

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

BRUNO TAKAO REAL KARIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS
CÂNCER/TESTÍCULO (CTs) EM PACIENTES COM MIELOMA
MÚLTIPLO.**

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Vettore.

Co- Orientador: Profa. Dra. Gisele W. B. Colleoni.

Supervisor: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira.

Botucatu

2009

Bruno Takao Real Karia

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS
CÂNCER/TESTÍCULO (CTs) EM PACIENTES COM MIELOMA
MÚLTIPLO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Modalidade Médica.

Botucatu

2009

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

Karia, Bruno Takao Real.

Análise da expressão de antígenos câncer/testículo (CTs) em pacientes com mieloma múltiplo / Bruno Takao Real Karia. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: André Luiz Vettore

Co-orientador: Gisele W. B. Coleoni

1. Testículo - Câncer 2. Expressão gênica 3. Antígenos

Palavras-chave: Antígenos câncer/testículo; Expressão gênica; Mieloma múltiplo

Dedicatória

Aos meus pais e a minha irmã
por todo amor, confiança,
paciência e incentivo.

Agradecimentos

À **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, através do Instituto de Biociências de Botucatu.

À **Universidade Federal de São Paulo**, pela oportunidade cedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho (Processo 09/50237-1).

Ao **Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira**, pela orientação, ensinamentos para realização deste trabalho e pela oportunidade de me juntar ao Laboratório de Biologia Molecular do Câncer.

À **Profa. Dra. Gisele W. B. Colleoni**, pelos conhecimentos e co-orientação na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira**, pela supervisão.

À **Dra. Valéria Cristina da Costa Andrade**, por toda ajuda, paciência, amizade.

Ao **Fabício de Carvalho**, pela ajuda, ensinamentos e colaboração nas análises laboratoriais.

Ao **Prof. Dr. Daniel Moura**, pela indicação ao Laboratório de Biologia Molecular do Câncer.

Aos meus tios **Sandra Maria Real Sakamoto e Luiz Henrique Minor Sakamoto**, por me acolherem em São Paulo.

Aos professores da **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação acadêmica.

À minha **família**, por todo carinho, amor e apoio incondicional.

Aos meus colegas de laboratório: **Aline Akemi Nagado, Ana Carolina de Carvalho, Ana Luiza Bonfim Longo, Danielle Maia, Fernanda Corbi, Fernando Tadeu Zamunér, Marianna Rettori, Riguel Inaoka, Veruska Fook, Walter Moisés Braga** pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos meus amigos da UNESP: **Bruno Biaggio, Felipe Augusto Araújo, Gabriel Capella Machado, João Augusto Ribeiro, Juliana Takitane, Karen Akina Koga, Larissa Camargo, Marcos Leite Santoro, Narayane Sales, Rafael Junqueira Borges, Raphael Sanches Peres, Renan Padron Almeida, Roberto Kodama, Vinícius Dael Olio Cesarino**, pela amizade, convívio e todos os momentos marcantes durante o tempo que estive em Botucatu.

Aos meus amigos da Universidade Federal de São Paulo: **Paulo Henrique Molin e Rafael Ferreira**, que me ajudaram a aturar esta cidade fria.

Resumo

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia maligna secundária à expansão clonal de células plasmáticas caracterizada pela presença de imunoglobulina monoclonal no sangue e/ou na urina, lesões líticas ósseas e infiltração de plasmócitos monoclonais na medula óssea. A caracterização dos mecanismos responsáveis pela expansão das células tumorais do MM é difícil e envolve uma série de alterações genéticas e mudanças no microambiente da medula óssea, favorecendo o crescimento do tumor e a falha do sistema imune em reconhecê-lo. O MM é uma doença incurável, sendo a sobrevida mediana dos pacientes em torno de 3-5 anos. Terapias atuais como quimioterapia e transplante autólogo de células-tronco podem induzir remissão da doença, mas a recaída e a morte são inevitáveis.

Os antígenos específicos câncer/testículo (CTs) foram originalmente descritos em pacientes com melanoma e são assim denominados, pois suas proteínas foram identificadas em espermatogônias, células conhecidas por não expressarem antígenos de histocompatibilidade (HLA), o que as impossibilita de desencadear uma resposta imune específica. Esses antígenos foram identificados posteriormente em vários tipos de tumores humanos, como melanoma, carcinoma pulmonar, câncer renal, entre outros. Até o momento, existem poucas informações a respeito de sua importância como fatores de prognóstico clínico ou relacionado à proliferação aberrante das células plasmáticas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o nível de expressão gênica dos antígenos câncer/testículo *MAGEC1(CT7)*, *MAGEA3/6*, *LAGE-1*, *NY-ESO-1* e *GAGE* em amostras de aspirado de medula óssea total de pacientes com mieloma múltiplo. A análise de expressão por RT-PCR dos 5 CTs de interesse, realizada em 21 amostras de medula total de pacientes com MM, demonstrou as seguintes frequências: *CT7* (42,9%), *LAGE-1* (23,8%), *MAGEA3/6* (19%), *GAGE* (19%) e *NY-ESO-1* (4,8%), indicando que podem ser bons candidatos à imunoterapia.

Índice

1. Introdução	11
1.1. O mieloma múltiplo	11
1.2. Os antígenos câncer/testículo (CT)	13
1.3. Imunogenicidade dos antígenos câncer/testículo	15
2. Justificativa	17
3. Objetivos	18
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Pacientes	19
4.1.1 Avaliação diagnóstica dos pacientes com suspeita de MM	19
4.1.2 Critérios diagnósticos utilizados	20
4.1.3 Estadiamento clínico	22
4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	22
4.3. Análise da Expressão dos CTs	23
4.4. Detecção da resposta humoral espontânea anti-MAGEC1(CT-7)	23
4.5. Detecção da resposta cruzada entre os antígenos NY-ESO-1 e LAGE-1	25
5. Resultados	28
5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	28
5.2. Análise da Expressão dos CTs	29
5.3. Detecção da resposta humoral espontânea anti-MAGEC1(CT-7)	31
5.4. Detecção da resposta cruzada entre os antígenos NY-ESO-1 e LAGE-1	34
6. Conclusões	37
7. Referências Bibliográficas	38

Abreviaturas e Siglas

%: porcentagem

°C: grau Celsius.

cDNA - DNA complementar

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

cm - Centímetros

CT7/MAGEC1 - Gene Câncer/testículo 7

CT - Antígeno Câncer/Testículo

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTPs - Deoxinucleotídeos

et al. - e outros (de et alli).

GAGE - Gene Antígeno G

GAPDH - Gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GMSI - Gamopatia monoclonal de significado indeterminado

HLA - Antígeno leucocitário humano

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

ISS - Sistema de Estadiamento Internacional

LAGE-1 - Gene Antígeno L-1

MAGEA3/6 - Gene Antígeno específico de melanoma-3/6

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min - Minutos

mL - mililitros

µL - microlitros

MM - Mieloma múltiplo

mM - Milimolar

MO - Medula óssea

NY-ESO-1 - Gene Carcinoma espino celular de esôfago de Nova Iorque

pb - Pares de bases

PBS - Phosphate-buffered saline

pmol - Picomol

RNA - Ácido ribonucléico

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase- transcriptase reversa

s - Segundos

Taq: DNA polimerase isolada de *Termus aquaticus*.

U - Unidade

1. Introdução

1.1. O mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia maligna secundária à expansão clonal de células plasmáticas caracterizada pela presença de imunoglobulina (Ig) monoclonal no sangue e/ou na urina, lesões líticas ósseas e infiltração de plasmócitos monoclonais na medula óssea (Jungbluth et al, 2005; Nadav et al, 2006).

O MM corresponde a 1,0% de todas as neoplasias e aproximadamente 10% das neoplasias hematológicas, sendo o segundo tipo de câncer hematológico mais comum (Jungbluth et al, 2005; Li et al, 2007; White et al, 2007). A incidência média anual ajustada por idade é em torno de 4,7 por 1.000 para população masculina e 3,2 por 1.000 para população feminina (White et al, 2007). Nos Estados Unidos são diagnosticados aproximadamente 15.000 novos casos de MM por ano (Atanackovic et al, 2007).

