

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**AVALIAÇÃO E PADRONIZAÇÃO  
DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DA  
TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA  $t(11;18)(q21;q21)$   
EM PORTADORES DE LINFOMA MALT GÁSTRICO**

**KARINE SAMPAIO LIMA**

**Belo Horizonte  
2011**

**KARINE SAMPAIO LIMA**

**AVALIAÇÃO E PADRONIZAÇÃO  
DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DA  
TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA  $t(11;18)(q21;q21)$   
EM PORTADORES DE LINFOMA MALT GÁSTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Drummond Lage Wainstein.

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais**

**2011**

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Clélio Campolina Diniz

**Vice-Reitora:** Prof<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Ricardo Santiago Gómez

**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof. Renato de Lima Santos

### **FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG**

**Diretor da Faculdade de Medicina:** Francisco José Penna

**Vice-Diretor da Faculdade de Medicina:** Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.**

**Chefe do Departamento de Clínica Médica:** Prof<sup>a</sup>. Anelise Impelziere Nogueira

**Coordenadora do Programa:** Prof<sup>a</sup>. Teresa Cristina Abreu Ferrari

**Subcoordenadora do Programa:** Prof<sup>a</sup>. Valéria Maria de Azeredo Passos

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:**

Prof<sup>a</sup>. Tereza Cristina A. Ferrari (Titular) / Eduardo Garcia Vilela (Suplente)

Prof<sup>a</sup>. Valéria Maria A. Passos (Titular) / Flávia Vasques Bittencourt (Suplente)

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Titular) / Luciana Dias Moretzsohn (Suplente)

Prof<sup>a</sup>. Suely Meireles Rezende (Titular) / Nilton Alves Rezende (Suplente)

Prof. Francisco Eduardo C. Cardoso (Titular) / Sandhi Maria Barreto (Suplente)

Prof. Marcus Vinícius M. de Andrade (Titular) / Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Suplente)

William Pedrosa de Lima (Disc. Titular) / Pollyanna Barros Batista (Disc. Suplente)

Dedico esta vitória aos meus pais,  
principais responsáveis por minha formação e crescimento,  
pessoas admiráveis em essência,  
que sempre me apoiaram  
e transmitiram esperança, força e perseverança.

Às minhas irmãs e ao meu amor,  
pela presença, estímulo constante  
e por sempre valorizarem meu trabalho.

Aos meus orientadores e demais envolvidos,  
por todo o entusiasmo, incentivos e parceria,  
obrigada pela confiança.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, exemplo de dedicação e sabedoria ímpar, por todas as oportunidades e por sempre acreditar no meu potencial. Por sua paciência e pelos valiosos ensinamentos ao longo de todo o período em que convivemos.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Drummond Lage Wainstein, coorientadora do trabalho, pelo apoio, carinho e, principalmente, por sua preciosa amizade.

Ao Dr. Alberto Julius Alves Wainstein, pelo constante apoio, motivação e transmissão de seus conhecimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Irma Rosa Slavutsky, por compartilhar seus conhecimentos com carinho e atenção e contribuir significativamente para o desenho e desenvolvimento do estudo.

À Dr<sup>a</sup>. Sandra Guerra Xavier e à Valéria Cristina Câmara, pela disponibilidade, atenção e contribuição no estudo.

À querida Natássia Caroline, por toda a dedicação, tempo desprendido, ensinamentos e colaboração ativa na pesquisa.

À Faculdade de Medicina e ao Hospital das Clínicas da UFMG, professores, funcionários e todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

À FAPEMIG agradeço pelo apoio financeiro a este estudo.

A todos os integrantes do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG e acadêmicos envolvidos, pelo auxílio, participação e convivência.

Aos pacientes voluntários, que aceitaram participar desta pesquisa.

Aos meus eternos amigos, que estiveram sempre presentes na minha vida.

À minhas irmãs, Nicole e Bruna, pela amizade infinita, companheirismo e pelas palavras de carinho e estímulo.

Ao Rodrigo, meu grande amor, por toda uma vida ao meu lado, pelo eterno apoio, carinho, motivação e paciência.

Aos meus pais, Wallace e Naiara, pelo amor incondicional, incentivo e carinho inestimável, presentes em cada etapa da minha vida. Obrigada por sempre terem trilhado de mãos dadas comigo o caminho que escolhi, sempre comemorando comigo minhas conquistas e ensinando-me a superar os obstáculos e as dificuldades.

## RESUMO

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que se originam nas células do sistema linfático, divididos em dois grandes grupos: os linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin (LNH). Considerando o local de origem, podem ser classificados como nodais ou extranodais, sendo os extranodais originados em qualquer órgão contendo tecido linfoide associado à mucosa (MALT), também conhecidos como linfoma de zona marginal tipo células B. Os LNHs extranodais compõem até 1/3 dos linfomas em geral, o trato gastrointestinal é o local de mais alta incidência, sendo o estômago responsável por 60% dos casos. Os linfomas gástricos compreendem 2 a 8% das neoplasias gástricas, são as mais frequentes depois do adenocarcinoma (90 a 95%). A mucosa gástrica normal não possui tecido linfoide, porém estudos demonstraram que infecções por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) estimulam o desenvolvimento de agregados linfoides em 27,4 a 100% dos indivíduos infectados, o que pode dar origem ao linfoma MALT gástrico (LMG). Pacientes com LMG apresentam *H. pylori* em 85 a 92% dos casos. Estudos *in vitro* evidenciaram a proliferação de LMG de baixo grau de células B ao estímulo por cepas específicas de *H. pylori*. Pesquisas correlacionando essa infecção com o LMG apontaram que a erradicação do microrganismo induz a completa remissão em 70 a 80% das lesões precoces de LMG, entretanto, aproximadamente 25% desses casos não respondem à erradicação do *H. pylori*. A translocação cromossômica t(11;18)(q21;q21), encontrada em uma significativa porcentagem de LMG de baixo grau, demonstra condicionar a independência das células do linfoma ao estímulo antigênico, com a conseqüente não regressão do linfoma após erradicação do *H. pylori*. Essa translocação genética representa o rearranjo mais comum associado ao LMG. Este estudo objetivou implementar metodologias para detecção e análise da translocação t(11;18) em portadores de LMG a partir das técnicas de transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH). As amostras de tecido fresco foram coletadas e armazenadas em RNAlater. O RNA foi extraído com reagente Trizol e tratado com desoxirribonuclease previamente à síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) por transcrição reversa e PCR usando *primers* específicos para *API2-MALT1*. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2%. Identificou-se a translocação em 50% (4/8) dos casos; outros 3/8 revelaram ausência do rearranjo e evolução clínica com remissão completa do LMG após erradicação do microrganismo, condizente com o achado e com os estudos descritos ao longo do trabalho; um caso foi identificado como de alto grau também não portador da mutação. FISH foi executada para amostras em parafina empregando sonda para *API2-MALT1*, porém ainda não foi possível a completa padronização. Os resultados até o momento indicam a hibridização da sonda fluorescente à outras estruturas celulares que não a área de interesse e mais estudos deverão ser realizados. Embora pequena a amostra, foi possível a implementação de uma metodologia rotineira para identificação dessa mutação. Os resultados indicaram que a t(11;18) pode estar realmente relacionada à independência do LMG à erradicação do *H. pylori*. Estudos adicionais com um maior número de pacientes e caracterização por sequenciamento dos transcritos de fusão encontrados colaborarão para melhor compreensão de cada tipo de transcrito e esclarecimentos quanto à sua patogenicidade. O estudo molecular é essencial para identificação e diferenciação dessa alteração genética para intervir de forma terapêutica mais precoce e beneficiar a população brasileira carente de estudos moleculares sobre o LMG.

Palavras-chave: Linfoma de Zona Marginal Tipo Células B. Infecções por *Helicobacter*. *Helicobacter pylori*. Translocação Genética. Transcrição Reversa. Reação em Cadeia da Polimerase. Hibridização *In Situ* Fluorescente.

