assim esqueceria de alguém) mas generalizarei: um abraço aos ex-companheiros da saudosa Rep. Iglu, ao povo de casa, aos membros da família Só-Kanela e Vira-Lata, à mulecada da Física Médica, à todos que já passaram e ainda fazem parte da Atlética Geral e da IBEC, e à “bombástica” Bombateria (minha criança, que entrego com muitas lágrimas mas muito orgulho, a amigos que sabem o que é rasgar as mãos remando contra a maré e mesmo com baquetas embebidas em sangue não desistem de tocar, cada vez com mais força, apenas com o intuito de ver essa linda nação laranja pular e cantar eufórica).

Ao quinteto eu não tenho o que falar. Palavras não expressariam o quanto essas pessoas foram, são e para sempre serão fundamentais na minha existência.

Ah, e é claro, ao “strogonoff” da Tia Lúcia! Quem não conhece não sabe o que está perdendo...

ÍNDICE

1. Introdução.....8
2. Objetivos.....14
3. Pacientes e Métodos.....15
- Pacientes.....15
- Coleta de Sangue Periférico.....15
- Lise e Extração de DNA (TKM-1 e TKM-2).....16
- Extração de RNA de sangue periférico através do Q1Aamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN).....21
- Leitura de Amostras no NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.....25
- Substituição do gel de agarose por gel de poliacrilamida na pesquisa de mutação JAK2V617F.....28
- Preparação de gel de Poliacrilamida.....29
- Alternativa para banir o uso de Brometo de Etídio na pesquisa de mutação JAK2V617F.....30
- Gel de policrilamida corado por Prata.....31
- Coloração de gel de poliacrilamida por Prata.....32
4. Resultados e Discussão.....34

5. Conclusões.....40
6. Referências
Bilbliográficas.....41

Introdução

JAK2V617F:

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPCr) constituem um grupo de doenças que têm vários aspectos em comum. Dentre eles, podemos citar o fato de corresponderem a uma proliferação clonal de elementos hemopoéticos totipotentes e apresentarem aspectos histológicos que freqüentemente se sobrepõem. Por outro lado, cada um dos tipos de DMPCr apresenta particularidades biológicas, clínicas e de evolução. São DMPCr, a leucemia mielóide crônica (LMC) que representa aproximadamente 25,5% das DMPCr, a policitemia Vera (PV) representa 38,5% , a trombocitemia essencial (TE) 11% dos casos e a mielofibrose primária (MF) que representa aproximadamente 25% das DMPCr (Spivak, Barosi e Tognoni et. al., 2003).

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPCr) são um grupo heterogêneo de doenças nas quais ocorre aumento da produção de uma ou mais linhas hematopoiéticas proveniente de alteração provocada a nível de stem cell multi-potente. Desde a descoberta de uma mutação pontual no exon 12 do gene JAK2 (troca de uma guanina por uma timina), a qual leva à troca do aminoácido valina por uma fenilalanina na posição 617 da proteína (V617F), estudos têm investigado a presença significativa dessa mutação em pacientes com DMPCr.

Uma população de células hematopoéticas tem sido observada em pacientes com policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e metaplasia mielóide com mielofibrose (MMM) indicando que essas doenças são causadas por uma mutação somática adquirida nas células progenitoras hematopoéticas, mas a base genética é ainda desconhecida. Relatos de uma expressão decadente de receptores de trombopoietina em plaquetas de pacientes com PV, e de uma super expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x em PV, sugerem que

anormalidades no sinal de transdução e na apoptose são importantes na patogênese de PV e de outras doenças mieloproliferativas. Além disso, mutações nos receptores de eritropoietina e na proteína “von Hippel-Lindau” têm sido identificadas em um subgrupo de pacientes com policitemia familiar e congênita, mas esses genes não têm sido associados patogeneticamente à PV esporádica ou outros tipos de doenças mieloproliferativas.

Em contraste com PV, TE e MMM, a patogênese molecular de várias outras doenças mieloproliferativas têm sido bem descritas, e são frequentemente atribuídas a mutações que resultam em ativação constitutiva de uma proteína tirosina quinase. Logo, essas quinases mutantes têm se mostrado bons candidatos, sendo alvos para a terapia molecular. O paradigma instaurado por Druker e colaboradores consiste no rearranjo do gene BCR-ABL associado com leucemia mielóide crônica, o qual é eficazmente tratado com imatinib (Gleevec), inibidor de pequena molécula tirosina quinase. Além do ABL, imatinib inibe também membros da família PDGFR, o que tem levado ao tratamento efetivo de pacientes com rearranjos PDGFRB e leucemia mielomonocítica crônica e pacientes com fusão FIP1L1-PDGFRA e síndrome hipereosinofílica.

Esses dados sugerem a hipótese de que mutações em tirosinas quinases são importantes na patogênese de PV, TE e MMM. Levine et al., 2005 demonstrou que pacientes com TE e MMM possuem uma mutação somática recorrente na tirosina kinase JAK2. JAK2 é uma tirosina quinase citoplasmática com papel chave na transdução de sinal de receptores de múltiplos fatores de crescimento hematopoeticos, sendo assim um gene alvo atraente para inibição. Inibição da quinase JAK2V617F leva à inibição da proliferação de células hematopoeticas, sugerindo que a tirosina quinase JAK2 é um alvo em potencial para inibição farmacológica em pacientes com PV, TE ou MMM.

Cromossomo Filadélfia (BCR-ABL):

O clássico gene BCR-ABL é resultado da fusão de duas partes normais dos genes : ABL localizado no cromossomo 9 e o gene BCR no cromossomo 22. Ambos os genes são expressos em tecido normal, mas a função precisa dos mesmos ainda não está definida. A fusão destes genes origina o oncogene BCR-ABL, a quebra no ABL ocorre no exon a2 e simultaneamente ocorre a quebra no BCR na região denominada de major breakpoint cluster. Como resultado, a porção 5' do gene BCR e a porção 3' do ABL estão justapostas no cromossomo 22 (cromossomo Filadélfia – cr Ph).

O cromossomo Ph está presente em 90% a 95% dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), em 20% a 30% de portadores de leucemia linfoblástica aguda (LLA) do adulto e em 2% dos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA).