O diagnóstico de MM é baseado na presença de proteína monoclonal (proteína-M) no soro e/ou urina, infiltração da medula óssea por pelo menos 10% de plasmócitos clonais e lesão de um ou mais órgãos-alvo [CRAB = hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas (*bone lesions*)]. Os indivíduos com mieloma devem ser distinguidos daqueles com gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) [<10% de células plasmáticas na medula óssea, baixo nível da proteína M (<3g/dl) e nenhuma lesão osteolítica], amiloidose ou de outras doenças linfoproliferativas com paraproteinemia. Atualmente, recomenda-se a diferenciação entre MM sintomático e assintomático. Pacientes sintomáticos são aqueles com um ou mais dos critérios *CRAB* e, por isso, necessitam de tratamento. Já os pacientes assintomáticos devem ser apenas acompanhados clinicamente (Ludwig, 2005).

Embora as células plasmáticas malignas estejam presentes principalmente na medula óssea, elas são capazes de migrar para sítios distantes, através da circulação sangüínea. Assim, as células do MM podem ser detectadas no sangue periférico da maioria dos pacientes através da análise do rearranjo de cadeia pesada da imunoglobulina por PCR ('Polymerase Chain Reaction') ou por citometria de fluxo (Nadav et al, 2006).

A caracterização dos mecanismos responsáveis pela expansão das células tumorais do MM é difícil e envolve uma série de alterações genéticas e mudanças no microambiente da medula óssea, favorecendo o crescimento do tumor e a falha do sistema imune em reconhecê-lo (Nadav et al, 2006; Ludwig, 2005).

O microambiente do MM consiste de plasmócitos clonais, proteínas da matriz extracelular, células estromais da medula óssea, osteoblastos e osteoclastos. A interação entre as células do MM, as células estromais da medula óssea, via moléculas de adesão e citocinas, é um fator crucial na patogênese do mieloma. A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que tem como função atuar na diferenciação das células B. A IL-6 é considerada uma das mais importantes citocinas na biologia do MM, pois leva à proliferação e a inibição da morte celular (apoptose) nas células tumorais (Chng et al, 2005).

Novas evidências sugerem que pequenas frações de células do MM escapam da ação dos quimioterápicos e permanecem em níveis indetectáveis por métodos convencionais. Essas pequenas frações de células do mieloma são consideradas alvos potenciais para imunoterapia, seja ela passiva ou ativa, devido a dois fatores principais: 1) pequenas frações celulares de MM podem ser destruídas por linfócitos T citotóxicos; 2) nos transplantes alogênicos, a infusão de células T do doador podem, com eficiência, eliminar as pequenas frações de células do MM residuais em alguns pacientes, favorecendo a formação de uma resposta imune mais eficiente (Condomines et al, 2007).

As imunoglobulinas (Ig) clonais que são produzidas pelas pequenas frações de células residuais do MM parecem ser alvos ideais e específicos para construção de vacinas anti-idiotipo. Porém, vários *trials* de vacinas utilizando o idiotipo da Ig como alvo falharam em demonstrar benefício clínico em pacientes com MM (Condomines et al, 2007). Já as vacinas formuladas com antígenos associados ao MM podem “instruir” o sistema imune a eliminar as células malignas. Mas para isso requerem antígenos que sejam específicos das células do mieloma (Jungbluth et al, 2007).

1.2. Os antígenos câncer/testículo (CT)

Antígenos que estão associados a tumor foram descobertos originalmente em pacientes com melanoma maligno. Esses antígenos foram identificados posteriormente em vários tipos de tumores humanos. Em tecido normal foram inicialmente descritos em linhagem germinativa de testículo. Por isso, os genes que expressam essas proteínas receberam o nome de antígenos 'cancer/testis' (CT) (Utsunomiya et al, 2004).

Assim, os CTs constituem uma promissora classe de antígenos tumorais devido à sua limitada expressão em tecidos somáticos (células germinativas do testículo, ovário fetal e células placentárias (trofoblastos) (Cho et al, 2006; Costa et al, 2007). Alguns CTs podem ser expressos em outros tecidos normais como pâncreas, fígado e baço, mas o nível encontrado de expressão é bem mais baixo do que aquele visto em células germinativas (Costa et al, 2007).

O desenvolvimento de vacinas para antígenos específicos de tumor depende, em parte, da identificação de um amplo espectro de proteínas imunogênicas expressas predominantemente em câncer humano. A técnica de clonagem de epítomos de células T desenvolvida e publicada em 1991 levou à descoberta dos antígenos CTs humanos MAGEA1, BAGE e GAGE. Foi demonstrado que os produtos dos RNAs mensageiros transcritos e traduzidos desses genes estavam presentes exclusivamente em testículo normal e em vários tipos de tumores. Em 1995 foi utilizada a técnica SEREX ('Serological Expression Cloning') na busca de novos antígenos tumorais reconhecidos pela IgG de pacientes com câncer. Entre os genes identificados em tumores humanos por esta técnica estão o *SSX2*, *NY-ESO-1* e *SYCP-1*, que como os genes *MAGE*, *BAGE* e *GAGE*, também são expressos predominantemente em testículo normal e em câncer (Scanlan et al, 2004).

Os genes que codificam os CTs podem ser divididos entre os que estão localizados no cromossomo X e os que estão presentes em outros cromossomos (os autossomos) (Cho et al, 2006). Os CT que estão no cromossomo X, como o gene *MAGEC1(CT7)*, tendem a formar famílias de genes que são normalmente expressos na espermatogônia de forma coordenada. Há evidências de que a expressão desses CTs seja regulada por

mecanismos epigenéticos, como hipermetilação do promotor gênico (metilação do DNA) e acetilação de histonas (Simpson et al, 2005; Cho et al 2006; Costa et al, 2007). Uma anotação cuidadosa dos genes que estão presentes no cromossomo X demonstrou que aproximadamente 10% deles correspondem aos CTs e esses são frequentemente co-expressos em células tumorais (Simpson et al, 2005; Cho et al, 2006; Stevenson et al, 2007). Já os CTs que não estão no cromossomo X, por exemplo o BAGE, encontram-se distribuídos aleatoriamente no genoma (Simpson et al, 2005).

No testículo, os CTs são normalmente expressos nos espermatócitos e atuam na meiose. Assim, a expressão “aberrante” de CTs em células tumorais pode levar à segregação cromossômica anormal e aneuploidia, justificando sua importância na tumorigênese (Simpson et al, 2005).

Como os CTs não são expressos ou têm uma baixa expressão em tecidos somáticos diferenciados, alguns autores sugerem que a expressão dos CTs em tecido tumoral pode ser restrita às células que retêm propriedades de células-tronco (Parmigiani et al, 2006; Costa et al, 2007). Na massa tumoral, uma população restrita com propriedades de célula-tronco (‘cancer stem cell’) pode ser mantida, favorecendo a manutenção do tumor, proliferação e metástases (Costa et al, 2007).

Assim, todos os CTs são em princípio alvos atrativos para imunoterapia em câncer, devido às gônadas serem órgãos imunoprivilegiados e a resposta imune anti-CT ser alvo tumoral específico. Vacinas utilizando peptídeos derivados dos CTs *NY-ESO-1* (*CTAG1B*) e *MAGEA1* têm demonstrado benefícios clínicos em pacientes com melanoma (Stevenson et al, 2007).

Os CTs têm sido detectados em muitas linhagens celulares e em amostras de tumor primário dos pacientes com MM (por RT-PCR e imunoistoquímica). Até o momento existem poucas informações a respeito de sua importância como fatores de prognóstico clínico ou relacionado à proliferação aberrante das células plasmáticas (Jungbluth et al, 2005).

No estudo realizado por Condomines et al (2007) em pacientes com MM recém-diagnosticados que sobreviveram ao tratamento, o gene *MAGEC1* foi o CT mais expresso (66% dos casos), o que corrobora os resultados obtidos em outros trabalhos publicados anteriormente. Jungbluth et al (2005), observaram que a expressão do gene *MAGEC1* foi correlacionada com o avanço da doença

do mieloma, devido à alta expressão desse gene nas amostras com estágio III de MM, quando comparado com indivíduos com GMSI.

Um estudo recente desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular do Câncer da Unifesp mostrou elevada frequência (> 70%) de expressão do gene *MAGEC1(CT7)* em pacientes com mieloma múltiplo em estágio avançado e possível impacto prognóstico desfavorável relacionado à expressão desse gene. Esse estudo sugere que o gene *MAGEC1(CT7)* tenha importante papel biológico no desenvolvimento e prognóstico do MM, podendo ainda ser considerado um possível alvo terapêutico. Este estudo também demonstrou que outros antígenos CT estão frequentemente expressos em pacientes com MM: *LAGE-1* (49%), *MAGEA3/6* (41%), *NY-ESO-1* (33%) e *GAGE* (33%) (Andrade et al., 2008).