## ABSTRACT

Lymphomas are a heterogeneous group of malignancies that originate in the cells of the lymphatic system, divided into two major groups: Hodgkin's and non-Hodgkin lymphomas (NHL). Considering the place of origin, it can be classified as nodal or extranodal, being the extranodal originated in any organ containing the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), also known as marginal zone lymphoma of B cell type. The NHLs extranodal comprise up to 1/3 of lymphomas in general, the gastrointestinal tract is the site of highest incidence being the stomach responsible for 60% of cases. Gastric lymphomas comprise 2 to 8% of gastric tumors and are the most frequent after adenocarcinoma (90 to 95%). The gastric mucosa has no lymphoid tissue, but studies have shown that infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) stimulates the development of lymphoid aggregates in 27.4 to 100% of infected individuals, which may lead to gastric MALT lymphoma (GML). GML patients present *H. pylori* in 85 to 92% of cases. *In vitro* studies demonstrated the GML low-grade B-cell proliferation by stimulation of specific strains of *H. pylori*. Studies correlating this infection with GML showed that eradication of the microorganism induces complete remission in 70 to 80% of premature lesions of GML, however, approximately 25% of these cases do not respond to eradication of *H. pylori*. The chromosomal translocation t(11;18)(q21,q21), found in a significant percentage of low-grade GML, demonstrates conditional independence of lymphoma cells to antigenic stimulus, with consequent non-regression of lymphoma after eradication of *H. pylori*. This translocation gene represents the most common rearrangement associated with the GML. This study aimed to implement methodologies for detection and analysis of the t(11;18) in patients with GML from techniques of reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The fresh tissue samples were collected and stored in RNAlater. The RNA was extracted with Trizol, and treated with deoxyribonuclease prior to synthesis of the complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) by reverse transcription and PCR using specific *primers* for *API2-MALT1*. Electrophoresis was performed in 2% agarose gel. The translocation was identified in 50% (4/8) of cases, other 3/8 revealed the absence of the rearrangement and clinical complete remission of GML after the microorganism eradication, consistent with the finding and the studies described over the work; one case was identified as high-grade also not carrying the mutation. FISH was performed for paraffin samples using *API2-MALT1* probe, but it was not possible to complete standardization. The results obtained so far indicate that the fluorescent probe is hybridizing other cell structures than the area of interest and further studies should be undertaken. Despite the small sample, it was possible to implement a methodology for routine identification of this mutation. The results indicated that t(11,18) might be related to the independence of the GML to the eradication of *H. pylori*. Additional studies with a larger number of patients and characterization by sequencing of the fusion transcripts found will contribute to better understanding of each type of transcript and elucidation regarding its pathogenicity. The molecular analysis is essential for identification and differentiation of this genetic rearrangement to intervene in early therapeutic way and benefit the Brazilian population that lacks GML molecular studies.

**Keywords:** Lymphoma, B-Cell, Marginal Zone. *Helicobacter* Infections. *Helicobacter pylori*. Translocation, Genetic. Reverse Transcription. Polymerase Chain Reaction. In Situ Hybridization, Fluorescence.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitros
<b>API2</b>	<i>Apoptosis Inhibitor-2</i>
<b>AS</b>	<i>Anti-sense</i>
<b>BIR</b>	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat</i>
<b>CARD</b>	<i>Caspase recruitment</i>
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CG</b>	Citosina-Guanina
<b>CID</b>	Classificação Internacional de Doenças
<b>CME</b>	Central de Materiais e Esterilização
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>DD</b>	<i>Death domain</i>
<b>DEPC</b>	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
<b>dsDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico fita dupla
<b>EDA</b>	Endoscopia digestiva alta
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>E5</b>	Éxon 5
<b>E7</b>	Éxon 7
<b>ECOG</b>	<i>Easter Cooperative Oncology Group</i>
<b>EGILS</b>	<i>European Gastro-Intestinal Lymphoma Study</i>
<b>ETO</b>	Óxido de etileno
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (do inglês <i>fluorescent in situ hybridization</i> )
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HC</b>	Hospital das Clínicas
<b>IAG</b>	Instituto Alfa de Gastroenterologia

<b>IAP</b>	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>INCA</b>	Instituto do Câncer
<b>LH</b>	Linfomas de Hodgkin
<b>LMG</b>	Linfoma MALT gástrico
<b>LNH</b>	Linfomas não Hodgkin
<b>MALT</b>	Tecido linfoide associado à mucosa
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min. (')</b>	Minuto
<b>MLT</b>	<i>MALT lymphoma - associated translocation)</i>
<b>MMLV-RT</b>	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NCBI</b>	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NFκB</b>	Fator nuclear kappa-B
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	Par de base
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RT</b>	Transcriptase reversa
<b>RT-PCR</b>	Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>S</b>	Sense
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Tampão Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borate-EDTA
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal

**UFMG**      Universidade Federal de Minas Gerais  
**UV**        Ultravioleta  
**WHO**      *World Health Organization*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

FIGURA 1 - Modelo da patogênese do linfoma MALT gástrico.....	20
FIGURA 2 - Ideograma e cariótipos demonstrando a translocação entre o cromossomo 11 ( <i>API2</i> 11q21) e o cromossomo 18 ( <i>MLT</i> 18q21).....	22
FIGURA 3 - Os oncogenes envolvidos na t(11;18) do LMG são <i>API2</i> e <i>MALT1</i> , que originam um produto de fusão <i>API2-MALT1</i> .....	23
FIGURA 4 - Produto de fusão mais frequente em pacientes com LMG.....	23
FIGURA 5 - Perspectiva de conduta terapêutica para o LMG no HC-FMG.....	25
FIGURA 6 - Maceração do tecido fresco em gral com nitrogênio líquido.....	38
FIGURA 7 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade molecular.....	41
FIGURA 8 - Esquema representativo da transcrição reversa e síntese do cDNA a partir do molde de RNA.....	43
FIGURA 9 - Esquema representativo da PCR no primeiro ciclo.....	43
FIGURA 10 - Esquema representativo dos demais ciclos da PCR.....	44
FIGURA 11 - Representação do posicionamento dos <i>primers</i> utilizados no estudo para os genes <i>API2</i> e <i>MALT1</i> e os pontos de quebra conhecidos e sua frequência indicados por setas.....	45
FIGURA 12 - Imagens da execução da técnica PCR em termociclador e preparo da eletroforese em gel de agarose.....	52
FIGURA 13 - Imagens da execução da corrida de eletroforese em gel de agarose.....	52
FIGURA 14 - Esquema representativo da reação de hibridização <i>in situ</i> por método direto e indireto.....	54
FIGURA 15 - Imagens do preparo dos reagentes para a técnica FISH.....	56
FIGURA 16 - Metodologia de produção de lâminas para a técnica FISH.....	57
FIGURA 17 - Esquema representativo da leitura da hibridização da sonda <i>MALT1 Split Signal</i> , utilizada no estudo.....	60
FIGURA 18 - Gel de agarose a 1% mostrando a integridade das amostras de RNA...	63
FIGURA 19 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene <i>S15</i> nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de <i>primers</i> randômicos.....	64

FIGURA 20 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene <i>S15</i> nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de <i>primers</i> randômicos.....	65
FIGURA 21 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene <i>S15</i> nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de <i>primers</i> específicos para o gene.....	66
FIGURA 22 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene <i>API2-MALT1</i> (AS2) nas amostras F005, F006, F007 e F008.....	67
FIGURA 23 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene <i>API2-MALT1</i> (AS3) nas amostras F005, F006, F007 e F008.....	68
FIGURA 24 - Representação dos possíveis produtos de fusão <i>API2-MALT1</i> mais frequentes.....	69
FIGURA 25 - FISH com digestão enzimática a 37°C por 4' em diferentes amostras.	74
FIGURA 26 - FISH com digestão enzimática a 37°C, respectivamente, por 3' 8' e 10' em diferentes amostras.....	75
FIGURA 27 - FISH com digestão enzimática a 37°C, respectivamente, por 3' 6' e 10' em diferentes amostras.....	76

## **Quadros**

QUADRO 1 - Metodologia de Estudo.....	29
QUADRO 2 - Escala <i>status</i> de desempenho ECOG.....	32
QUADRO 3 - <i>Primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizados para o estudo.....	46
QUADRO 4 - <i>Primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizados na PCR.....	48
QUADRO 5 - Reagentes utilizados para FISH.....	56
QUADRO 6 - Quantificação de RNA extraído das amostras de tecido fresco.....	62
QUADRO 7 - Quantificação de RNA após purificação das amostras.....	63
QUADRO 8 - Perfil clínico dos pacientes portadores de LMG do grupo 2B.....	72

# SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Linfomas.....	15
1.2 Linfoma MALT e a infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
1.3 Cura pela erradicação do microrganismo.....	17
1.4 Resistência tumoral ao tratamento.....	18
1.5 Patogênese e conseqüente dano genético.....	19
1.6 A translocação t(11;18) (q21;q21).....	21
1.7 Cenário atual da conduta terapêutica do LMG.....	24
1.7.1 Perfil dos portadores de LMG do IAG-HC-UFG.....	26
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Amostra estudada.....	28
3.2 Aspectos éticos.....	30
3.3 Critérios de elegibilidade.....	30
3.3.1 Grupo 1 – tecido em parafina/LMG (-).....	30
3.3.2 Grupo 2A – tecido em parafina/LMG (+).....	31
3.3.3 Grupo 2B – tecido fresco/LMG (+).....	32
3.4 Seleção e recrutamento dos pacientes.....	33
3.4.1 Aplicação do TCLE e coleta de dados dos sujeitos de pesquisa.....	33
3.4.1.1 Aplicação do TCLE.....	33
3.4.1.2 Preenchimento do formulário de dados do paciente.....	34
3.5 Esterilização de materiais.....	34
3.5.1 Esterilização por calor úmido (autoclave).....	35
3.5.2 Esterilização em óxido de etileno (ETO).....	36
3.6 Coleta de tecido fresco tumoral do grupo 2B.....	36

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

3.7 Extração do RNA das amostras de tecido fresco.....	37
3.7.1 Preparo dos materiais.....	37
3.7.2 Descongelamento e recuperação das amostras armazenadas em <i>RNAlater</i> ®.....	37
3.7.3 Fragmentação das amostras para extração do RNA.....	37
3.7.4 Extração do RNA.....	39
3.7.5 Avaliação da integridade do RNA extraído.....	40
3.7.6 Tratamento com DNase.....	41
3.7.7 Fenol: clorofórmio.....	41
3.8 Pesquisa da translocação <i>API2-MALT1</i> por RT-PCR das amostras de tecido fresco.....	42
3.8.1 Reação de transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	42
3.8.2 Metodologia da RT-PCR.....	45
3.8.2.1 Preparo dos <i>primers</i> .....	46
3.8.2.2 Reação da transcriptase reversa (RT).....	47
3.8.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	47
3.8.2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	51
3.9 Metodologia estabelecida para pesquisa da translocação por FISH em tecidos incluídos em parafina.....	53
3.9.1 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	53
3.9.2 Metodologia da FISH.....	55
3.9.3 Produção das lâminas.....	57
3.9.4 Desparafinização das lâminas.....	58
3.9.5 Hibridização <i>in situ</i> .....	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 RT-PCR – Avaliação do tecido fresco.....	62
4.1.1 Aspectos clínicos.....	70
4.2 FISH – Avaliação do tecido parafinado.....	73
5 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS E APÊNDICES.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Linfomas

Os linfomas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que se originam nas células do sistema linfático, células B, T e NK (*natural killer*), divididos em dois grandes grupos: os linfomas de Hodgkin (LH), caracterizados pela presença de células linfoides de Reed-Sternberge, e linfomas não-Hodgkin (LNH), classificados em diferentes subtipos histológicos com características específicas e mais comumente encontrados.

Considerando o local de origem, os linfomas podem ser classificados como nodais ou extranodais, ambas as doenças com predomínio de origem nodal, sendo os extranodais muito raros na doença de Hodgkin (GUERMAZI *et al.*, 2001). Os linfomas nodais se originam dos linfonodos e podem disseminar-se através do sistema linfático. Já os linfomas extranodais podem ser secundários ou primários, com origem em qualquer órgão contendo tecido linfóide associado à mucosa (MALT). Os LNHs extranodais compõem até 1/3 dos linfomas em geral (FOON; FISHER, 1995).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2012 e 2013 preconizam a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer. Com exceção do câncer da pele não melanoma, os dez tipos mais incidentes são: câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago, cavidade oral, esôfago, bexiga, laringe, LNH e sistema nervoso central para o sexo masculino; e câncer de mama, colo do útero, cólon e reto, glândula tireóide, pulmão, estômago, ovário, útero, sistema nervoso central e LNH para o sexo feminino. Os dados estatísticos do INCA relatam a incidência estimada para 2012 de 195.190 novos casos de câncer para homens e 189.150 para mulheres, com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma. A incidência estimada para o câncer gástrico no Brasil para homens e mulheres é de, respectivamente, 12.670 (6,5%) e 7.420 (3,9%) novos casos. E para LNH é de 5.190 (2,7%) para homens e 4.450 (2,4%) para mulheres. O INCA revela ainda que o número de casos de LNH duplicou nos últimos 25 anos, principalmente entre pessoas com mais de 60 anos (INCA, 2012).

O trato gastrointestinal (TGI) é o local de mais alta incidência de LNH extranodais, sendo o estômago responsável por 60% dos casos (COSTA *et al.*, 2010). Os linfomas gástricos são as neoplasias de estômago mais frequentes depois do adenocarcinoma. Enquanto os adenocarcinomas chegam a atingir 90 a 95% dos tumores gástricos, os linfomas representam 2 a 8% deles (RADASZKIEWICZ *et al.*, 1992).

## **1.2 Linfoma MALT e a infecção por *Helicobacter pylori***

A primeira associação entre linfoma gástrico extranodal e a histogênese do MALT foi inicialmente descrita por Isaacson e Wright (1983). Posteriormente, diversos estudos sobre diferentes linfomas extranodais foram realizados visando à sua associação com o MALT. Desde então o linfoma MALT, também chamado de linfoma de zona marginal tipo células B, tem sido amplamente estudado, sendo hoje reconhecido e classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como linfoma de células B da zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa (Classificação Internacional de Doenças - CID-C88.4) (WHO, 2010).

No estômago, o MALT é, na maioria das vezes, secundário à infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e pode dar origem ao linfoma gástrico não Hodgkin - linfoma MALT (ISAACSON, 1999). Tais tumores originam-se em locais onde, primariamente, não existe tecido linfoide, como o estômago, glândulas salivares e tireoide. O desenvolvimento de agregados linfoides, semelhantes às placas de Peyer do intestino (ou tecido linfoide associado à mucosa - MALT), seja pela infecção por *H. pylori*, no estômago, ou por mecanismos autoimunes, como nas tireoidites de Hashimoto ou síndrome de Sjögren, constitui um ambiente no qual, na dependência de outros fatores ainda não identificados, alguns pacientes poderiam desenvolver esse tipo de tumor. Tais linfomas, anteriormente também denominados pseudolinfomas por seu caráter indolente (crescimento lento) e de baixa malignidade, são de diagnóstico diferencial muitas vezes difícil, especialmente em biópsias endoscópicas, com gastrite crônica associada à infecção por *H. pylori*.

A mucosa gástrica normal não possui tecido linfoide, com poucas células T e células B quase ausentes na lâmina própria. A sugestão que a gastrite crônica secundária à infecção por *H. pylori* pudesse estar associada ao linfoma gástrico primário derivou dos estudos de

Wyatt e Rathbone (1988), na Inglaterra, que enfatizaram o desenvolvimento de folículos linfoides (tecido linfoide) na mucosa gástrica de 27,4% dos indivíduos infectados pelo microrganismo. Posteriormente, outros autores, em estudos envolvendo biópsias gástricas múltiplas, salientaram a presença de folículos linfoides em até 100% dos indivíduos infectados por *H. pylori* (GENTA; HAMNER; GRAHAM, 1993).

Uma revisão histológica de 110 casos do subtipo linfoma MALT gástrico (LMG) encontrou *H. pylori* em 92% dos casos (WOTHERSPOON *et al.*, 1991). Posteriormente, evidências epidemiológicas revelaram - da mesma forma que ocorreu com o adenocarcinoma gástrico (CORREA, 2003) - a associação entre LMG e infecção prévia por *H. pylori*. Em 1994, um estudo epidemiológico, tipo caso-controle agrupado, foi realizado nos Estados Unidos da América (EUA), pela Universidade de Stanford, envolvendo duas coortes com o total de 230.593 participantes. O sangue dos participantes foi colhido e estocado entre 1964 e 1969 em um estudo e entre 1973 e 1991 no outro. Linfoma gástrico foi desenvolvido em 33 participantes no tempo mediano de 14 anos após a coleta do sangue. A prevalência de *H. pylori* nesse grupo foi de 85%, enquanto no grupo-controle foi de 55% e em portadores de linfomas não gástricos 65%, sugerindo que o LNH gástrico estava associado à infecção prévia pelo *H. pylori* (PARSONNET *et al.*, 1994).

Estudos *in vitro* registraram a proliferação de linfomas MALT de baixo grau de células B do estômago ao estímulo, via linfócitos T e citocinas, por cepas específicas de *H. pylori*, o mesmo não ocorrendo com linfomas MALT de baixo grau de células B de outros locais (tireoide e glândula salivar) e linfoma MALT gástrico de alto grau de células B (WOTHERSPOON *et al.*, 1991). Revisão sistemática recente envolvendo cerca de 2.000 pacientes portadores de LMG observou que 58,2% eram LMG de baixo grau, 16,9% de alto grau e 24,9% de baixo e alto graus associados. Foi diagnosticada a infecção por *H. pylori* em 88,8% desses pacientes em geral (ZULLO *et al.*, 2011).