As alterações moleculares que culminam com o aparecimento do cromossomo Filadélfia são ligeiramente diferentes de acordo com cada tipo de leucemia. Na leucemia mielóide crônica a fusão do gene BCR e ABL podem resultar em dois tipos de mRNA quiméricos com cerca de 8,5 Kb: um com o exon 13 do gene BCR ligado ao exon 2 do gene ABL, conhecido formalmente como b2a2 (e13a2) e outro com o exon 14 do gene BCR ligado ao exon 2 do gene ABL (e14a2), conhecido como b3a2. Estes dois produtos diferem em 75 pares de base (pb) que correspondem ao tamanho do exon b3, o qual apresenta um splicing alternativo.

Na leucemia linfoblástica aguda e na leucemia mielóide aguda cromossomo Filadélfia positivo o exon 1 do gene BCR se une ao exon 2 do gene ABL (b1a2), resultando em um RNA mensageiro de 7,0 Kb. Nas leucemias agudas o ponto de quebra do gene BCR é denominado

minor breakpoint cluster region (m-bcr) e a proteína quimérica resultante possui 190 Kd.

O potencial leucemogênico da oncoproteína BCR-ABL está relacionado à atividade tirosina-quinase, que, constitutivamente, é controlada pela proteína ABL, que se exacerba com a justaposição da seqüência "estranha" do gene BCR. O gene BCR age promovendo a dimerização da oncoproteína, assim como das duas moléculas adjacentes BCR-ABL, fosforilando cada uma nos resíduos tirosina em seu LOOP quinase ativado.

A atividade quinase descontrolada do BCR-ABL substitui a função fisiológica normal da enzima ABL interagindo com uma variedade de proteínas efetoras que resultam na desregulação da proliferação celular, diminuem a aderência das células leucêmicas ao estroma da medula óssea e reduzem a resposta apoptótica ao estímulo mutagênico, acarretando em uma proliferação clonal descontrolada.

A tirosina-quinase codificada pelo domínio homologo 1 do SRC (SH1) do componente ABL do BCR-ABL é indubitavelmente o ponto crucial da transformação oncogênica.

Ao fim da década de 80, os conhecimentos acumulados sobre o mecanismo de ação do BCR-ABL foram suficientes para dar início a experimentos com desenhos de moléculas-alvo a serem usadas no tratamento das leucemias cr Ph1 positivas. A partir do conhecimento de que a tirosina-quinase é a porção efetora da oncoproteína, é evidente que sua inibição seria o alvo mais atraente como estratégia terapêutica. A meta era desenhar um pequeno composto químico que competiria com o ATP se ligando no sítio de domínio quinase. Assim, com esse sítio ocupado por uma molécula ATP like não seria possível prover nenhum grupamento fosfato para a transferência do substrato.

Com isto, os resíduos tirosina permanecer-se-iam na forma "não fosforilada" e o substrato protéico não seria capaz de mudar sua conformação para que fosse possível sua associação com os efetores

que se seguem. Acarretando na interrupção dos sinais oncogenéticos para o núcleo da célula.

Sendo evidente a importância desta mutação BCR-ABL, o emprego de técnicas moleculares como a Polymerase Chain Reaction (PCR) tem sido de grande importância no diagnóstico e seguimento no curso do tratamento das referidas patologias.

A PCR permite a amplificação de pequenas seqüências do DNA através do uso de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que flanqueiam a região alvo e uma alternância de temperaturas que permite a desnaturação da dupla fita, anelamento dos “primers” e extensão da cópia realizada pela Taq DNA polimerase.

Através da PCR, utilizando “primers” estrategicamente desenhados, pode-se evidenciar a existência do gene quimérico BCR-ABL, em pacientes diagnosticados com LMC, LLA e LMA, inclusive no que se refere ao ponto de quebra no cromossomo 22 (M-bcr, m-bcr ou µ-bcr) o que é de grande relevância clínica, uma vez que essas patologias apresentam diferentes graus de agressividade e exigem diferentes condutas médicas.

Entretanto, a PCR amplifica até 2 kilobases (Kb). Como os genes envolvidos na t(9;22) possuem grandes “introns” com extensão de 200 Kb, torna-se inviável a amplificação direta do DNA.

Dessa forma, faz-se necessária a extração de RNA da amostra e a síntese de DNA complementar (cDNA) ao mRNA quimérico, por um processo de transcrição reversa. Após esse processo, o fragmento é amplificado pela PCR e a presença de 1 célula tumoral em 100 mil a 1 milhão de células normais pode ser detectada.

O trabalho a seguir visa implementar e padronizar a técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F, promovendo a autonomia do HC da Unesp de Botucatu para a realização deste exame. Busca também investigar a presença da JAK2V617F nos pacientes com DMPCr

acompanhados neste HC. Um terceiro ponto a ser estudado é a correlação da mutação JAK2V617F e da translocação BCR-ABL concomitante em um mesmo indivíduo, paciente com DMPCr deste HC.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Padronização e implementação da técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu.

- Pesquisa da mutação JAK2V617F nos pacientes com DMPCr acompanhados no HC da Unesp de Botucatu.

- Buscar correlacionar o gene BCR-ABL e a mutação JAK2V617F num mesmo indivíduo, portador de DMPCr.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes:

Foram avaliados 18 pacientes para a pesquisa de JAK2V617F e 34 pacientes para a translocação BCR-ABL, acompanhados pelo serviço de quimioterapia do HC da Unesp de Botucatu. Todos os pacientes eram portadores de DMPCr. Pacientes positivos para qualquer um dos dois testes citados acima eram submetidos à outra avaliação buscando indivíduos que apresentassem ambas características avaliadas.

Coleta de Sangue Periférico

- Coletar de 3 a 5 mL de sangue periférico (SP) de cada paciente em tubo de hemograma contendo 3 gotas de anticoagulante EDTA 6% para SP.
- Após a coleta do sangue, identificar o tubo e homogeneizar por inversão.
- Manter o material armazenado a 4^{o}C até que seja manipulado.
- Os processos de extração do DNA e RNA devem ser feitos até 5 horas após a coleta do SP.