1.3. Imunogenicidade dos antígenos câncer/testículo

A disfunção imune é uma importante característica do MM e leva a infecções bacterianas, fúngicas e virais, que são as maiores causas de morbidade e mortalidade nessa doença. Reduzidos níveis de imunoglobulinas policlonais é uma característica consistente da atividade do MM. Esta “hipogamaglobulinemia” reflete a supressão dos linfócitos B CD19+ que é inversamente proporcional ao estágio da doença (Rawstron et al, 1998). Além disso, existe a presença de um pico monoclonal de imunoglobulina secretado pelas células tumorais, mas que não apresenta função imune específica.

A disfunção imune do MM também parece contribuir para o crescimento tumoral e resistência à quimioterapia. Por isso, é provável que o sistema imune tenha papel em prevenir ou controlar o crescimento dos plasmócitos tumorais nessa doença (Pratt et al, 2007).

Apesar da intrínseca disfunção imune presente na maioria dos pacientes com MM, há considerável interesse na identificação de resposta autóloga contra os CTs em mieloma. Recentemente, documentou-se que antígenos tumorais associados ao MM são capazes de suscitar resposta humoral e resposta imune de linfócitos T CD4 e CD8+, conforme descrito a seguir.

Atanackovic et al (2007) descreveram resposta humoral contra CTs após transplante alogênico, sugerindo que existe baixa imunogenicidade espontânea contra esses antígenos no MM.

Recentemente, Curioni-Fontecedro et al (2008) detectaram a presença de anticorpos anti-CT7 (MAGEC1) por Western blot em soro de 30/60 (50%) pacientes com MM previamente tratados e 13 de 14 (93%) pacientes com MM que expressavam o CT7 no tumor. Por outro lado, encontraram expressão de NY-ESO-1 em 1 de 24 tumores (4%), justificando o baixo nível de detecção de anticorpos contra esse antígeno no soro dos pacientes com MM em soro (2/60 casos de MM previamente tratados). Além disso, anticorpos anti-MAGEA3 e SSX-2 foram detectados em soro de apenas um paciente com MM.

2. Justificativa

O mieloma múltiplo permanece como doença incurável, tendo como sobrevida média de três a cinco anos. A recaída da doença ocorre na maioria dos pacientes, independentemente do regime de tratamento aplicado. Embora seja possível obter remissão completa da doença em aproximadamente 25-50% dos pacientes com diagnóstico inicial, quase todos irão recidivar em 2-3 anos.

Como os CTs não são expressos ou têm uma baixa expressão em tecidos somáticos diferenciados, são alvos atrativos para imunoterapia, pois as células testiculares e placentárias não expressam de MHC de classe I, portanto os CTs não são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos CD8⁺.

O desenvolvimento de vacinas para antígenos específicos de tumor depende, em parte, da identificação de um amplo espectro de proteínas imunogênicas expressas predominantemente em câncer humano. Sendo assim, este projeto se propõe a avaliar a expressão gênica dos CTs em amostras de MM, aumentando a casuística testada por Andrade et al (2008). Além disto, pretende-se avaliar a resposta humoral dos pacientes com MM contra estes antígenos. Estas análises poderão contribuir com informações úteis para o desenvolvimento de novos subsídios para o uso da imunoterapia no tratamento destes pacientes, contribuindo para uma abordagem terapêutica mais individualizada para os pacientes com MM.

3. Objetivos

- 1) Extrair RNA a partir de amostras de aspirado de medula óssea total de pacientes com MM.
- 2) Sintetizar cDNA a partir das amostras de RNA extraídas.
- 3) Avaliar o nível de expressão gênica dos antígenos câncer/testículo *MAGEC1(CT7)*, *MAGEA3/6*, *LAGE-1*, *NY-ESO-1* e *GAGE* nestas amostras.

3.1 Objetivos Extras

- 1) Avaliar a presença de imunidade humoral espontânea contra o antígeno *MAGEC1(CT7)* no soro de pacientes com MM ao diagnóstico .
- 2) Verificar a possibilidade de resposta imune cruzada entre os antígenos *NY-ESO-1* e *LAGE-1* por *Western Blot*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Pacientes

Para avaliar o nível de expressão dos genes *MAGEC1(CT7)*, *MAGEA3/6*, *NY-ESO-1*, *LAGE-1* e *GAGE* já foram coletadas amostras de medula óssea de 21 pacientes com MM. Todas estas amostras foram coletadas ao diagnóstico no âmbito do Projeto Genoma Clínico do Câncer em Mieloma Múltiplo (MM).

Também foram coletadas amostras de soro desses pacientes para se avaliar a presença de imunidade humoral espontânea contra esses antígenos nestas amostras de MM ao diagnóstico.

Desta forma, a casuística a ser analisada no presente estudo totaliza 21 casos de MM e este grupo se soma aos 39 casos de MM analisados anteriormente (Anexo 1).

O uso dessas amostras de aspirado de medula óssea para estudos de biologia molecular havia sido aprovado em 10/12/2004 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP 1428/04). O uso destas amostras no estudo que visa avaliar a imunidade humoral espontânea contra antígenos câncer/testículo foi aprovado em 06/03/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP 1803/08).

Todos os pacientes com MM concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP (Anexo 2).

4.1.1 Avaliação diagnóstica dos pacientes com suspeita de MM

A avaliação inicial dos pacientes com suspeita de MM incluiu os exames necessários para diagnóstico e estadiamento:

- 1) Hemograma completo, uréia, creatinina, cálcio total e iônico, DHL, β 2-microglobulina (B_2M), proteína C reativa.

- 2) Avaliação radiológica do esqueleto, incluindo raios-X simples de crânio, coluna vertebral, bacia e membros, bilateralmente. Pacientes com suspeita de compressão da medula espinhal foram avaliados com ressonância nuclear magnética (RNM) de coluna vertebral.
- 3) Eletroforese de proteínas (EFP) sérica.
- 4) Quantificação das imunoglobulinas séricas por método imunonefelométrico.
- 5) Imunofixação de proteínas do soro.
- 6) Imunofixação de proteínas da urina. Para a demonstração da proteína monoclonal (proteína-M) na urina (proteinúria de Bence-Jones), a eletroforese de proteínas e a imunocaracterização foram realizadas em alíquota adequadamente concentrada da urina de 24 horas.
- 7) Mielograma. O material obtido por aspiração da medula óssea foi corado com May-Grünwald-Giemsa para avaliação morfológica e determinação do percentual de plasmócitos.
- 8) Biópsia de medula óssea. As biópsias de medula óssea obtidas ao diagnóstico foram fixadas em BASE-5 e em formalina, descalcificadas, emblocadas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina, PAS, Giemsa e reticulina de Gomori para avaliação histológica. Reações imuno-histoquímicas com anticorpos monoclonais anti- κ e anti- λ foram realizadas para definição de clonalidade.

4.1.2 Critérios diagnósticos utilizados

Os pacientes foram diagnosticados segundo critérios propostos pelo *International Myeloma Working Group* (2003).

Quadro 1. Critérios diagnósticos no MM (Kyle et al., 2003).

Mieloma múltiplo sintomático
1. Proteína-M no soro e/ou urina
2. Plasmocitose clonal na medula óssea > 10% e/ou plasmocitoma em biópsia de

tecido

3. Lesões em órgãos-alvo associadas ao mieloma (um ou mais):

CRAB (acrônimo do Inglês: Calcium, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions):

- Hipercalcemia (cálcio sérico > 2.65 mmol/L ou > 11.5mg/dL)
- Insuficiência renal (creatinina sérica > 2mg/dL ou 177µmol/L)
- Anemia (hemoglobina < 10 g/dL ou 2 mg abaixo do limite normal)
- Lesões ósseas (lesões líticas ou osteopenia)

4.1.3 Estadiamento clínico

O estadiamento obedeceu ao sistema proposto por Durie & Salmon (1975) (Quadro 2) e ao *International Staging System* (ISS).

Quadro 2. Sistema de estadiamento de Durie & Salmon.