### **1.3 Cura pela erradicação do microrganismo**

Os achados de responsividade antigênica dos linfomas MALT gástricos de baixo grau de célula B à existência do microrganismo estimularam os estudos visando avaliar se, com a erradicação do *H. pylori*, se romperia, *in vivo*, a estimulação mediada por células T do

tumor. Wotherspoon *et al.* (1993) realizaram estudo com seis pacientes com evidência histológica e molecular de linfoma MALT gástrico de baixo grau de células B e infecção por *H. pylori* tratados com antibióticos para a erradicação do microorganismo. Em todos os casos a erradicação foi completa e em cinco desses pacientes houve a completa remissão do tumor (WOTHERSPOON *et al.*, 1993).

Outro estudo envolvendo sete pacientes portadores de *H. pylori* e linfoma MALT gástrico de baixo grau de células B também constatou a regressão completa do tumor após erradicação do microorganismo, confirmado tanto por técnicas histológicas quanto moleculares realizadas até 10 meses após o tratamento (FISCHBACH *et al.*, 2002). A relação entre a infecção por *Helicobacter pylori* e o linfoma gástrico MALT apurou que a erradicação desse microorganismo induz a completa remissão em 70 a 80% das lesões precoces de LMG (LAGE *et al.*, 2005).

#### **1.4 Resistência tumoral ao tratamento**

Como a resposta histológica à erradicação do *H. pylori* é lenta, podendo demorar semanas ou meses, tem-se buscado identificar fatores capazes de prever a resposta terapêutica antimicrobiana, evitando-se, assim, perda de tempo na implementação de alternativas terapêuticas aplicadas atualmente, como a quimioterapia, radioterapia ou cirurgia.

Aproximadamente 25% dos pacientes com lesões precoces restritas à mucosa não apresentam remissão tumoral após a erradicação da bactéria, sendo especulada, nessa circunstância, a existência de um componente de alto grau não identificado ou de alterações citogenéticas. Eventos moleculares específicos têm sido associados ao desenvolvimento do linfoma MALT. Entre eles, a expressão da proteína Bcl10 e translocações cromossômicas, especialmente a t(11;18). Revisão bibliográfica realizada em 2001 aborda amplamente o linfoma MALT e relata a não resposta à erradicação do *H. pylori* em 1/3 dos casos. Dados dessa revisão sugerem a translocação cromossômica t(11;18)(q21;q21) e a expressão de bcl10 associadas à ausência de resposta à erradicação do *H. pylori* (CAVALLI *et al.*, 2001). Segundo Alpen *et al.* (2000), a t(11;18) pode ser considerada marcador da progressão do LMG, pois a translocação condicionaria a

independência das células do linfoma ao estímulo antigênico, com consequente não regressão do linfoma após erradicação do *H. pylori*.

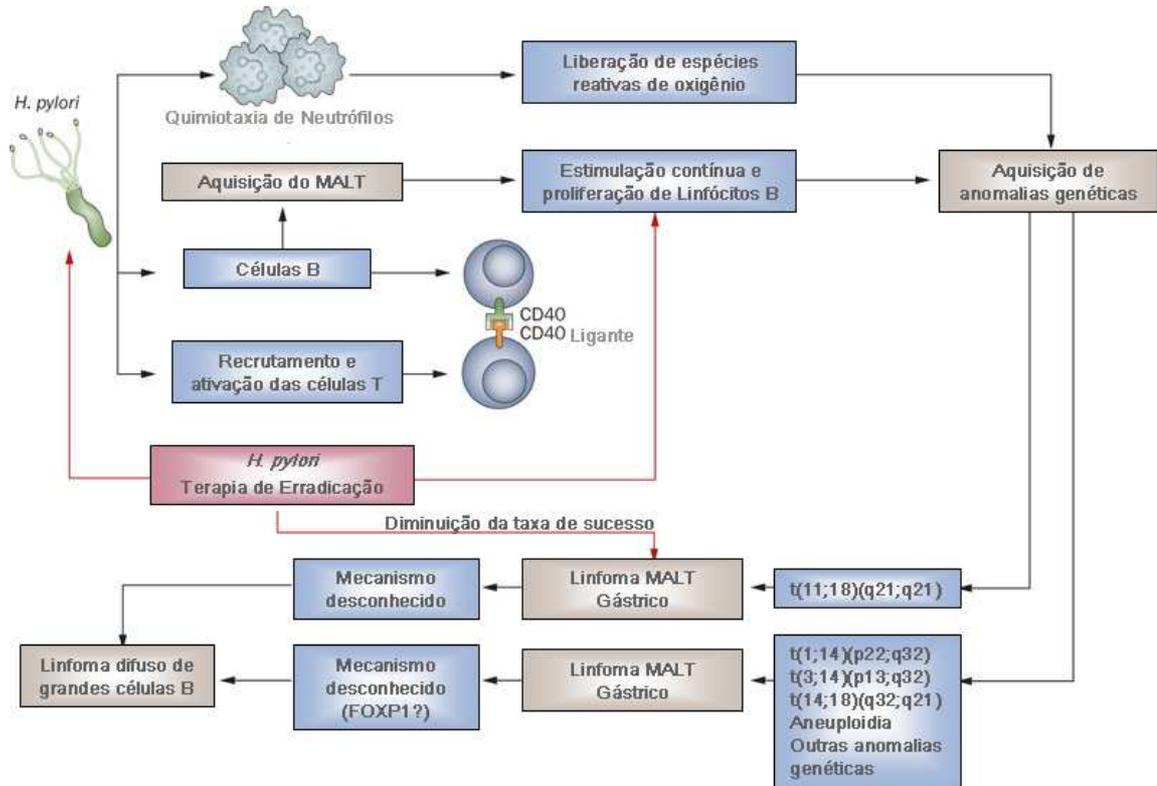
Liu *et al.* (2001a) avaliaram se a presença da t(11;18)(q21;q21) prevê resistência do linfoma à antibioticoterapia. Nesse estudo foram selecionados pacientes LMG-positivo para análise do produto da fusão gênica por transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A translocação foi detectada em 75% (9/12) dos pacientes estudados que não obtiveram regressão tumoral com a antibioticoterapia e não foi detectada em pacientes que haviam respondido à erradicação do *H. pylori*.

Em outro estudo, 111 pacientes com linfoma MALT gástrico submetidos com sucesso à terapêutica anti-*H. pylori* foram avaliados e foi encontrada a translocação t(11;18)(q21;q21) em 4,16% (2/48) dos casos nos quais se observou regressão completa do linfoma após erradicação da bactéria e em 66,66% (42/63) dos casos que não responderam à terapêutica antimicrobiana. Tais resultados sugerem que a avaliação da translocação pode ser um fator preditivo da resposta tumoral à terapia anti-*H. pylori*. Sua presença pode constituir um fator para a não regressão tumoral após a erradicação do *H. pylori* e exigir outras terapias. Portanto, entre os fatores hoje considerados preditores de resposta positiva à erradicação do microrganismo estão a localização do tumor (se confinado apenas à mucosa ou submucosa do estômago, confirmada pela ecoendoscopia) e a ausência de translocações cromossômicas no tecido tumoral gástrico (LIU *et al.*, 2002).

### **1.5 Patogênese e consequente dano genético**

A infecção por *H. pylori* estimula o surgimento de células B, células T e neutrófilos na mucosa gástrica. A reação inflamatória é responsável pela liberação de espécies reativas de oxigênio que, juntamente com a estimulação contínua e proliferação dos linfócitos B, podem causar aberrações genéticas devido a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou erros de reparo da molécula (COUSSENS; WERB, 2002). A proliferação de células B é conduzida pela interação da proteína CD40-CD40 ligante com *H. pylori*, células T reativas e por citocinas. Essa proliferação, bem como de neutrófilos, induz adicionais eventos moleculares oncogênicos que, eventualmente, podem provocar a produção linfocitária independentemente da estimulação antigênica (FIG. 1) (SAGAERT *et al.*, 2010).

FIGURA 1 - Modelo da patogênese do linfoma MALT gástrico



Fonte: Adaptado, em português, de Sagaert *et al.* (2010).