Lise e Extração de DNA (TKM-1 e TKM-2)

Preparo dos reagentes que serão utilizados na lise e na extração e os que serão utilizados para fazer os tampões TKM-1 e TKM-2

- Tris HCl 2 M pH 7,6 (100 mL)

  P.M.=157,64

  157,64 g ---------- 1000 mL

  X g ---------- 100 mL

  X = 15,77 g (1 M)

  2 M= 31,53 g de Tris + 100 mL de H_2O

- KCl 1 M (100 mL)

  P.M.=74,55

  74,55 g ---------- 1000 mL

  X g ---------- 100 mL

  X = 7,46 g de KCl + 100 mL de H_2O

- $MgCl_2$ 1 M (100 mL)

  P.M.=203,30

  203,30 g ---------- 1000 mL

  X g ---------- 100 mL

  X = 20,33 g de $MgCl_2$ + 100 mL de H_2O

- EDTA 0,2 M (500 mL)

  P.M.=372,24

  372,24 g ---------- 1000 mL

  X g ---------- 500 mL

  X = 186,12 g (1M)

  0,2 M= 37,22 g de EDTA + 500 mL de H_2O

- NaCl 5 M (100 mL)

  P.M.=58,44

  58,44 g ---------- 1000 mL

  X g ---------- 100 mL

  X = 5,85 g (1 M)

  5 M= 29,22 g de NaCl + 100 mL de H_2O

♦Autoclavar todas as soluções

TKM-1 (Tampão) – 500 mL

10 mM Tris HCl pH 7,6: 10 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 2 mM EDTA

♦Tris HCl 10 mM pH 7,6

X mL . 2 M = 500 mL . 10 mM

X mL . 2000 mM = 500 mL . 10 mM

X = 2,5 mL de Tris HCl 2 M pH 7,6

♦KCl 10 mM

X mL . 1 M = 500 mL . 10 mM

X mL . 1000 mM = 500 mL . 10 mM

X = 5 mL de KCl 1 M

♦$MgCl_2$ 10 mM

X mL . 1 M = 500 mL . 10 mM

X mL . 1000 mM = 500 mL . 10 mM

X = 5 mL de $MgCl_2$ 1 M

♦EDTA 2 mM

X mL . 0,2 M = 500 mL . 2 mM

X mL . 200 mM = 500 mL . 2 mM

X = 5 mL de EDTA 0,2 M

♦2,5 mL de Tris + 5 mL de KCl + 5 mL de $MgCl_2$ + 5 mL de EDTA + 482,5 mL de H_2O

TKM-2 (Tampão)

10 mM Tris Hcl pH 7,6: 10 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 2 mM EDTA; 0,4 M NaCl

♦Tris HCl 10 mM pH 7,6

X = 2,5 mL de Tris HCl 2 M pH 7,6

♦KCl 10 mM

X = 5 mL de KCl 1 M

♦ $MgCl_2$ 10 mM

X = 5 mL de $MgCl_2$ 1 M

♦ EDTA 2 mM

X = 5 mL de EDTA 0,2 M

♦ NaCl 0,4 M

X mL . 5 M = 500 mL . 0,4 M

X = 40 mL de NaCl 5 M

♦ 2,5 mL de Tris + 5 mL de KCl + 5 mL de $MgCl_2$ + 5 mL de EDTA + 40 mL de NaCl + 442,5 mL de H_2O

NH_4Cl 0,144 M

♦ 3,850 g de cloreto de amônia + 500 mL de H_2O

NH_4HCO_3 0,01 M

♦ 0,79 g de bicarbonato de amônia + 1000 mL de H_2O

Lise

♦ Centrifugar o tubo de hemograma por 10 minutos a 2000 rpm;

♦ Preparar a solução de lise, contendo 9 partes de NH_4Cl 0,144M para 1 parte de NH_4HCO_3 0,01M;

♦ Desprezar o plasma com pipeta “Pasteur” estéril;

♦ Adicionar 2V da solução de lise no tubo;

♦ Homogeneizar por inversão até que todas as células se descolem do fundo do tubo;

♦ Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (invertendo o tubo algumas vezes a cada 3 minutos);

♦ Centrifugar por 10 minutos a 2000rpm;

♦ Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur ou por inversão;

♦ Adicionar 1 mL da solução de lise no tubo;

♦ Homogeneizar gentilmente com a pipeta até que as células se descolem do fundo do tubo;

♦ Transferir essa mistura para um tubo de 2mL;

♦ Centrifugar por 2 minutos a 4000 rpm;

♦ Desprezar o sobrenadante;

♦ Adicionar 1 mL da solução de lise;

♦ Agitar no vortex (em velocidade 5) até que o pellet se dissolva;

♦ Centrifugar por 2 minutos a 4000rpm;

♦ Desprezar o sobrenadante;

♦ Repetir as etapas de “adicionar solução de lise, agitar no vortex e centrifugar” por mais 2 vezes ou até que o pellet formado fique limpo;

♦ Adicionar 0,5 mL do tampão TKM-1;

♦ Agitar no vortex rapidamente;

♦ Centrifugar por 1 minuto a 4000 rpm;

♦ Remover o sobrenadante tomando cuidado para não desprezar o pellet;

♦ Estocar a -20°C até manipulação.

Extração

♦ Aguardar o descongelamento do pellet;

♦ Adicionar 0,8 ml de TKM-2 e 50 µl de SDS a 10%;

♦ Misturar bem com o auxílio da pipeta Pasteur;

♦ Incubar 1h a 55°C;

♦ Preparar etanol 70% e manter na geladeira (1 mL por amostra);

♦ Adicionar 360 µl de NaCl 5M, misturando bem;

♦ Centrifugar por 5 min a rotação máxima em microcentrífuga;

♦ Transferir o sobrenadante para um tubo de hemólise;

♦ Adicionar 2V de etanol absoluto gelado;

♦ Inverter por várias vezes o tubo até a precipitação do DNA;

♦ “Pescar” o DNA precipitado com o auxílio de alça estéril e transferi-lo para um tubo Eppendorf de 2 mL;

♦ Adicionar 1 ml de etanol 70% gelado;

♦ Centrifugar por 2 minutos a rotação máxima e desprezar o sobrenadante com o auxílio da pipeta Pasteur;

♦ Secar o pellet a temperatura ambiente (preferencialmente overnight);

♦ Ressuspender o DNA em 50µl de água;

♦ Aquecer em termobloco por 15 minutos, agitando a cada 5 minutos;

♦ Deixar o DNA a 4°C por aproximadamente 1 hora;

♦ Armazenar a -20°C.