Mieloma Múltiplo			
Estádio	Critério	Massa Celular (x 10 ¹² /m ²)	^A
I	Presença das características: 1. Hb > 10g/dl 2. Cálcio normal 3. Ausência de lesão óssea (escala 0) ^B ou apenas plasmocitoma 4. IgG < 5g/dL, IGA < 3g/dL, cadeia leve urina < 4g/24hs	< 0,6 (baixa)	
II	Não se encaixa em I e III	0,6 – 1,2 (intermediária)	
III	Uma ou mais características: 1. Hb < 8,5g/dl 2. Cálcio acima do normal 3. Lesões ósseas líticas avançadas (escala 3) ^B 4. IgG > 7g/dL, IGA > 5g/dL, cadeia leve urina > 12g/24hs	> 1,2 (alta)	
Subclassificação: A (Creatinina < 2mg/dL) B (Creatinina > = 2mg/dL)			

A= 10¹² células = aproximadamente 1 Kg

B= escala de lesões ósseas: Normal (0), Osteoporose (1), Lesões líticas (2), Destruição esquelética extensa e fraturas (3)

4.2. Extração de RNA e síntese e cDNA.

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), segundo condições fornecidas pelo fabricante. O RNA obtido foi

quantificado em espectrofotômetro e sua integridade foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se a *SuperScriptII* (Invitrogen) conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Basicamente, foram misturados 2µg de RNA total, 0,5µg de *primer* (oligo(dT)₁₈), 1µL de dNTPs (10mM) e água (*RNAse-free*) até 12µL. A mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos e armazenada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4µL de 5X (*First Strand Buffer*), 2µL de DTT 0,1M, 200U de *RNAse out* e 40U da enzima *SuperScriptII* (Invitrogen). A reação prosseguiu com incubação a 42°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos. Após a síntese os cDNAs obtidos foram diluídos 10 vezes com água.

4.3. Análise da Expressão dos CTs.

A expressão dos 5 CTs (*MAGEC1*, *MAGEA3/6*, *LAGE-1*, *NY-ESO-1* e *GAGE*) foi avaliada por RT-PCR e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Sybr Green*. O controle positivo foi a linhagem celular de mieloma múltiplo U266 (TIB-196, ATCC, Manassas, USA).

As reações de PCR foram realizadas em tubos de 0,2mL com um volume total de 25µL, contendo 1µL de cDNA, 1x PCR buffer, 1mM MgCl₂, 0,2µM dNTPs, 10pmol de cada *primer* (tanto o direto como o reverso), e 1,25U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen). As seqüências dos *primers* utilizados e as condições da PCR estão apresentadas no Quadro 3.

4.4. Detecção da resposta humoral espontânea anti-MAGEC1(CT-7)

Para detectar a presença de resposta humoral espontânea dos pacientes com MM recém-diagnosticados contra o antígeno CT7 foi utilizado o extrato protéico total da linhagem celular U266 (que expressa o RNAm dos cinco genes) em ensaios de *Western Blot* (Curioni-Fontecedro et al, 2008).

A linhagem celular U266 foi mantida a 37°C na presença de 5% de CO₂, em RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina, 1% de MEM NEAA (MEM *non-essential amino acids*) [Gibco

Laboratories] e gentamicina. Em um *pellet* de 500.000 células da linhagem celular U266 foi adicionado 300µL de tampão de lise 2X (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% *Glycerol*, 0,1% *Bromophenol Blue*). Após a ressuspensão das células, o lisado foi colocado no gelo por 3 minutos. Sendo assim, as proteínas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Em cada canaleta do gel foi aplicado 40µL do lisado protéico. No gel, também foi aplicado 10µL do padrão de peso molecular *Precision Plus Protein Standards – Kaleidoscope* (Catalog # 161-0375 *BIO-RAD*), como marcador.

Após o SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF *Hybond-P* (Amersham Biociences), (60 minutos a 100V e 350mA).

Foram adicionados os soros dos pacientes com MM (em duplicata) como anticorpo primário nas diluições 1:25, 1:100 e 1:250 (na amostra controle foi adicionado o anticorpo primário CT7.33 *mouse monoclonal*, na concentração final de 0,5µg/ml).

Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti IgG humana na diluição 1:20.000, o volume final foi de 500µL para cada amostra [na amostra controle foi usado o anticorpo secundário α -mouse IgG *Horseradish Peroxidase Conjugated – anti-mouse* (Amersham Biociences)].

Para evidenciar a proteína CT7 na membrana, foi utilizado o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), na proporção 1:1, sendo as soluções do ECL o substrato da peroxidase presente no anticorpo secundário. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme radiográfico *Hyperfilm ECL* (Amersham Biociences) por, respectivamente, 3 minutos, 2 minutos, 1minuto e 10s. Imediatamente após o tempo de exposição, os filmes foram revelados (revelador Kodak), lavados em água corrente e fixados (fixador Kodak).

Para certificar-se de que em todas as canaletas foram adicionados os soro dos pacientes foi realizado um *Western Blot* para a proteína α/β Tubulina (50-60 KDa). Foram utilizados o anticorpo primário α/β Tubulina (50-60 KDa) *Rabbit Polyclonal* (Cell Signaling), na diluição de 1:1.000 (volume final de 6ml); e o anticorpo secundário *Anti-Rabbit* na diluição 1:4.000 (volume final de 12ml).

4.5. Detecção da resposta cruzada entre os antígenos NY-ESO-1 e LAGE-1

Para avaliar a possibilidade de resposta cruzada entre os antígenos NY-ESO-1 e LAGE-1, ou seja, verificar se o anticorpo anti-NY-ESO-1 seria capaz de reconhecer também a proteína LAGE-1, foram utilizados em ensaios de *Western blot*, os extratos protéicos de linhagens tumorais positivas para LAGE-1 e negativas para NY-ESO-1 (avaliados por RT-PCR) e o anticorpo E978 anti-NY-ESO-1.

Para identificar as linhagens celulares de MM que expressassem LAGE-1 e/ou o NY-ESO foram realizados experimentos de RT-PCR com primers específicos para estes antígenos (quadro 3). Em tubos de 0,2mL foram adicionados 1µL de cDNA, 1x PCR buffer, 1mM MgCl₂, 0,2µM dNTPs, 10pmol de cada primer (tanto o direto como o reverso), e 1,25U de Taq Platinum DNA Polimerase (*Invitrogen*). O volume final de reação foi de 25µL.

O *Western blot* foi realizado utilizando-se os extratos protéicos totais das linhagens celulares SKBR3, H1299, HaCat e U266. Em um *pellet* de 500.000 células das linhagens celulares SKBR3, H1299, HaCat e U266 foi adicionado 300µL de tampão de lise 2X (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% *Glycerol*, 0,1% *Bromophenol Blue*). Após a ressuspensão das células, o lisado foi colocado no gelo por 3 minutos. Estes foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Em cada canaleta do gel foi aplicado 40µL do lisado protéico. No gel, também foi aplicado 8µL do padrão de peso molecular *Precision Plus Protein Standards – Kaleidoscope (BIO-RAD)*, como marcador.

Após o SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF *Hybond-P (Amersham Biociences)*, foi adicionado o anticorpo primário anti-NY-ESO-1 na concentração final de 0,4µg/ml.

Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti IgG humana na diluição 1:20.000, o volume final foi de 500µL para cada amostra [na amostra controle foi usado o anticorpo secundário α -mouse IgG *Horseradish Peroxidase Conjugated – anti-mouse (Amersham Biociences)*].

Para evidenciar a proteína NY-ESO-1 na membrana, foi utilizado o kit *ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham)*, na proporção 1:1,

sendo as soluções do *ECL* o substrato da peroxidase presente no anticorpo secundário. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme radiográfico *Hyperfilm ECL* (Amersham Biociences) por 3 minutos. Rapidamente, os filmes foram revelados (revelador Kodak), lavados em água corrente e fixados (fixador Kodak).

Para certificar-se de que em todas as canaletas foram adicionados extratos protéicos foi realizado um *Western Blot* para a proteína α/β Tubulina (50-60 KDa). Foram utilizados o anticorpo primário α/β Tubulina (50-60 KDa) *Rabbit Polyclonal* (Cell Signaling), na diluição de 1:1.000 (volume final de 6ml); e o anticorpo secundário *Anti-Rabbit* na diluição 1:4.000 (volume final de 12ml).

Quadro 3. (seqüência de *primers* e ciclos da RT-PCR).