Várias anomalias, como trissomias e translocações cromossômicas, têm sido identificadas no LMG. Entre as translocações, são descritas: t(11;18)(q21;q21)/*API2-MALT1*, t(1;14)(p22;q32)/*BCL10-IGH*, t(14;18)(q32;q21)/*IGH-MALT1* e t(3;14)(p13;q32)/*IGH-FOXP1* t(1;3). A maioria afeta genes envolvidos na via da ativação do fator nuclear kappa-B (NFκB), que regula a expressão de vários genes relacionados à sobrevivência e proliferação de linfócitos B. Assim, sua ativação constante pode gerar a proliferação descontrolada de células B e, conseqüentemente, o linfoma (FIG. 1) (MING-QING, 2007; 2011; SAGAERT *et al.*, 2010).

A maioria dos pacientes com LMG restrito à mucosa ou submucosa com alguma dessas translocações não responde ao tratamento de erradicação do *H. pylori*, enquanto a maioria daqueles sem translocações são curados apenas com a antibioticoterapia, como mostra o estudo de Gehong *et al.* desenvolvido na China, no qual foram submetidos 22 pacientes com linfoma MALT gástrico em estágio IE (doença localizada) à erradicação de *H. pylori* com antibioticoterapia e estudos endoscópicos e histológicos sequenciais para acompanhamento. Neste estudo foram testadas a expressão do fator nuclear BCL10 e a

presença de *API2-MALT1* pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A regressão tumoral completa foi atingida em 59,1% dos casos (13/22) após erradicação do *H. pylori*. A translocação t(11;18)(q21;q21) foi analisada em 18 casos e encontrada em quatro (57,1%) de sete pacientes sem resposta ao tratamento e em apenas um de 11 com resposta à erradicação da bactéria (GEHONG *et al.*, 2008).

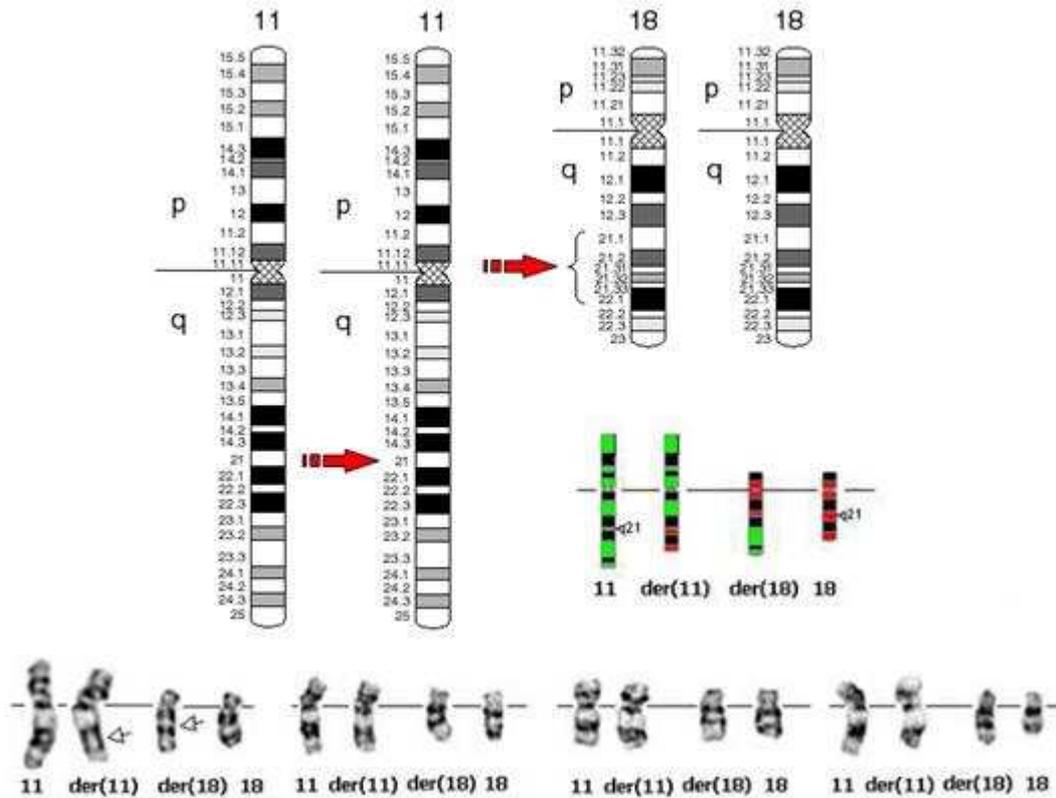
Entre as translocações cromossômicas encontradas, a t(11;18)(q21;q21) representa o rearranjo mais comum associado ao LMG, presente em torno de 30% dos casos estudados por Auer *et al.* (1997) e Tsai, Lu e Lieber (2010), sendo rara em pacientes que respondem ao tratamento da erradicação do *H. pylori*. Em outro estudo asiático, em que foram analisados 48 casos de linfoma MALT gástrico em relação aos aspectos moleculares, imunohistoquímicos e histológicos, a translocação foi encontrada em 15 casos (31%) (GUANGHUA *et al.*, 2009).

Essa translocação tem sido atribuída ao estresse oxidativo associado à resposta inflamatória induzida pela infecção por *H. pylori* em lesões pré-malignas. A terapia de erradicação do *H. pylori* normalmente inibe o processo de progressão tumoral, porém a translocação t(11;18) (q21;q21) em pacientes com linfomas MALT é considerada um marcador de resistência tumoral com crescimento antigênico independente (MATHIJS; MARYNEN, 2002a; 2002b; 2002c; SAGAERT *et al.*, 2010).

### **1.6 A translocação t(11;18) (q21;q21)**

A translocação genética t(11;18)(q21;q21) ocorre entre os cromossomos 11 e 18, produz a fusão do gene *API2*, localizado no cromossomo 11q21, com o gene *MLT* (MALT lymphoma - associated translocation), conhecido por *MALT1*, localizado no cromossomo 18q21 (FIG. 2) (LAGE *et al.*, 2005; MATHIJS; MARYNEN, 2002a; 2002b; 2002c). O gene *API2* é composto de 10 éxons, sendo o códon de início no éxon 3 e códon de parada no éxon 10 (MATHIJS; MARYNEN, 2002a). O gene *MALT1* é composto de 17 éxons e se estende por uma região de ~80 kb, sendo o códon de início no éxon 1 e códon de parada no éxon 17 (MATHIJS; MARYNEN, 2002b).

FIGURA 2 - Ideograma e cariótipos demonstrando a translocação entre o cromossomo 11 (*API2* 11q21) e o cromossomo 18 (*MLT* 18q21)



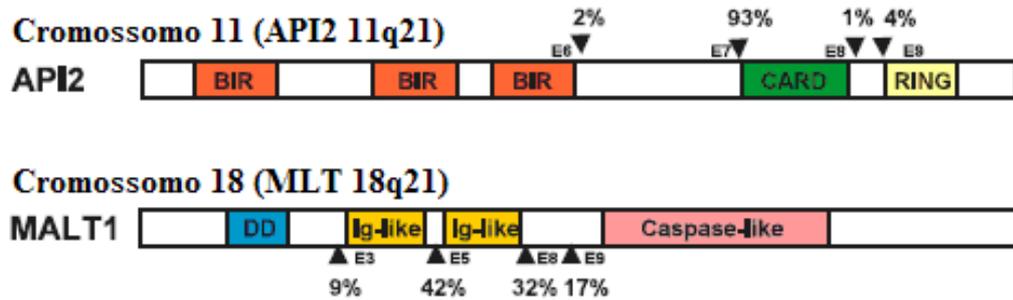
Fonte: Adaptado de Mathijs e Marynen (2002c).

O gene *API2* codifica o inibidor da apoptose *API2* (*Apoptosis Inhibitor-2*), contém uma a três cópias do domínio *baculovirus inhibitor (BIR) of apoptosis (IAP) repeat*, um domínio *caspase recruitment domain (CARD)* e um domínio denominado *zinc finger binding RING*. O gene *MALT1* é uma paracaspase e parece estar envolvido na apoptose, contém um domínio *death domain (DD)*, dois domínios imunoglobulina (*Ig-like*) e um domínio *caspase-like* (*caspase-like*) (FIG. 3) (LAGE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2002).

Os genes possuem diferentes pontos de quebra que podem recombinar de várias formas. Os pontos de quebra do gene *API2* ocorrem na região do terminal amina, distais ao terceiro domínio BIR, mas proximais ao domínio *zinc finger binding RING*. O ponto de quebra mais frequente do gene *API2* é sentido *API2-Downstream* do éxon 7 (E7), localizado antes do domínio CARD em 93% dos casos. Os pontos de quebra do gene *MALT1* estão localizados no terminal carboxila, proximais ao domínio *caspase-like*, sentido *MALT1-*

*Upstream* de 4 éxons (E3, E5, E8 e E9) (FIG. 3), sendo a interação entre o E7 do gene *API2* e o E5 do gene *MALT1* a fusão mais frequentemente encontrada (FIG. 4) (YE *et al.*, 2003).