Extração de RNA de sangue periférico através do Q1Aamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

1ª. Etapa

1. Logo após a chegada da amostra no laboratório de biologia molecular, centrifugá-la em equipamento refrigerado com rotor para tubos de hemograma
2. Centrifugar o tubo de sangue por 7 minutos a 3500 rpm a 4°C
3. Descartar o sobrenadante (plasma) com o uso de pipeta Pasteur descartável e estéril
4. Preencher o tubo com Buffer EL (lise de hemácias)
5. Misturar no agitador (por cerca de 15 segundos) e por inversão, batendo com o dedo no fundo do tubo, e incubar no gelo por 10 a 15 minutos. Agitar por duas vezes durante a incubação
6. Centrifugar por 10 minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada (4ºC)
7. Descartar o sobrenadante invertendo o tubo, se enchergar o pellet. Se não, tirar o sobrenandante com a ajuda de pipeta pauster deixando um pouco do lisado no fundo do tubo.
8. Adicionar ao pellet mais 1000μL do Buffer EL e ressuspender com a ajuda da pipeta. Transferir a mistura para um tubo eppendorf de 2mL identificado
9. Centrifugar por mais 10 minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada (4ºC)
10. Retirar o sobrenadante e adicionar mais 1000μL de Buffer EL. Agitar no vortex.
11. Centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (4°)
12. Retirar o sobrenadante e tentar limpar o pellet, caso ainda esteja sujo, com pequenas “baforadas” com a pipeta. Tomar cuidado para não deixar restos de tampão e nem perturbar o pellet.

13. Observar o tamanho do pellet obtido para definir o quanto de Buffer RLT + β-ME deverá ser utilizado
14. Para amostra com pellet pequeno, ocupando cerca de até 1/6 do fundo do tubo, utilizar 350μL de Buffer RLT com β-ME. Para amostra com quantidade grande ou razoável, com o pellet ocupando até 1/3 do fundo do tubo, utilizar 600μL do Buffer
15. Com base no volume do pellet observado, preparar a solução de lise de brancos
16. Retirar o sobrenadante e adicionar 350μL ou 600μL de Buffer RLT com β-ME. Misturar o lisado com a pipeta ou no agitador até ficar completamente homogêneo. Caso o homogeneizado esteja muito viscoso, dividir a amostra em duas e ajustar o volume de cada alíquota para 600μL com Buffer RLT e β-ME
17. Nessa fase, o homogeneizado pode ser estocado em freezer –80$^{o.}$ C ou prosseguir com os procedimentos da extração

OBS: Solução para lise de leucócitos -Tampão RLT (acompanha o kit) + β-Marcaptoetanol (β-ME), comercialmente encontrado em solução 14,5M

- Deve ser preparado durante a extração e baseado no volume do "pellet" obtido.
- Num tubo do tipo Falcon de 15 ou 50 mL estéril, juntar 10μL de β-ME para cada 1mL de tampão RLT.
- Assim para apenas uma amostra com necessidade de 350 μL do Buffer, preparar: preparar 350 μL de Buffer RLT + 3,5 μL de β-ME.
- Não estocar esta solução preparada.

2^{a} Etapa

Todos os procedimentos realizados a partir daqui podem ser feitos em temperatura ambiente (15-25^{o} C).

Para processar o lisado congelado, deve-se submetê-lo à incubação por 10 minutos a 37^{o}C antes de iniciar o passo 18.

18. Transferir todo o lisado para o tubo coletor com o filtro de cor lilás que acompanha o kit. Para evitar formação de bolhas ou aerosol, ajustar a pipeta p/≥750μL.
19. Centrifugar por dois minutos a 14.000 rpm
20. Descartar o filtro lilás conservando o lisado no fundo do tubo coletor
21. Adicionar etanol 70% (recém preparado) ao homogeneizado lisado. A quantidade de etanol 70% adicionada deve ser proporcional à quantidade de Buffer RLT com β-ME adicionada anteriormente:

    -350μL de etanol 70% para amostra que se adicionou 350μL de Buffer

    -600μL de etanol 70% para amostra que se adicionou 600μL de Buffer

    -Homogeneizar com a pipeta, não centrifugar.

22. Transferir o homogeneizado para o tubo coletor com o filtro branco (volume máximo 700μL). No caso de amostra com volume maior de 700μL, dividi-la em duas alíquotas iguais e passar duas vezes pelo mesmo filtro.
23. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 rpm. No caso de amostra com duas alíquotas, transferir o resto do homogeneizado para o filtro e centrifugar novamente
24. Retire o filtro branco do tubo coletor e o transfira para outro tubo coletor 2mL limpo
25. Adicionar 700μL de Buffer RW1 para lavagem

26. Centrifugar por 15 seg a 10.000rpm
27. Transferir novamente o filtro branco para um novo tubo coletor e adicionar 500μL de Buffer RPE
28. Centrifugar por 15 seg a 10.000rpm
29. Abrir cuidadosamente o tubo com o filtro e adicionar mais 500μL de Buffer RPE. Feche o tubo e centrifugue por 3 minutos a 14.000 rpm
30. Transferir o filtro branco para um novo tubo coletor e centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm para eliminar resíduos de reagentes.
31. Transferir o filtro branco para um tubo eppendorf 1,5mL, identificado com o nome do paciente e data, e adicionar 30 a 80μL de água RNase free para eluir o RNA, tomando cuidado para centralizar bem a aplicação. Quanto mais leucócitos tiverem, mais água adicionar.
32. Centrifugar por 1 a 4 minutos a 10.000 rpm.
33. Descartar o filtro e conservar o tubo de 1,5mL com o RNA
34. Medir a concentração do RNA em espectrofotômetro.

Estocar o RNA em freezer –80^{o}C

Leitura de amostras no NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer

- Leitura de RNA

- Ligar o computador onde está instalado o NanoDrop®
- Abrir o programa ND – 1000 V3.1.2
- Escolher o item [Nucleic Acid]
- Aparecerá uma mensagem em inglês dizendo que será necessário colocar água no pedestal do aparelho para uma primeira limpeza antes de iniciar as leituras do dia. Assim deve-se colocar 2 μL de água de ampola no pedestal do aparelho, abaixar o "braço" do mesmo e clicar em OK.
- Após o desaparecimento da mensagem, limpar o pedestal com um papel macio e que não solte fiapos.
- Colocar 2 μL do blank em que a amostra foi diluída. Clicar em [Blank] no canto esquerdo superior da tela.
- Iniciar a leitura das amostras. Em "Sample Type", escolher RNA-50.
- Identificar as amostras no espaço "Sample ID" para cada leitura.
- Colocar 2μL da amostra de RNA no sensor localizado no pedestal do aparelho, abaixar o "braço" do mesmo e clicar em [Measure]. Após a leitura, limpar o pedestal com papel macio e seco.
- Repetir o procedimento acima para todas as amostras.
- Após realizar a leitura de todas as amostras, clicar em [Show Report] para visualizar os dados gerados:

Sample	ng/μL	A260	260/230	260/280	

D					

- Se quiser imprimir, clicar em [Print].
- O arquivo será salvo automaticamente. Clicar em [EXIT].
- Voltará a tela de leitura. Clicar em [EXIT] para voltar a tela inicial e novamente [EXIT] para sair do programa.