GENE	SEQÜÊNCIA DE PRIMER	FRAGMENTO (PB)	REFERÊNCIA	CICLOS DA RT-PCR
GAGE (F) GAGE (R)	5'-TATGCGGCCCCGAGCAGTT-3' 5'-CCTGCCCATCAGGACCATC-3'	209	Andrade et al, 2008	Desnaturação: 94°C, 2 minutos 94°C, 45 segundos 60° C, 45 segundos 72°C, 1 minuto Extensão: 72°, 7 minutos 30 ciclos
MAGE A3/6 (F) MAGE A3/6 (R)	5'-GAAGCCGGCCCAGGCTCG-3' 5'-GGAGTCCTCATAGGATTGGCT-3'	423	Jungbluth et al, 2005	Desnaturação: 94°C, 2 minutos 94°C, 45 segundos 60° C, 45 segundos 72°C, 1 minuto Extensão: 72°, 7 minutos 35 ciclos
NY-ESO-1 (F) NY-ESO-1 (R)	5'-CCCCACCGCTTCCCGTG-3' 5'-CTGGCCACTCGTGCTGGGA -3'	275	van Baren, 1999	Desnaturação: 94°C, 2 minutos 94°C, 45 segundos 60° C, 45 segundos 72°C, 1 minuto Extensão: 72°, 7 minutos 35 ciclos
MAGE C1/CT7 (F) MAGE C1/CT7 (R)	5'-GACGAGGATCGTCTCAGGTCAGC-3' 5'-ACATCCTCACCTCAGGAGGG-3'	632	Jungbluth et al, 2005	Desnaturação: 94°C, 2 minutos 94°C, 45 segundos 63° C, 45 segundos 72°C, 1 minuto Extensão: 72°, 7 minutos 35 ciclos
LAGE-1 (F) LAGE-1 (R)	5'-CTGCGCAGGATGGAAGGTGCCCC-3' 5'-GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGC-3'	332/561	Wang et al, 2004	Desnaturação: 94°C, 2 minutos 94°C, 45 segundos 60° C, 45 segundos 72°C, 1 minuto Extensão: 72°, 7 minutos 35 ciclos

5. Resultados e Discussão

5.1. Extração de RNA e síntese e cDNA.

A extração dos RNAs das 21 amostras de medula óssea e a síntese de cDNAs foram bem sucedidas.

As quantidades de RNA obtidas variaram de 5 a 500µg. Após a eletroforese em gel de agarose, foram considerados RNAs de boa qualidade aqueles que apresentaram bandas nítidas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S (Figura 1). Todas as 21 amostras apresentaram RNA de boa qualidade e prosseguiram no estudo.

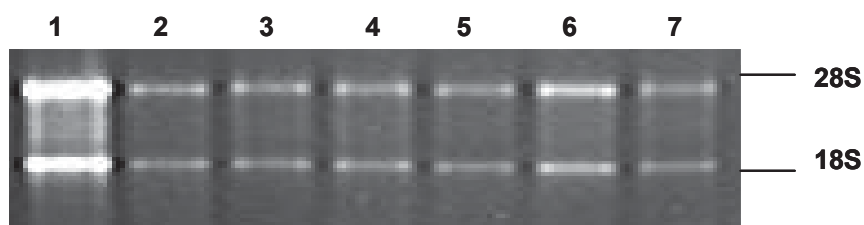


Figura 1. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo contendo 1µg de RNA obtido de 7 casos incluídos no estudo

Cerca de 2µg de cada RNA foram utilizados para a síntese de moléculas de cDNA e a qualidade dos produtos obtidos foi avaliada por meio de RT-PCR utilizando *primers* para o gene *GAPDH*. Para todas as amostras utilizadas no estudo foi obtida a amplificação, o que demonstra que para todas elas foi possível conseguir uma boa eficiência na síntese do cDNA (Figura 2).

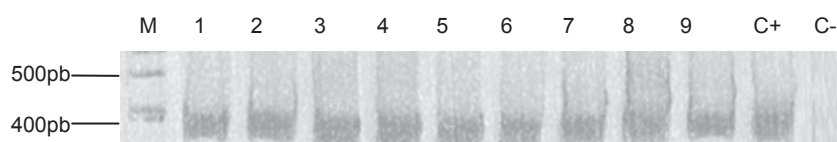


Figura 2. Checagem da síntese de cDNA. Amplificação do fragmento de 378 pb do gene *GAPDH*. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.. Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 9 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas apresentando amplificação eficiente, demonstrado pela presença das bandas de 378 pb. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)

5.2. Análise da Expressão dos CTs.

A análise de expressão por RT-PCR dos 5 CTs de interesse, realizada em 21 amostras de medula total de pacientes com MM, demonstrou as seguintes frequências: *CT7* (42,9%), *LAGE-1* (23,8%), *MAGEA3/6* (19%), *GAGE* (19%) e *NY-ESO-1* (4,8%).

A presença de banda na canaleta “C+” (controle positivo) demonstra que a RT-PCR deu certo e a ausência de banda na canaleta “No” (controle negativo) mostra que não houve contaminação com outro DNA na reação. A presença ou ausência de bandas nas demais canaletas mostra a expressão positiva ou negativa, respectivamente, das amostras para os 5 genes de interesse, como pode ser verificado nas figuras de 3 a 7.



Figura 3. Amplificação do fragmento de 632 pb do gene *CT7*. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)



Figura 4. Amplificação dos fragmentos de 332 pb e 561 pb do gene *LAGE-1*. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)

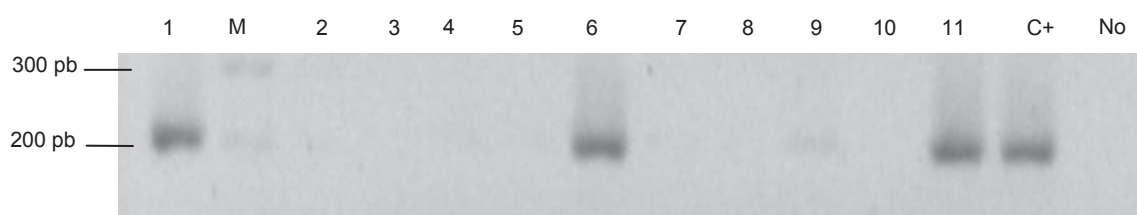


Figura 5. Amplificação do fragmento de 209 pb do gene *GAGE-1*. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)

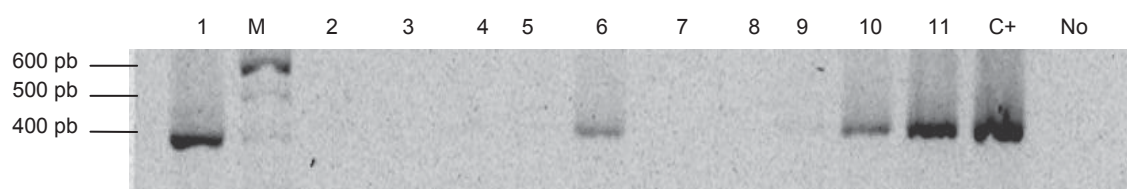


Figura 6. Amplificação do fragmento de 423 pb do gene *MAGEA3/6*. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA).



Figura 7. Amplificação do fragmento de 275 pb do gene *NY-ESO-1*. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)

Esta análise da expressão por RT-PCR dos cinco CTs de interesse, realizada em 21 amostras de medula total de pacientes com MM, somada com

a frequência de expressão destes mesmos CTs avaliada anteriormente (análise total dos 60 casos de MM) demonstrou que estes CTs encontram-se freqüentemente expressos nos casos de MM (*CT7* 65%, *LAGE-1* 40%, *MAGEA3/6* 33%, *GAGE* 28% e *NY-ESO-1* 23%).

No estudo de Jungbluth et. al. (2005), também foi avaliada a expressão de alguns CTs em pacientes com MM, entre eles o *CT7*, para o qual encontrou expressão de 14/17 (82%), os CTs da família *MAGEA*, expresso em 8/10 (80%) e o gene *NY-ESO-1* foi avaliado, sendo positivo em 2/7 (28%) das amostras. Van Baren et. al. também avaliaram a expressão de antígenos câncer/testículo em 27 pacientes com MM, e encontraram os seguintes resultados: *LAGE-1* 52%, *GAGE-1* 41%, *NY-ESO-1* 31%, *MAGEA3* 31%, *MAGEA6* 28%. Estes estudos apresentaram resultados diferentes provavelmente por utilizarem casuísticas menores.

De qualquer forma, estes resultados somados aos nossos demonstram que os antígenos câncer/testículo *CT7*, *LAGE-1*, *MAGEA3/6*, *GAGE* e *NY-ESO-1* são freqüentemente expressos em MM e podem ser bons candidatos à imunoterapia.