FIGURA 3 - Os oncogenes envolvidos na t(11;18) do LMG são *API2* e *MALT1*, que originam um produto de fusão *API2-MALT1*.



As setas indicam os pontos de quebra conhecidos e sua incidência.

Fonte: Adaptado de Ming-Qing Du (2007).

FIGURA 4 - Produto de fusão mais frequente em pacientes com LMG.



Fonte: Adaptado de Ming-Qing Du (2007).

Quando ocorrem a translocação e a fusão dos genes, o grupo amina livre (N-terminal) do gene *API2* se liga ao grupo carboxila (C-terminal) do *MALT1* e origina um “produto de fusão” quimérico (genes inteiros ou parte destes genes se unem formando outro gene, podendo codificar uma nova proteína), designado por *API2-MALT1* (FIG. 4) (LIU *et al.*, 2002).

O domínio BIR possui ação antiapoptótica, porém estudos informam que, em condições normais, sua atividade é fraca, por ser suprimido pelo domínio RING (LIU *et al.*, 2002). Na translocação com mais alta incidência, o gene *API2* perde o domínio CARD e RING e

se liga ao domínio *caspase-like*. Com isso a atividade antiapoptótica do BIR é liberada, o que se supõe conferir uma vantagem de sobrevivência aos linfomas MALT, permitindo a proliferação antígeno-independente (FIG. 4) (CAVALLI *et al.*, 2001; STOFFEL; BEAU, 2001). A oncoproteína, produto da fusão *API2-MALT1*, preconiza ativar o NF- $\kappa$ B, que atua como um fator de transcrição para vários genes que têm função antiapoptótica, o que leva à resistência à degradação proteossômica e acaba por aumentar a adesão de células B e gera resistência à apoptose (LIU *et al.*, 2002; SHAUN *et al.*, 2011). A vigência de domínios ativos com ação antiapoptótica no transcrito final sugere fortemente a sua importância e sinergismo no processo de oncogênese (LAGE *et al.*, 2005).

Até o presente, não existem estudos descritos na população brasileira avaliando a existência e o impacto de achados moleculares na terapêutica do LMG. A grande relevância da análise dessa alteração genética baseia-se na correlação direta entre a translocação e a ausência de resposta do LMG à erradicação do *H. pylori*. Essa informação pode conduzir a implicações clínicas de muito significado. Paciente com LMG, depois de comprovado portar a translocação t(11;18)(q21;q21), além de efetuar a erradicação do *H. pylori*, pode ser de imediato encaminhado para outra modalidade terapêutica, considerada mais eficaz e adequada (cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia), já que este teria 25% ou mais de chance de não ter o tumor regredido.

### **1.7 Cenário atual da conduta terapêutica do LMG**

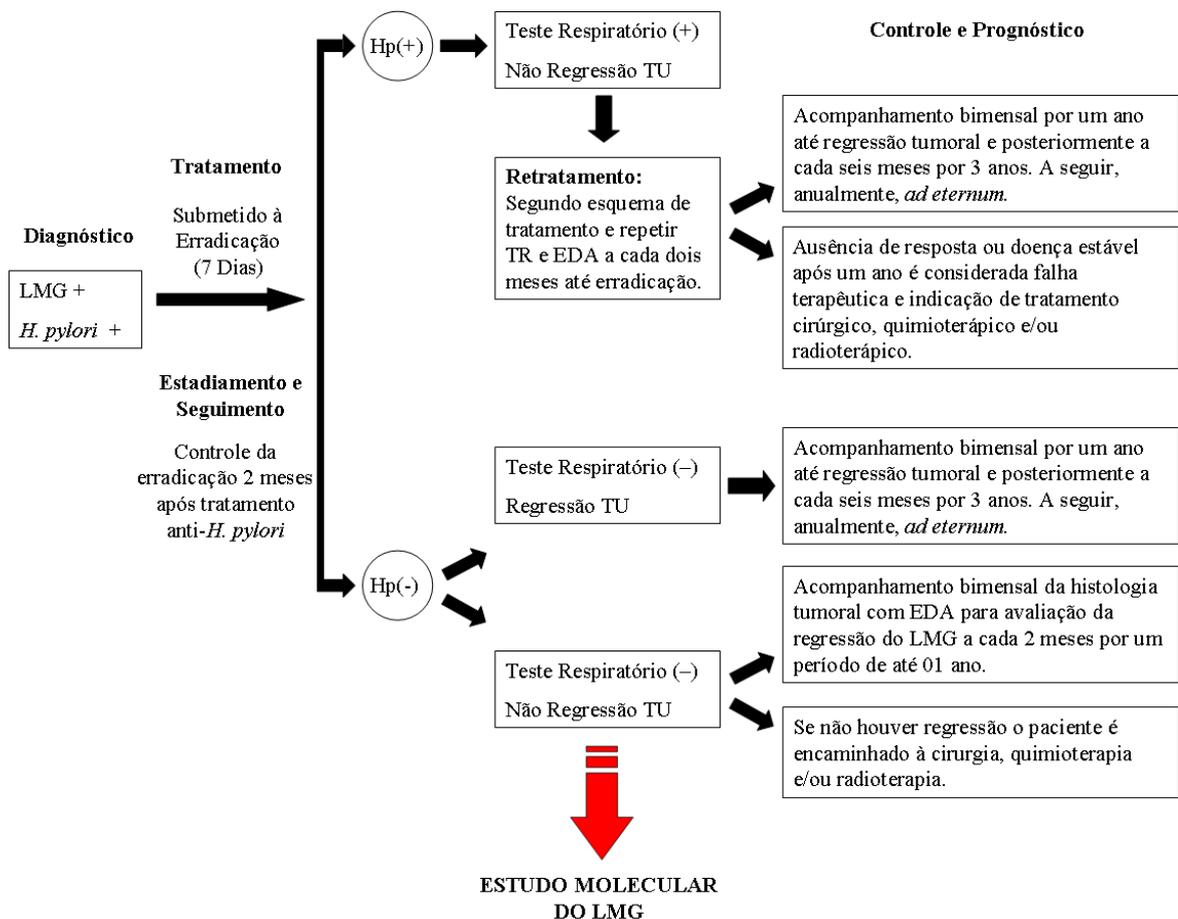
O Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*, atualizado em 2004, contou com a participação interdisciplinar de vários profissionais envolvidos na terapêutica do *H. pylori*. O Consenso apresenta conceitos, correlações com doenças e as principais recomendações na conduta ante o diagnóstico positivo da infecção por *H. pylori* (COELHO *et al.*, 2005).

Já o consenso europeu publicado em 2011, *European Gastro-Intestinal Lymphoma Study* (EGILS), Consensus Report, descreve todas as recomendações para a condução adequada do LMG. Esse documento sugere considerar a identificação da translocação ao diagnóstico, porém o diagnóstico e o tratamento da infecção por *H. pylori* constitui hoje a primeira medida terapêutica para combater o LMG, independentemente do estágio da doença (RUSKONE-FOURMESTRAUX *et al.*, 2011).

A rota tradicional para o diagnóstico e o tratamento do *H. pylori* e do LMG no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), local do estudo, tem sido feita a partir da realização de ensaios para diagnóstico do microrganismo. Os ensaios envolvem o teste da urease ou teste respiratório (13C-ureia), análise morfológica de biópsias, imunohistoquímica, sorologia e a correlação dessas análises com os resultados clínicos do paciente. A conduta mediante o diagnóstico do microrganismo compreende: o tratamento de erradicação; estadiamento e seguimento com endoscopias e ecoendoscopias, testes para identificação do *H. pylori* e histologia dois meses após o tratamento; e acompanhamento para controle da erradicação e controle tumoral.

A seguir, um esquema representativo (FIG. 5) da perspectiva de conduta terapêutica para portadores de LMG em nosso setor no HC-UFMG e em que momento poderíamos intervir com o estudo molecular da neoplasia.

FIGURA 5 - Perspectiva de conduta terapêutica para o LMG no HC-UFMG.