- Leitura de DNA

- Ligar o computador onde está instalado o NanoDrop®
- Abrir o programa ND – 1000 V3.1.2
- Escolher o item [Nucleic Acid]
- Aparecerá uma mensagem em inglês dizendo que será necessário colocar água no pedestal do aparelho para uma primeira limpeza antes de iniciar as leituras do dia. Assim deve-se colocar 2 μL de água de ampola no pedestal do aparelho, abaixar o "braço" do mesmo e clicar em OK.
- Após o desaparecimento da mensagem, limpar o pedestal com um papel macio e que não solte fiapos.
- Colocar 2 μL do blank em que a amostra foi diluída. Clicar em [Blank] no canto esquerdo superior da tela.
- Iniciar a leitura das amostras. Em "Sample Type", escolher DNA-40.
- Identificar as amostras no espaço "Sample ID" para cada leitura.
- Colocar 2μL da amostra de DNA no sensor localizado no pedestal do aparelho, abaixar o "braço" do mesmo e clicar em [Measure]. Após a leitura, limpar o pedestal com papel macio e seco.
- Repetir o procedimento acima para todas as amostras.
- Após realizar a leitura de todas as amostras, clicar em [Show Report] para visualizar os dados gerados:

Sample ID	ng/μL	A260	260/230	260/280	

- Se quiser imprimir, clicar em [Print].
- O arquivo será salvo automaticamente. Clicar em [EXIT].
- Voltará a tela de leitura. Clicar em [EXIT] para voltar a tela inicial e novamente [EXIT] para sair do programa.

Substituição do gel de agarose por gel de poliacrilamida na pesquisa de mutação JAK2V617F

O resultado da técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F, padronizado por Levine e Wadleigh et. al., 2005, era inicialmente revelada em gel de agarose 2%. Sendo o gel de agarose 2% pouco sensível, buscou-se uma alternativa para aumentar a sensibilidade do teste. A intenção desta transição para a poliacrilamida visava reduzir o número de falsos negativos presentes na agarose. O protocolo para preparação do gel de poliacrilamida encontra-se a seguir. Abaixo, gel de poliacrilamida em pesquisa de mutação JAK2V617F apresentando esta maior sensibilidade comprovada por dois pacientes falso negativos na agarose e evidentemente positivos na poliacrilamida.

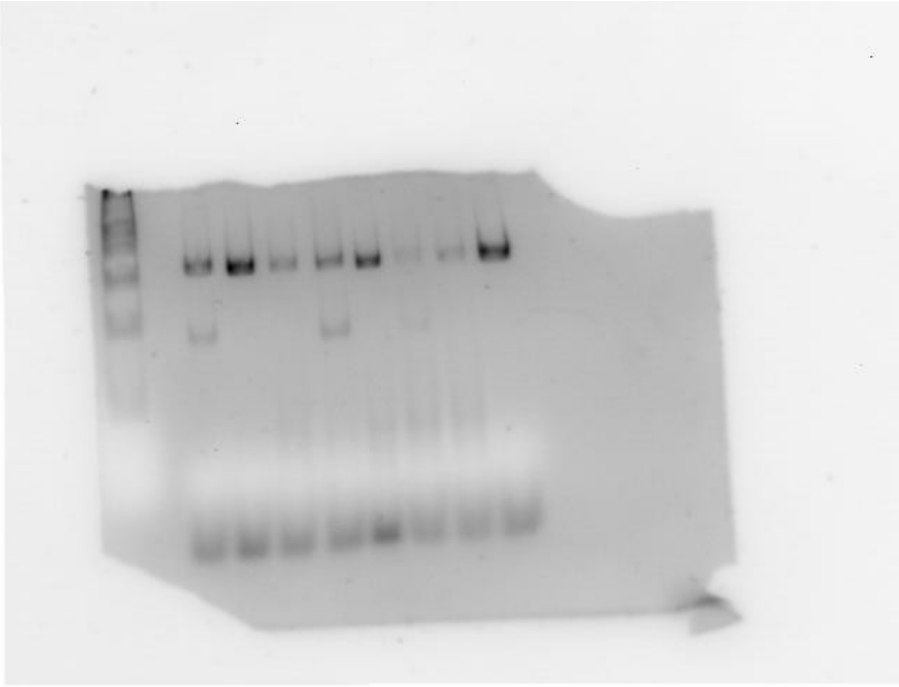


Figura 1: Gel de poliacrilamida esclarecendo falsos negativos provenientes de gel de agarose.

Preparação de Gel de Poliacrilamida

- REAGENTES:

1 – BIS ACRILAMIDA 40 %

- 19g de acrilamida
- 1g N.N. Metilenobisacrilamida
- 50 ml de agua Milli Q

2 – BIS ACRILAMIDA 6%

- 100 ml de TEB 10X
- 150 ml de bis acrilanida 40%
- 750 ml de água Milli Q

3 – PERSULFATO DE AMÔNIO 10% (P.A. 10%)

- 1g de persulfato
- 10 ml de água Milli Q

- PREPARAÇÃO:

1. 70 µl P.A. 10%
2. 7,0 µl TEMED Absoluto (neurotóxico)
3. 7,0 ml de bisacrilamida 6%

Alternativa para banir o uso de Brometo de Etídio na pesquisa de mutação JAK2V617F

O Brometo de Etidio é uma substância altamente mutagênica comumente utilizada para a coloração de géis em biologia molecular, sendo um corante fluorescente para ácidos nucléicos em eletroforeses. No processo de padronização da técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F, era essa a substância utilizada para coloração do gel, sendo este inicialmente de agarose e posteriormente substituído por gel de poliacrilamida. A partir do momento em que adotou-se a poliacrilamida, tornou-se viável a idéia de substituir o uso de Brometo de Etídio por outro corante que, além de menos tóxico, apresenta maior sensibilidade ao teste. Este novo processo (descrito a seguir) é uma técnica In House de coloração a partir da prata.