5.3. Detecção da resposta humoral espontânea anti-MAGEC1(CT-7)

O passo seguinte do estudo foi avaliar se existe resposta humoral espontânea contra o antígeno *CT7* nos pacientes com MM. Para isto, a capacidade dos soros dos pacientes com MM ao diagnóstico (utilizados como anticorpo primário) em reconhecer a proteína *CT7* presente no extrato protéico total da linhagem celular U266 (que expressa o gene *CT7*) foi avaliada através de ensaios de *Western Blot*.

No entanto, só foi possível verificar banda na canaleta em que o anticorpo *CT7.33* foi utilizado como controle positivo (canaleta C+). Nas demais canaletas, referentes aos soros dos pacientes, não foi possível verificar bandas, sendo apenas observados rastros. Uma possível explicação para este fato seria a ocorrência de ligações inespecíficas entre outros anticorpos presentes no soro dos pacientes e diferentes proteínas do extrato protéico total da linhagem celular humana U266 (figura 8).

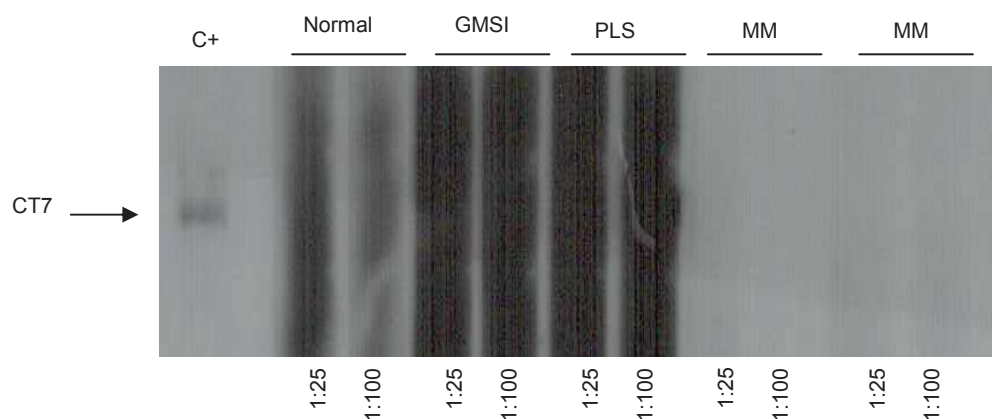


Figura 8. *Western Blot* para proteína CT7 124 KDa. C+: amostra controle (anticorpo primário CT7.33 *mouse monoclonal*); nas demais canaletas estão presentes os extratos protéicos da linhagem celular U266 hibridizados com os soros dos pacientes (anticorpo primário) e anticorpo anti-IgG humana (anticorpo secundário). GMSI: Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; PLS: Plasmocitoma Solitário; MM: Mieloma Múltiplo. Tempo de exposição: 1min.

Para tentar minimizar o reconhecimento destas outras proteínas presentes no extrato protéico total por diferentes anticorpos presentes nos soros dos pacientes, tentou-se utilizar diferentes diluições dos soros (de 1:25 e 1:100 para 1:100 e 1:250). Porém, o mesmo padrão foi verificado, ou seja, rastros ao invés de bandas nas canaletas que continham as amostras de soro (figura 9).. O *Western Blot* realizado para a proteína α/β -Tubulina mostrou bandas de tamanho esperado em todas as canaletas (figura 10)

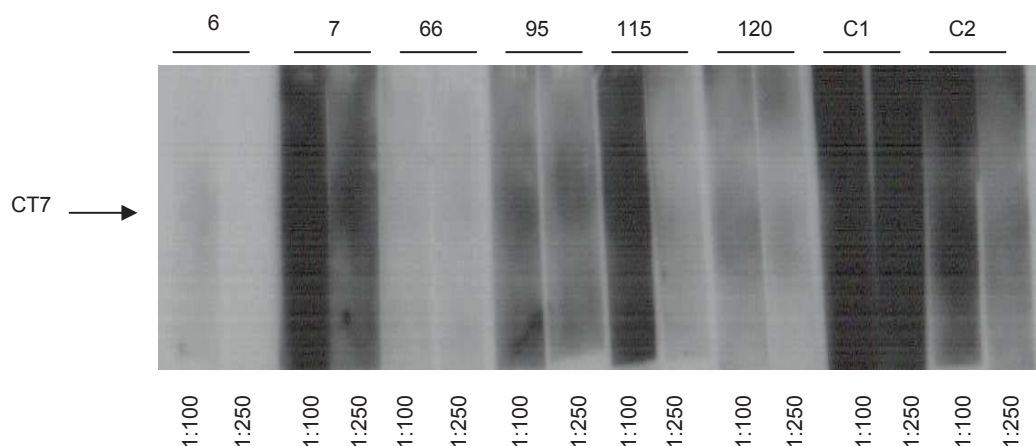


Figura 9. *Western Blot* para proteína CT7 124 KDa. C+: amostra controle (anticorpo primário CT7.33 *mouse monoclonal*); nas demais canaletas estão presentes os extratos protéicos da linhagem celular U266 hibridizados com os soros dos pacientes (anticorpo primário) e anticorpo anti-IgG humana (anticorpo secundário). GMSI: Gamopatia de Significado Indeterminado; PLS: Plasmocitoma Solitário; MM: Mieloma Múltiplo. Proteína α/β -Tubulina 50-60 KDa. Nas canaletas 1 a 8 estão presentes os extratos protéicos da linhagem celular U266 hibridizados com a proteína α/β -Tubulina (anticorpo primário) e anticorpo *Anti-Rabbit* (anticorpo secundário). Tempo de exposição: 3min.



Figura 10. *Western Blot* para proteína α/β -Tubulina 50-60 KDa. Nas canaletas 1 a 8 estão presentes os extratos protéicos da linhagem celular U266 hibridizados com a proteína α/β -Tubulina (anticorpo primário) e anticorpo *Anti-Rabbit* (anticorpo secundário). Tempo de exposição: 3min.

Para evitar este tipo de ligação inespecífica entre os soros e o extrato protéico, considerou-se que a expressão e purificação da proteína recombinante deste CT seria a solução mais adequada. Esta possibilidade será explorada por outros pesquisadores do grupo.

5.4. Detecção da resposta cruzada entre os antígenos NY-ESO-1 e LAGE-1

Atualmente, estudos clínicos em diferentes tipos tumorais estão em andamento utilizando vacina anti-NY-ESO-1 (Morgan et. al. 2006). Em MM, NY-ESO-1 está expresso em cerca de 20% dos casos, enquanto LAGE-1 pode ser detectado em 40% dos pacientes. As proteínas NY-ESO-1 e LAGE-1 apresentam 84% de similaridade em suas seqüências de aminoácidos. Portanto, uma vacina que reconhecesse estes 2 antígenos poderia ser utilizada em cerca de 60% dos portadores de MM. Diante disto, nos propusemos a verificar a possibilidade de o anticorpo anti-NY-ESO-1 (E987), no qual a vacina esta baseada, também reconhecer a proteína LAGE-1. Para isto foram realizados ensaios de *Western blot* utilizando extratos protéicos de linhagens celulares positivas para LAGE-1 e negativas para NY-ESO-1 e o anticorpo anti-NY-ESO-1.

O primeiro passo desta análise foi identificar linhagens celulares positivas para LAGE-1 e/ou para NY-ESO-1. A análise de expressão dos genes *LAGE-1* e *NY-ESO-1* foi realizada através de RT-PCR em 14 linhagens celulares: PC0a, O13, HCT, H1299, MDA, O28, HL60, K562, SKBR, DLD1, TH7D, HTB79, A549 e HaCat. Esta análise mostrou que SKBR expressa somente *LAGE-1*, H1299 e TH7D expressam somente *NY-ESO-1* e HaCat, PC0a, O13, HCT, H1299, MDA, O28, HL60, K562, SKBR, DLD1 e A549 não expressam nenhum dos 2 genes (figura 11).