### 1.7.1 Perfil dos portadores de LMG do IAG-HC-UFMG

Por se tratar de afecção pouco frequente, pesquisadores do IAG-HC-UFMG procuraram avaliar o perfil dos portadores de LMG do instituto entre o período de 2006-2009 por meio de busca manual de prontuários nos setores de endoscopia e anatomia patológica. Foram identificados 37 pacientes (18 homens, 19 mulheres) com idade média de 54,8 anos (mínima 14 e máxima 76), sendo cinco deles classificados como LMG de alto grau e 32 de baixo grau. Entre esses pacientes, para apenas 15/37 havia prontuários acessíveis e eles tiveram seus dados clínicos analisados. A pesquisa de *H. pylori* foi positiva em 12/15 (80%), nos quais a ecoendoscopia foi realizada. Em 50% deles (6/12) o tumor estava restrito à mucosa, em 4/12 atingiu a submucosa, em um o tumor alcançou a submucosa com linfonodos acometidos e em outro atingiu a muscular própria. A média de atendimento a pacientes portadores de LMG durante o período revisado foi de cerca de nove por ano (ANDRADE *et al.*, 2010).

O perfil descrito confirma a baixa prevalência do LMG, sua distribuição semelhante entre os sexos e reafirma a utilidade da ecoendoscopia no estadiamento correto do tumor. A baixa prevalência do LMG, a necessidade de propedêutica especializada para seu correto estadiamento envolvendo ecoendoscopia e técnicas moleculares reforçam a necessidade de constituição de centros de referência para avaliação e tratamento do LMG entre nós.

Com este estudo, objetivamos o estabelecimento de metodologias para análise da translocação cromossômica t(11;18)(q21;q21) em portadores de LMG para implementação na rotina diagnóstica do HC-UFMG em prol desses pacientes, a fim de esclarecer o papel dessa translocação na patogênese dessa doença, intervir de forma terapêutica mais precoce e beneficiar a população brasileira carente de estudos moleculares sobre o LMG.

A implementação do estudo molecular como diagnóstico diferencial dessa alteração genética e a análise quanto à sua aplicabilidade, exequibilidade, eficiência e viabilidade são de grande importância para que no futuro esse procedimento esteja ao alcance de toda a população.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Implementar metodologias para detecção e análise da translocação cromossômica t(11;18)(q21;q21) em pacientes portadores de linfoma MALT gástrico, em material biológico fresco obtido por ecoendoscopia gástrica ou material incluído em parafina previamente armazenado no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da UFMG.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a metodologia de RT-PCR para pesquisa da translocação t(11;18)(q21;q21).
- Estabelecer a metodologia de FISH para pesquisa da translocação t(11;18)(q21;q21).
- Identificar a translocação t(11;18)(q21;q21) em pacientes com LMG referenciados ao IAG do HC da UFMG, em tecido fresco e incluído em parafina.
- Definir o impacto da translocação na resposta à terapêutica de erradicação do *H. pylori* e correlacionar sua presença com a evolução da doença.
- Determinar a viabilidade, exequibilidade e eficiência de cada metodologia.
- Determinar qual a metodologia de escolha, avaliando o custo, grau de dificuldade da metodologia e tempo de execução.
- Contribuir para a implementação de centro de referência para diagnóstico molecular do LMG no IAG.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nas dependências do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Laboratório de Anatomia Patológica do IAG-HC-UFMG a partir de biópsias de tecido fresco tumoral da mucosa gástrica e/ou tecido gástrico incluído em parafina, coletadas por meio de endoscopia digestiva alta (EDA).

Foram abordadas técnicas de RT-PCR e FISH para estudo da translocação *API2-MALT1* em pacientes com LMG. Nos últimos anos há vários relatos da utilização dessas metodologias para estudo do LMG a partir de material biológico (amostra de tecido) incluído em parafina e/ou tecido fresco. Porém, conforme descrito anteriormente, não existem estudos descritos na população brasileira sobre a identificação e diferenciação desta translocação e o impacto desses achados na terapêutica do LMG.

As metodologias adotadas necessitam de capacitação técnica exigente e alto custo financeiro. Como se trata de uma nova rotina no setor, todos os procedimentos tiveram que ser padronizados, desde a esterilização dos materiais ao desenvolvimento final dos procedimentos operacionais padrão.

#### 3.1 Amostra estudada

A metodologia do estudo (QUADRO 1) foi dividida em três grupos:

##### **Não portadores de LMG:**

- **Grupo 1** - 10 pacientes não portadores de LMG e com estudo histológico de corpo e antro gástrico normais (mucosa gástrica sem alterações histopatológicas relevantes ou dentro dos limites de normalidade – LMG e *H. pylori* negativos), com amostras de tecido gástrico incluído em parafina, previamente coletadas e arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica do IAG. Essas amostras foram selecionadas como controle negativo e para determinação diagnóstica e contagem de translocações presentes na população sadia.

**Portadores de LMG:**

- **Grupo 2A** - 10 pacientes portadores de LMG, com amostras de tecido gástrico incluído em parafina, previamente coletadas e armazenadas no Laboratório de Anatomia Patológica do IAG para estudo da translocação t(11;18)(q21;q21) e correlação com a resposta terapêutica e evolução da doença.
- **Grupo 2B** - 08 pacientes portadores de LMG recentemente diagnosticados, ainda sem tratamento e em fase de propedêutica para estadiamento do LMG. As amostras de tecido fresco tumoral da mucosa gástrica foram coletadas durante os procedimentos de rotina das ecoendoscopias no IAG. As amostras deste grupo foram utilizadas para estudo da translocação t(11;18)(q21;q21) e correlação com a resposta terapêutica e evolução da doença. O material incluído em parafina da rotina hospitalar destes pacientes também foi posteriormente disponibilizado para estudo e alguns foram incluídos no grupo 2A.

QUADRO 1 – Metodologia de Estudo

Metodologia de Estudo						
Não Portadores de LMG						
Grupo	Amostra	Diagnóstico	Análise Histológica	Material de Estudo	Metodologia Inicialmente Prevista	Objetivo
Grupo 1 (Controle)	10 pacientes	LMG(-) <i>H. pylori</i> (-)	Mucosa gástrica sem alterações histopatológicas relevantes ou dentro dos limites de normalidade	Biópsia gástrica em bloco de parafina	RT-PCR e FISH	Controle negativo
	Idade média* 58,5					
Portadores de LMG						
Grupo	Amostra	Diagnóstico	Controle da Erradicação do <i>H.pylori</i>	Material de Estudo	Metodologia Inicialmente Prevista	Objetivo
Grupo 2A	10 pacientes	LMG(+) <i>H. pylori</i> (+)	LMG(+) <i>H. pylori</i> (-)	Biópsia gástrica tumoral em bloco de parafina	RT-PCR e FISH	Estudo da translocação t(11;18)(q21;q21) e correlação com a resposta terapêutica e evolução da doença
	Idade média* 62,7					
Grupo 2B	08 pacientes	LMG(+) <i>H. pylori</i> (+)	LMG(+) <i>H. pylori</i> (-)	Biópsia gástrica tumoral fresca e emblocada em parafina	RT-PCR e FISH	
	Idade média* 56,9					

\* Idade média do grupo calculada a partir da idade de cada paciente na data de realização da EDA/Biópsia. Sendo as amostras do grupo 1 referentes ao ano de 2010; do grupo 2A referentes ao período de 2002 a 2009; e do grupo 2B coletadas entre o período de 2009 a 2010.

### **3.2 Aspectos éticos**

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG). Todos os sujeitos de pesquisa foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade estabelecidos para o estudo e não foram feitas restrições entre raças, grupos e classes sociais.

O estudo das amostras dos pacientes do grupo 1 e grupo 2A, sem uso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), constitui-se em análise de material de arquivo retrospectivo, o que impossibilitou o contato com os pacientes e/ou familiares devido a ausência de dados cadastrais atualizados e/ou risco de desconfortos por possível falecimento prévio do paciente. Os pacientes do grupo 2B, após devidamente esclarecidos a respeito dos objetivos do estudo e sua participação, assinaram o TCLE. A doação de tecido fresco não expôs esses sujeitos da pesquisa a riscos médicos adicionais àqueles já inerentes ao procedimento de rotina padrão da ecoendoscopia.

Foram tomadas todas as medidas apropriadas para o decorrer seguro do estudo, além de normas rigorosas no manuseio de dados e materiais biológicos. Os pesquisadores tiveram acesso aos prontuários e exames dos pacientes do estudo, obedecendo sempre à privacidade e confidencialidade dos sujeitos de pesquisa. Todos os pacientes e amostras doadas foram identificados por código e todo o material foi utilizado exclusivamente para o estudo descrito, restringindo-se aos Laboratórios de Pesquisa e Anatomia Patológica do IAG. Apenas os pesquisadores envolvidos no estudo tiveram acesso aos dados que poderiam vincular os sujeitos de pesquisa ao seu código.