Gel de Poliacrilamida Corado por Prata (Pesquisa de Mutação JAK2V617F)

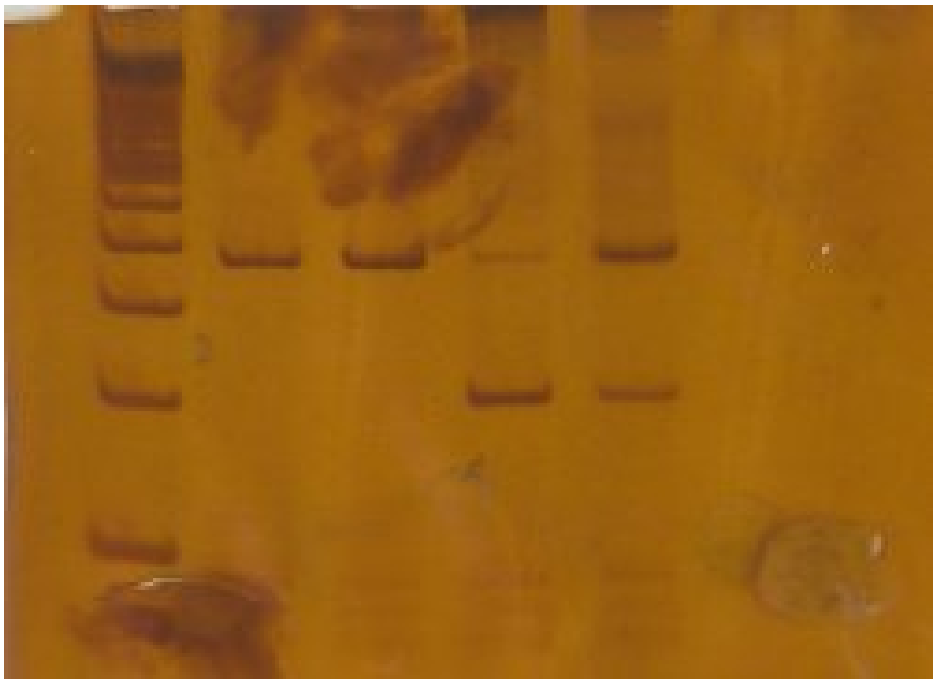


Figura 2: Gel de poliacrilamida corado por Prata.

Coloração de Gel de Poliacrilamida por Prata (In House).

- REAGENTES:

1- Solução Reveladora

- 30g de NaOH
- Água Milli Q q.s.p. 1L

2 – Solução Fixadora

- 90 ml de etanol 100% (não da MERK)
- 4,5 ml de ácido acético
- 805,5 ml de água Milli Q

3 – Solução de Prata

- 2,8g de nitrato de prata
- Água Milli Q q.s.p. 1L

- TÉCNICA:

1- Aplicar Solução Fixadora,
2- "Descolar" o gel nesta solução,
3- Manter gel por aproximadamente 5 min. nesta solução,
4- Guardar solução fixadora para uso posterior,
5- Adicionar solução de prata ao gel,
6- Agitar suavemente por 10 min.,
7- Descartar solução de prata em recipiente adequado,
8- Lavar o gel com água Milli Q e descartar esta água após a lavagem,
9- Aplicar solução reveladora e adicionar aproximadamente 2 ml de formaldeído (tóxico), agitando até atingir a coloração desejada,

10- Descarta soluções acima e reutiliza solução fixadora previamente guardada,
11- Umedecer papel celofani e, com este, forrar placa de vidro,
12- Aplicar o gel no celofani,
13- Cobrir o gel com outra folha de celofani previamente umedecida e esperar secar,
14- Após secagem, retirar celofani da placa de vidro e recortar em torno do gel.

OBS: Nunca aplicar soluções diretamente sobre o gel.

Resultados e Discussão

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPCr) constituem um grupo de doenças que têm vários aspectos em comum. Dentre eles, podemos citar o fato de corresponderem a uma proliferação clonal de elementos hemopoéticos totipotentes e apresentarem aspectos histológicos que freqüentemente se sobrepõem. Por outro lado, cada um dos tipos de DMPCr apresenta particularidades biológicas, clínicas e de evolução. São DMPCr, a leucemia mielóide crônica (LMC) que representa aproximadamente 25,5% das DMPCr, a policitemia Vera (PV) representa 38,5% , a trombocitemia essencial (TE) 11% dos casos e a mielofibrose primária (MF) que representa aproximadamente 25% das DMPCr.

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPCr) são um grupo heterogêneo de doenças nas quais ocorre aumento da produção de uma ou mais linhas hematopoiéticas proveniente de alteração provocada a nível de stem cell multi-potente. Desde a descoberta de uma mutação pontual no exon 12 do gene JAK2 (troca de uma guanina por uma timina), a qual leva à troca do aminoácido valina por uma fenilalanina na posição 617 da proteína (V617F), estudos têm investigado e concluído presença significativa dessa mutação em pacientes com DMPCr.

Neste trabalho foram analisados 52 pacientes, sendo 18 destes testados quanto a presença da mutação JAK2V617f e 34 quanto a presença da translocação BCR-ABL. Os pacientes positivos para um dos dois tipos de testes era submetido ao outro, buscando indivíduo que apresentasse os dois quesitos em questão. Não foi encontrado nenhum indivíduo positivo simultaneamente para JAK2V617F e BCR-ABL.

- Extração de DNA:

O método adotado para extração do DNA genômico, a partir de 5ml de sangue periférico, foi o de salting out desenvolvido in house. Este processo não sofreu alterações, sendo mantido o mesmo protocolo do início da padronização.

- Reação de PCR para amplificação da zona mutada JAK2V617F:

A reação de PCR foi padronizada segundo Baxter, Scott e Campbell, 2005 e Levine e Wadleigh, 2005. Estes foram trabalhos chave para orientar os passos a serem seguidos para a conclusão do protocolo. Para esta reação foram testadas três diferentes enzimas, sendo elas Taq Polimerase (LGC biotecnologia), Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) e Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Byosistems), todas com os mesmos controles.

A Taq Polimerase LGC mostrou-se ineficiente para esta reação, apesar de ser testada em várias concentrações de todos os reagentes envolvidos no processo e dela mesma. A seguir, gel ilustrando o desempenho desta enzima. Trata-se de um paciente controle positivo, controle negativo, paciente positivo testado com esta enzima (falso negativo), e paciente negativo testado também com esta enzima.