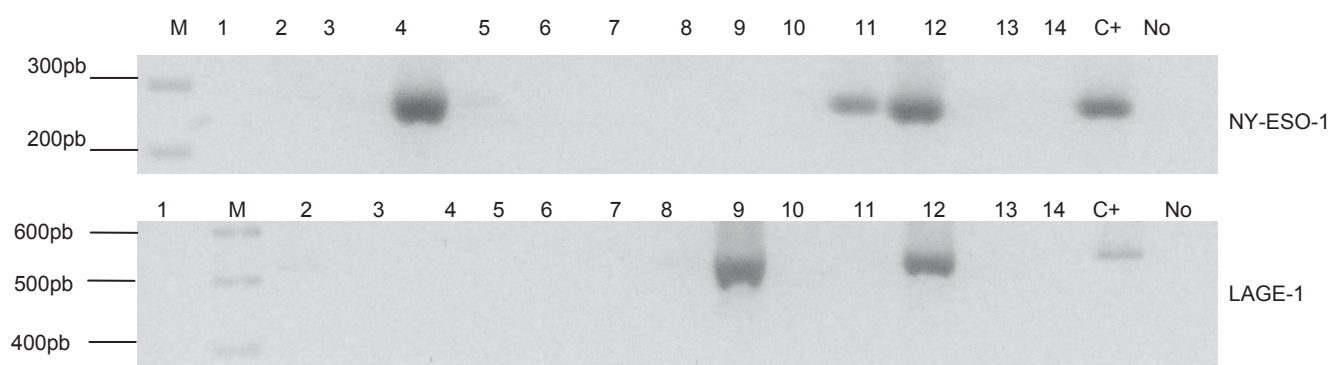


Figura 11. Amplificação dos fragmentos de 275 pb e 561 pb dos genes *NY-ESO-1* e *LAGE-1*, respectivamente. Gel de agarose 2% corado com *Sybr Green* (0,1µL/mL). Na canaleta M está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 1 a 14 estão presentes as amostras de cDNAs das linhagens tumorais PC0a, O13, HCT,

H1299, MDA, O28, HL60, K562, SKBR, DLD1, TH7D, HTB79, A549, HaCat respectivamente. C+: controle positivo da reação (linhagem celular U266) e C-: controle negativo (sem cDNA)

Sendo assim, as linhagens SKBR3, H1299, HaCat e U266 foram escolhidas para o prosseguimento do estudo. O *Western blot* realizado utilizando-se os extratos protéicos totais destas linhagens celulares tumorais mostrou que o anticorpo E978 anti-NY-ESO-1 só foi capaz de reconhecer o antígeno NY-ESO, não detectando a presença de LAGE-1 (figura 12).

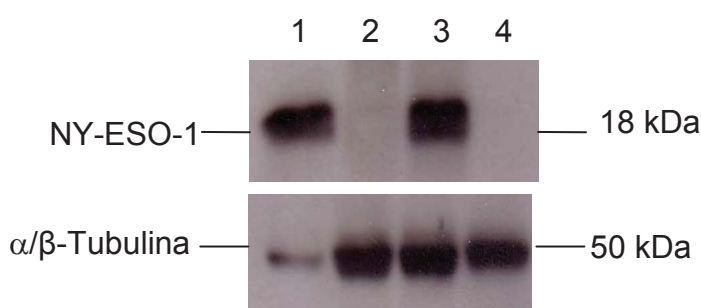


Figura 12. *Western Blot* para a proteína NY-ESO-1 18 KDa. Nas canaletas de 1 a 4 estão presentes os extratos protéicos das linhagens celulares U266, SKBR, H1299 e HaCat, respectivamente, hibridizados com o anticorpo primário E978 anti-NY-ESO-1 e anticorpo anti-IgG humana (anticorpo secundário). Proteína α/β -Tubulina 50-60 KDa. Nas canaletas 1 a 4 estão presentes os extratos protéicos das linhagens celulares U266 (positiva para os dois genes), SKBR (positiva somente para *LAGE-1*), H1299 (positiva somente para *NY-ESO-1*) e HaCat (negativa para os dois genes), respectivamente, hibridizados com o anticorpo hibridizados com a proteína α/β -Tubulina (anticorpo primário) e anticorpo *Anti-Rabbit* (anticorpo secundário). Tempo de exposição: 3min.

Portanto, outro *Western Blot* foi realizado para explorar a possibilidade de resposta cruzada entre os antígenos LAGE-1 e NY-ESO-1, usando o anticorpo E978, anti-NY-ESO-1, e as linhagens celulares SKBR (expressão positiva somente para *LAGE-1*), H1299 (expressão positiva somente para *NY-ESO-1*), HaCat (expressão negativa para os dois antígenos) e U266 (expressão positiva para os dois antígenos).

Ainda que as proteínas LAGE-1 e NY-ESO-1 apresentem seqüências de aminoácidos e de RNAm muito parecidas, o anticorpo E978, anti-NY-ESO-1, não foi capaz de reconhecer a proteína LAGE-1, indicando que os pacientes com MM que expressem somente LAGE-1 não poderiam se beneficiar com o uso desta vacina.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os antígenos câncer/testículo (CTs) avaliados encontram-se freqüentemente expressos nos casos de mieloma múltiplo, sendo as porcentagens finais encontradas (somando-se os resultados deste estudo e os obtidos por Andrade et al) de *CT7* 65%, *LAGE-1* 40%, *MAGEA3/6* 33%, *GAGE* 28% e *NY-ESO-1* 23%.
- A metodologia utilizada não foi capaz identificar resposta imune humoral espontânea contra antígeno *CT7* nas amostras dos pacientes com mieloma múltiplo ao diagnóstico.
- O anticorpo anti-*NY-ESO-1* não foi capaz de reconhecer o antígeno *LAGE-1* expresso nas linhagens SKBR e U266, indicando que, apesar do alto grau de similaridade entre as proteínas *LAGE-1* e *NY-ESO-1*, não há resposta cruzada mediada por este anticorpo.

7. Referências Bibliográficas

Andrade VCC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MSS, Carvalho F, Oliveira JSR, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GWB. Prognostic impact of cancer testis antigens expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 2008;8:2.

Atanackovic D, Matsuo M, Ritter E, Mazzara G, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Old LJ, Gnjatich S. Monitoring CD4+ T cell responses against viral and tumor antigens using T cells as novel target APC. *J Immunol Methods.* 2003;278(1-2):57-66.

Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, Gnjatich S, Schnieders F, Bartels K, Schilling G, Faltz C, Wolschke C, Dierlamm J, Ritter G, Eirmann T, Hossfeld DK, Zander AR, Jungbluth AA, Old LJ, Bokemeyer C, Kröger N. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2007;109:1103-1112.

Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA. Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Modern Pathology* 2005;18:119-126.

Chng WJ, Lau LG, Yusof N, Mow BMF. Targeted therapy in multiple myeloma. *Cancer Control* 2005;12:91-104.

Cho HJ, Caballero OL, Gnjatich S, Andrade VCC, Colleoni GW, Vettore AL, Outtz H, Fortunato S, Altorki N, Ferrera CA, Chua R, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Simpson AJG. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immunity* 2006;6:12.

Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, Vos JD, Baudard M, Moehler T, Pantescio V, Moos M, Schved JF, Rossi JF, Rème T, Goldschmidt H, Klein B. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *The Journal of Immunology* 2007;178:3307-3315.

Costa FF, Blanc KL, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007;25:707-711.

Curioni-Fontecedro A, Knights AJ, Tinguely M, Nuber N, Schneider C, Thomson CW, von Boehmer L, Bossart W, Pahlich S, Gehring H, Moch H, Renner C, Knuth A, Zippelius A. MAGE-C1/CT7 is the dominant cancer-testis antigen targeted by humoral immune responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2008 Mar 6; [Epub ahead of print]

Jungbluth AA, Ely S, Diliberto M, Niesvizky R, Williamson B, Frosina D, Chen YT, Bhardwaj N, Chen-Kiang S, Old LJ, Cho HJ. The cancer-testis antigens

CT7 (MAGEC1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood* 2005;106:167-174.

Jungbluth AA, Wilson A. Silva Jr., Kristin Iversen, Denise Frosina, Bushra Zaidi, Keren Coplan, Susannah K. Eastlake-Wade, Sandra B. Castelli, Giulio C. Spagnoli, Lloyd J. Old1 and Martin Vogel. *Cancer Immunity* 2007; vol 7, p.15

Li QB, Chen ZC, You Y, Zou P. Small interfering RNA of cyclooxygenase-2 induces growth inhibition and apoptosis independently of Bcl-2 in human myeloma RPMI8226 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2007;28:1031-1036.
Lucas S, Smet CD, Arden KC, Viars CS, Lethé B, Lurquin C, Boon T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Research* 1998;58:743-752.

Ludwig H. Advances in biology and treatment of multiple myeloma. *Annals of Oncology* 2005;16:106-112.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* 2006; 314, 126.

Nadav L, Katz BZ, Baron S, Cohen N, Naparstek E, Geiger B. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res* 2006;66:8608-8616.

Parmigiani RB, Bettoni F, Vbranovski MD, Lopes MH, Martins WK, Cunha IW, Soares FA, Simpson AJG, Souza SJ, Camargo AA. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *PNAS* 2006;103:18066-18071.

Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2007 Sep;138(5):563-79. Review.

Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, Jack AS, Morgan GJ. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol.* 1998 Jan;100(1):176-83.

Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ. The cancer/testis genes:review, standardization, and commentary. *Cancer Immunity* 2004;4:1.

Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews* 2005;5:615-625.

Stevenson BJ, Iseli C, Panji S, Zahn-Zabal M, Hide W, Old LJ, Simpson AJG, Jongeneel CY. Rapid evolution of cancer/testis gene on the X chromosome. *BMC Genomics* 2007;8:129.

Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Okamoto M, Mimori K, Mori M. Expression of cancer-testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 2004;11:934-940.

van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, André M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. 1999; 94:1156-64.

Wang Y, Wu XJ, Zhao AL, Yuan YH, Chen YT, Jungbluth AA, *et al*. Cancer/testis antigen expression and autologous humoral immunity to NY-ESO-1 in gastric cancer. *Cancer Immun*. 2004; 4:11.

White DJ, Paul N, Macdonald DA, Meyer RM, Shepherd LE. Addition of lenalidomide to melphalan in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma: the national cancer institute of Canada clinical trials group MY.11 trial. *Current Oncology* 2007;14:61-65.

Anexo 1. Coorte de 60 pacientes com MM e que apresentam amostras de soro e RNA

Paciente	Iniciais	Registro Hospitalar	Sexo	Idade	Isotipo	Cadeia Leve	% cel tumor	Estádio	Situação	Seguimento Meses	TMO	B2MG	Alb	ISS	MAGEA3/6	MAGECICT7	GAGE família	LAGE I	NY-ESO-1
2	EFV	10028353	M	50	IgG	κ	95	IIIA	vivo	61		3,9	2,81	2					
3	FTA	1007227	F	72	IgA	λ	90	IIIA	vivo			7,1	4,06	3					
4	MSX	10030851	F	71	IgG	λ	90	IIIB	vivo	61		3,4	1,44	2					
6	MGA	10032339	F	65	IgA	λ	95	IIIB	óbito	12		18	3,73	3					
7	AAB	10030155	M	61	IgG	κ	80	IIIB	óbito	13		32,7	4,52	3					
9	TAJS	10032485	F	40	IgG	κ	60	IIIA	óbito	40		2	4,53	1					
14	EAS	10038985	F	43	-	κ	95	IIIB	óbito	11		19,8	4,22	3					
15	JCAV	10040019	M	48	IgG	κ	90	IIIA	vivo	57	sim	2,3	3,56	1					
19	ABS	10041724	M	51	IgA	κ	90	IIIB	vivo	55		10	2,32	3					
20	NMN	10036417	F	42	IgG	λ	60	IIIA	óbito	25	sim	1,5	2,77	2					
31	CF	10043843	M	31	-	κ	90	IIIA	vivo	54	sim	4	4,25	2					
42	RGF	10048725	M	74	IgG	κ	15	IIA	vivo	52		4,3	3,81	2					
46	MLB	10052200	F	60	IgG	κ	80	IIIA	óbito	6		2	2,22	2					
47	DSMS	999868	F	69	IgG	κ	60	IIIA	vivo	51		6,8	2,74	3					
48	LMS	10053118	F	59	-	κ	90	IIIB	óbito	0		15,7	2,97	3					
49	LPS	10053158	F	57	IgA	λ	90	IIIB	óbito	4		33	2,43	3					
53	AGS	1004648	M	60	IgG	κ	95	IIIA	óbito	1		7,2	2,06	3					
54	JAP	10054555	M	80	IgG	κ	90	IIIA	óbito	7		7,5	2,95	3					
55	AS	10018367	M	79	IgA	λ	98	IIIA	óbito	14		11,3	3,48	3					
56	ALR	10059300	M	62	IgA	κ	40	IIIA	óbito	5		8,5	2,66	3					
58	MMLS	10053860	M	30	-	λ	95	IIIA	vivo	49	sim	4,7	4,1	2					
59	JSS	10059694	M	60	IgG	κ	95	IIIA	vivo	48		2,6	3,32	2					
61	LAM	10060487	M	55	-	λ	10	IIIA	óbito	4		1,6	3,55	1					
63	MO	10063931	M	53	IgG	κ	60	IIIA	vivo	47	sim	3,8	4,31	2					
66	RS	10064462	M	51	-	κ	90	IIIA	óbito	12		4	3,44	2					

72	NT	10065818	M	62	IgG	λ	80	IIIA	óbito	12		5,2	3,44	2			
83	BBS	10040407	M	55	IgG	κ	70	IIIB	óbito	1		5	2,1	2			
85	MFA	10074617	M	77	IgG	λ	50	IIIB	óbito	1		3,8	2,49	2			
86	FPF	10075206	F	79	IgG	κ	80	IIIA	óbito	1		NA	2,6	NA			
88	MCAR	10075837	F	76	IgG	κ	60	IIIA	óbito	21		1,2	2,25	2			
90	MAMF	10035677	F	78	IgA		50	IIIB	óbito	0		NA	NA	NA			
91	JBL	10070412	F	76	IgG	κ	90	IIIB	vivo	41		63,7	3,56	3			
92	RSA	10075933	M	64	IgG	κ	30	IIIA	vivo	40	sim	NA	3,6	NA			
95	JN	10086877	M	51	IgG	κ	70	IIIB	óbito	3		8	3,4	3			
98	SGB	10095733	F	71	IgA	κ	40	IIIA	vivo	35		2,8	4,27	1			
100	MVPL	861891	F	66	-	λ	50	IIIA	vivo	35		2,4	4,35	1			
101	JCF	1005003	F	68	-	κ	<10	IIA	abandonou			1,7	4,45	1			
105	IC	10098508	M	75	IgG	λ	70	IIIA	óbito	16		2,8	4,42	1			
107	JS	10098990	F	54	IgG	κ	90	IIIA	óbito	7		2	4,99	1			
112	CMS	601960	F	52	IgG	κ	20	IIIA	abandonou	-		2,9	3,74	1			
114	GMM	1883119	M	79	IgG	κ	95	IIIA	óbito	23		5,7	1,82	3			
115	ORD	10110131	M	63	IgA	λ	90	IIIB	óbito	14		2,8	2,92	2			
117	MLO	1177720	F	75	IgA	κ	90	IIIB	abandonou			26,2	3,07	3			
118	JPC	10114253	M	65	IgA	κ	70	IIIB	óbito	22		8,3	3,86	3			
119	JTN	10117137	M	62	IgG	λ	80	IIIA	vivo	27		NA	3,1	NA			
120	EMM	10108438	F	76	IgA	κ	98	IIIA	óbito	1		10	3,64	3			
121	AAC	10118985	F	61	-	λ	100	IIIB	óbito	1		127	3,46	3			
124	AC	10124178	M	75	IgA	κ	90	IIIA	vivo	25							
126	MRB	10011272	F	27	IgA	λ	20	IA	abandonou			3,9	3,51	2			
130	AG	10126304	M	70		λ	80	IIIB	vivo	25		9,9	3,95	3			
131	MBO	10115435	M	74	IgG	κ	30	IA	vivo	24		4,6	4,16	2			
139	ALPPE	10130112	F	51	IgG	λ	30	IIIA	vivo	23	sim	10,2	3,35	3			
140	GMM	10120063	F	78	IgG	λ	60	IIIA	abandonou			22,3	2,27	3			

Anexo 2. Termo de consentimento pós-informado (Mieloma Múltiplo).**Genoma Clínico do Câncer - Mieloma Múltiplo
Termo de Consentimento Pós-Informação**

Você está sendo admitido(a) neste hospital para o tratamento de doença da medula óssea. Como parte de seu tratamento, você será submetido a um exame de sangue, punção e biópsia na qual se retirará um fragmento de sua medula óssea onde está o tumor. Este sangue e o material obtido do aspirado e biópsia de medula óssea são utilizados em exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. Nestes exames sempre há sobra de material que se torna sem utilidade.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças da medula óssea, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica-científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes.

Este material restante, que não seria utilizado para diagnóstico, será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo nº xxxx, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital.

Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética da UNIFESP/EPM – Rua Botucatu, 572, 1º andar cj 14. Fone 5571-1062, FAX 5539-7162.

Assinatura do(a) paciente ou Representante Legal: _____

Nome do(a) paciente : _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____