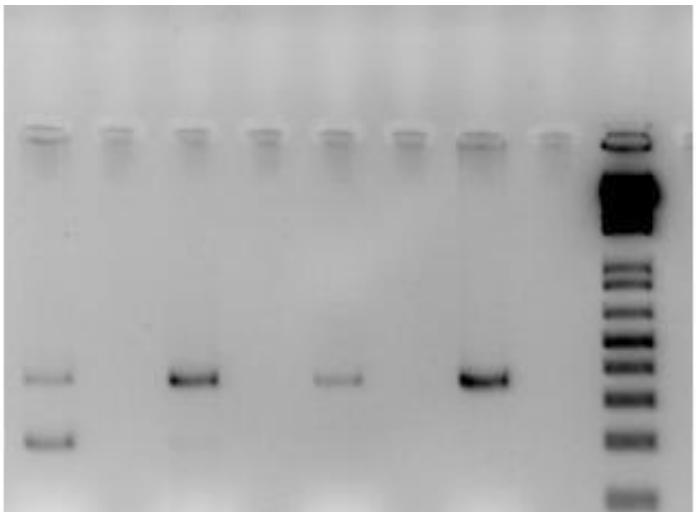


Figura 3: Gel teste de enzima Taq Polimerase LGC (raia 1: controle positivo; raia 3: controle negativo; raia 5: paciente falso negativo testado com essa enzima; raia 7: paciente negativo; raia 9: “Ladder” 1kb).

A Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) mostrou-se eficiente para a referida reação, porém a quantidade necessária desta enzima para se obter sucesso neste processo era muita alta. Desta forma, não se faz interessante o uso desta enzima uma vez que o custo final do exame torna-se muito caro. A seguir, dois géis ilustrando o desempenho da enzima. O primeiro é constituído de controle positivo, paciente positivo testado com a enzima em concentração normal (apresentou bandeamento inespecífico e falso negativo), controle negativo e paciente negativo testado com a enzima. O segundo apresenta a mesma disposição de amostras descritas anteriormente, porém neste teste a concentração de enzima no MIX foi muito alta (dobrou); neste caso a enzima mostrou-se eficiente, mas inviável financeiramente.

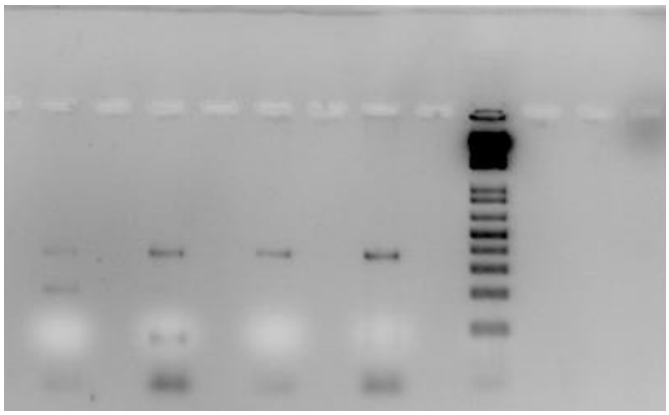


Figura 4: Gel teste 1 de enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen). Raia 1: controle positivo; Raia 3: paciente positivo testado com a enzima em concentração normal (apresentou bandeamento inespecífico e falso negativo); Raia 5: controle negativo; Raia 7: paciente negativo; Raia 9: “Ladder” 1kb.

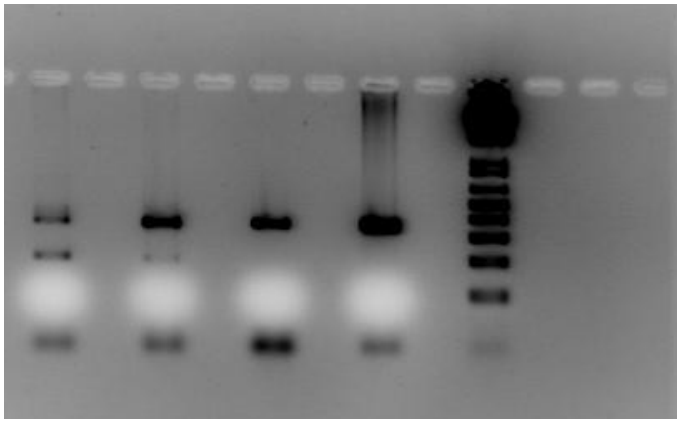


Figura 5: Gel teste 2 de enzima enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen). Raia 1: controle positivo; Raia 3: paciente positivo testado com a enzima em concentração dobrada; Raia 5: controle negativo; Raia 7: paciente negativo; Raia 9: “Ladder” 1kb.

A Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Byosistems) é a enzima ideal para e reação de PCR referida. Apesar de seu custo elevado, pode ser usada em baixas concentrações e mesmo assim apresenta resultados satisfatórios, ou seja, apresentou o melhor “custo-benefício”. O critério para a adoção desta enzima não foi apenas o financeiro, mas também a qualidade dos testes realizados com ela. Abaixo, gel ilustrando a eficiência desta enzima. Trata-se do peso, paciente negativo testado com a enzima, controle negativo, paciente positivo tratado com a enzima e controle positivo

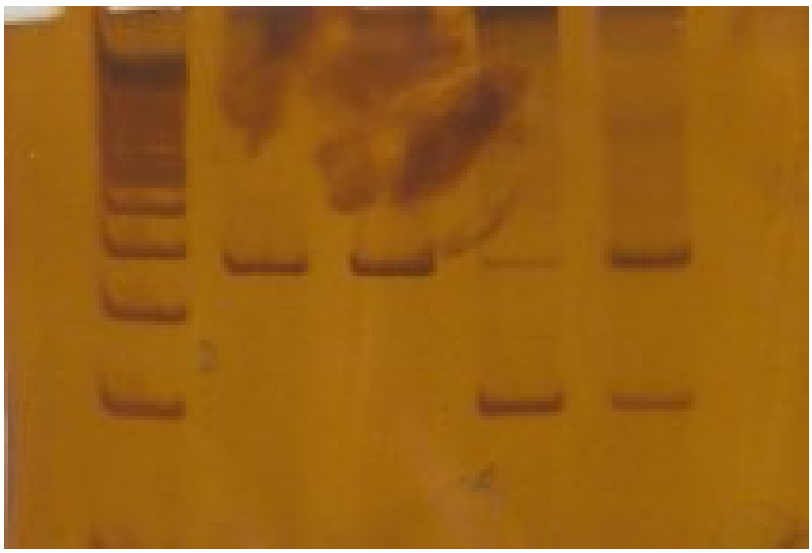


Figura 6: Gel teste de enzima Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Byosistems). Raia 1: “Ladder” 1kb; Raia 2: paciente negativo testado com a enzima; Raia 3: controle negativo; Raia4: paciente positivo tratado com a enzima; Raia 5: controle positivo.

- Gel e coloração para visualizar o produto da reação de PCR:

  O protocolo era inicialmente visualizado em gel de agarose 2% corado por brometo de etídio. Apesar de eficiente, pensou-se na alternativa de substituir a agarose pelo gel de poliacrilamida. Observou-se que a poliacrilamida é bem mais sensível, tornando mais fácil a visualização das bandas.

  Após a substituição da agarose pela poliacrilamida, outro ponto foi levantado: a extinção do uso de brometo de etídio nesta pesquisa de mutação. Para isso, testou-se a coloração por prata e esta mostrou-se tão ou mais eficiente que o brometo de etídio (substância altamente mutagênica e, conseqüentemente, cancerígena). A figura anterior demonstra essas inovações.

Conclusões

- A técnica de pesquisa de mutação JAK2V617F foi padronizada e implementada no Hemocentro de Botucatu, promovendo autonomia desta instituição para realizar este tipo de exame.

- A técnica descrita é hoje exame fundamental para diagnóstico de Policitemia Vera, sendo todos os pacientes acometidos por doenças mielóides crônicas submetidos à essa avaliação.

- No total de 52 pacientes analisados, não foi encontrado a presença simultânea do transcrito bcr-abl e da mutação JAK2V617F num mesmo indivíduo.

- A adoção do gel de poliacrilamida tornou mais sensível o resultado do exame.

- A coloração por prata promoveu maior segurança ao laboratorista, não apresentando substâncias altamente cancerígenas como o Brometo de Etídio.

- A Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Byosistems) mostrou-se a enzima mais eficiente para realização deste teste.

Referências Bibliograficas:

BAXTER, E.J., SCOTT, L.M., CAMPBELL, P.J. et. al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet, v.365, p.1054-61, 2005.

CHAN, L.C., KARHI, K.K., RAYTER, S.I. et. al. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. Nature, v.325, p.635-7, 1987.

CHESSELLS, M.J., JANOSSY, G., LAWLER, S.D. et. al. The Ph1 chromosome in childhood leukaemia. Br. J. Haematol., v.41, p.25-41, 1979.

CLARK, S.S., McLAUGHLIN, J., CRIST, W.M. et. al. Unique forms of the abl Tyrosine Kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. Science, v.235, p.85-8, 1987.

DALEY, G.Q., VAN ETTEN, R.A., BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the philadelphia chromosome. Science, v.247, p.824-30, 1990.

DELFAU, M., KERCKAERT, J., dHOOGHE, M.C. et. al. Delection of minimal residual disease in chronic myeloide leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. Leukemia, v.4, p.1-5, 1990.

DOBROVIC, A., TRAINOR, K.J., MORLEY, A.A. Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. Blood., v.72, p.2063-5, 1988.

FIALKOW, P.J., JACOBSON, R.J., PAPAYANNOPOULOU, T. Chronic myelocytic leukemia. Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erithrocyte, platelet and monocyte / machrophage. Am. J. Med., v.63, p.125-30, 1977.

GORSKA – FLIPOT, I., NORMAN, C., ADDY, L., MINDEN, M. Molecular pathology of chronic myelogenous leukemia. Tumour Biol., v.11, suppl.1, p.25-43, 1990.

GROFFEN, J., STEPHENSON, J.R., HEISTERKAMP, N. et. al. Philadelphia chromosomal breakpoint are clustered within a limited region, bcr, on chromosomal 22. Cell, v.36, p.93-9, 1984.

HEIM, S., MITELMAN, F. Chronic Myeloid Leukemia. In: HEIM, S., MITELMAN, F. Cancer Cytogenetics. 2ed. New York: Wiley-Liss, 1995. cap.4, p.34-68.

HERMANS, A., HEISTERKAMP, N., VON LINDEN, M. et. al. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acutelymphoblastic leukemia. Cell, v.51, p.33-40, 1987.

KAWASAKI, E.S., CLARK, S.S., COYNE, M.Y. et. al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v.85, p.5698-702, 1988.

KONOPLA, J.B., WITTE, O.N., Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. Mol. Cell. Biol., v.5, p.3116-23, 1985.

LE BEAU, M.M., ROWLEY, J.D., Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma. Clinical and biological significance. In: HARRIS, H., HIRSCHHORN. Advances in human genetics. 2ed. São Francisco: Plenum Press, 1968. v.15, cap.1, p.1-54.

LEVINE, R.L., WADLEIGH, M. et. al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell, v.7, p.387-96, 2005.

NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A., A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science, v.132, p.1497-9, 1960.

PIGNON, J.M., HENNI, T., AMSELEN, S. et. al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Leukemia, v.4, p.83-6, 1990.

PRIEST, J.R., ROBISON, L.L., MCKENNA, R.W., et. al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, v.56, p.15-22, 1980.

REITER, A., SKLADNY, H., HOCHHAUS, A. et. al. Molecular response of CML patients treated with interferon-alfa monitored by quantitative Southern blot analysis. Br. J. Haematol., v.97, p.86-93, 1997.

RIBEIRO, R.C., ABROMOWITCH, M., RAIMONDI, S.C., et. al. Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood., v.79, p.948-53, 1987.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenuous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature, v.243, p.290-3, 1973.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S. et. al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, v.239, p.487-91, 1988.

SANDENBERG, A.A. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XL. The Ph1 and other translocations in LMC. Cancer, v.46, p.2221-6, 1980.

SELLERI, L., VON LINDERN, M., HERMANS, A. et. al. Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr/abl transcripts including the acute lymphoid leukemia-type 7 kb transcript. Blood, v.75, p.1146-53, 1990.

SHTIVELMAN, E., GALE, R.P., DREAZEN, O. et. al. Bcr-abl RNA in pacients with chronic myelogenous leukemia. Blood, v.69, p.971-3, 1987.

SPIVAK, J.L., BAROSI, G., TOGNONI, G. et. al. Chronic myeloproliferative disorders. Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program), p.200-24, 2003.

YOFFE, G., BLICK, M., KANTARJIAN, H. et. al. Molecular analysis of interferon-induced suppression of Philadelphia chromosome in patients with chronic myeloid leukemia. Blood, v.69, p.961-3, 1987

WESTBROOK, C.A., HOOBERMAN, A.L., SPINO, C. et. al. Clinical significance of the BCR/ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: A cancer and leukemia group B study (8762). Blood, v.80, p.2983-90, 1992.

WHANG-PENG, E.S., HENDERSON, T., KNUTSEN, E.J. et. al. Cytogenetic studies in acute myelocytic leukemia with special emphasis on the occurrence of Ph1 chromosome. Blood, v.89, p.3064. 1997.