### **3.3 Critérios de elegibilidade**

#### **3.3.1 Grupo 1 – tecido em parafina/LMG (-)**

##### **A) Critérios de inclusão**

- Homens e mulheres com idades acima de 18 anos.

- Pacientes com estudo histológico de antro e corpo gástrico normais à coloração H&E (hematoxilina-eosina).
- Ausência de infecção gástrica por *H. pylori*
- Ausência de tratamento quimioterápico prévio.

#### **B) Critérios de exclusão**

- Pacientes sabidamente imunodeprimidos ou portadores de doenças autoimunes.
- Pacientes com história prévia de outro tumor maligno nos últimos cinco anos.

### **3.3.2 Grupo 2A – tecido em parafina/LMG (+)**

#### **A) Critérios de inclusão**

- Homens e mulheres com idades acima de 18 anos.
- Pacientes com diagnóstico confirmado de LMG.
- Confirmação diagnóstica da infecção por *H. pylori* por, pelo menos, um método diagnóstico: histologia, teste da urease ou teste respiratório com <sup>13</sup>C-ureia.
- Ausência de tratamento quimioterápico prévio.
- Pacientes submetidos à endoscopia ou ecoendoscopia, com realização de biópsias e com amostras de tecido tumoral arquivadas e disponíveis para a pesquisa.

#### **B) Critério de inclusão adicional**

- Amostras em parafina selecionadas de acordo com a evolução da doença para inclusão preferencial de pacientes com resistência tumoral após erradicação do *H. pylori*, a fim de, teoricamente, identificarem-se mais facilmente pacientes com a translocação para padronização da metodologia.
- Este critério não interfere na análise dos resultados deste grupo, em que será estabelecida correlação entre a presença da translocação e a evolução da doença.

#### **C) Critérios de exclusão**

- Pacientes sabidamente imunodeprimidos ou portadores de doenças autoimunes.
- Pacientes com história prévia de outro tumor maligno nos últimos cinco anos.

### 3.3.3 Grupo 2B – tecido fresco/LMG (+)

#### A) Critérios de inclusão

- Homens e mulheres com idades acima de 18 anos.
- Pacientes com diagnóstico confirmado de LMG.
- Confirmação diagnóstica da infecção por *H. pylori* por, pelo menos, um método diagnóstico: histologia, teste da urease ou teste respiratório com 13C-ureia.
- Ausência de tratamento quimioterápico prévio.
- *Status* de desempenho do *Easter Cooperative Oncology Group* (ECOG) de zero a um (OKEN *et al.*, 1982) (QUADRO 2).
- Pacientes submetidos à endoscopia ou ecoendoscopia, com realização de biópsias e com amostras de tecido tumoral arquivadas e disponíveis para a pesquisa.
- Paciente em concordância com o estudo e TCLE previamente assinado.

QUADRO 2 – Escala *status* de desempenho ECOG

Grau	Escala <i>Status</i> de Desempenho ECOG
0	Ativo, sadio, capaz de desenvolver todas as atividades que desempenhava antes da doença.
1	Capaz de realizar tarefas leves ou sedentárias. Restrição em atividades físicas extremas.
2	Capaz de se cuidar sozinho, mas incapaz de realizar qualquer atividade ocupacional.
3	Cuida-se sozinho de modo limitado, confinado a uma cama ou cadeira mais da metade do tempo em que fica acordado.
4	Incapaz. Não consegue cuidar-se sozinho. Confinado à cama ou cadeira.
5	Morto.

Fonte: Oken *et al.* (1982).

#### B) Critérios de exclusão

- Pacientes sabidamente imunodeprimidos ou portadores de doenças autoimunes.
- Pacientes com história prévia de outro tumor maligno nos últimos cinco anos.
- Demência, alteração do estado mental ou qualquer outro caso psiquiátrico que proíba o entendimento ou interpretação do TCLE.
- Cancelamento do consentimento em participar do estudo por parte do responsável legal ou do próprio sujeito de pesquisa, a qualquer momento, por qualquer motivo.

### **3.4 Seleção e recrutamento dos pacientes**

- **Grupos 1 e 2A**

A triagem dos pacientes do grupo 1 e 2A foi realizada a partir de análise de prontuários e diagnósticos de biópsias de tecido gástrico incluído em parafina, armazenadas no Laboratório de Anatomia Patológica do IAG. Após a seleção, de acordo com os critérios de elegibilidade, os blocos de parafina e seus laudos foram separados para o estudo.

Em adicional, durante a triagem dos pacientes do grupo 2A, foi traçado o perfil de pacientes portadores de LMG pertencentes ao setor de endoscopia do IAG durante o período de 2006 a 2009, conforme descrito no item 1.7.1. (ANDRADE *et al.*, 2010).

- **Grupo 2B**

A triagem e seleção para o grupo 2B foram realizadas de acordo com o diagnóstico ou suspeita clínica dos pacientes encaminhados à ecoendoscopia do IAG. Os procedimentos de ecoendoscopia dos pacientes pré-selecionados foram informados com antecedência aos pesquisadores do estudo, para preparo do material para recrutamento e coleta. O recrutamento foi realizado antes da rotina da ecoendoscopia e foram obedecidos todos os critérios éticos e de elegibilidade previamente descritos.

#### **3.4.1 Aplicação do TCLE e coleta de dados dos sujeitos de pesquisa**

##### **3.4.1.1 Aplicação do TCLE**

A aplicação do TCLE (APÊNDICE A) durante o recrutamento dos pacientes incluídos no grupo 2B foi a primeira conduta do estudo frente aos sujeitos da pesquisa. O TCLE foi aplicado pelo investigador principal ou coinvestigadores. O documento continha todas as informações pertinentes ao estudo, conduta e procedimento que seria realizado, riscos e benefícios, confidencialidade dos dados, participação voluntária, informações sobre o comitê de ética em pesquisa local; identificação e contato dos pesquisadores envolvidos.

Durante a abordagem de cada paciente e aplicação do TCLE, o responsável elucidou todas as dúvidas e forneceu tempo suficiente para leitura com calma do documento, bem como enfatizou aos sujeitos de pesquisa que eles poderiam retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isso lhe trouxesse algum risco, ônus ou problema. Após a concordância do sujeito em relação ao TCLE, o mesmo foi assinado e datado em duas vias, sendo uma via mantida com o paciente e a outra arquivada para o estudo.

#### 3.4.1.2 Preenchimento do formulário de dados do paciente

Foram elaborados dois tipos de formulário: um para pacientes com amostras LMG (-) pertencentes ao grupo 1 (APÊNDICE B) e outro para pacientes com amostras LMG (+) pertencentes aos grupos 2A e 2B (APÊNDICE C).

Os grupos 1 e 2A, por se constituírem de biópsias gástricas emblocadas em parafina, as informações e dados complementares dos pacientes incluídos foram extraídos por meio de revisão de prontuário.

Referente ao grupo 2B, o formulário de dados foi aplicado pelo investigador principal ou coinvestigadores junto ao paciente, mediante assinatura do TCLE. Também foi realizada revisão de prontuário para verificação de dados, a fim de adquirir todas as informações necessárias e/ou complementares ao estudo.

### **3.5 Esterilização de materiais**

Esterilização é o processo que promove completa eliminação ou destruição de organismos vivos presentes nos materiais, para um nível aceitável de segurança na condução de estudos laboratoriais. É um procedimento realizado mediante a aplicação de agentes físicos, químicos e/ou físico-químicos (MORIYA; MODENA, 2008).

A esterilização por processos físicos pode ser por calor úmido, calor seco ou radiação. Os processos físico-químicos são indicados para materiais termossensíveis, que não resistem às altas temperaturas dos processos físicos (OPPERMANN, 2003).

Métodos de esterilização que foram utilizados para este estudo:

- Métodos físicos: autoclave (vapor saturado) e radiação ultravioleta (UV).
- Método físico-químico: esterilizadoras a óxido de etileno (ETO).

O cronograma e protocolo de esterilização dos materiais para a pesquisa foi estabelecido junto às chefes de enfermagem do IAG e da equipe da Central de Materiais e Esterilização (CME) do HC. De acordo com as normas da instituição, os materiais eram higienizados previamente ao envio para esterilização, acompanhados por memorandos. Alguns materiais foram adquiridos previamente esterilizados, livres de desoxirribonuclease (DNase) ribonuclease (RNase), como tubos e ponteiros para condução de toda a metodologia.

### **3.5.1 Esterilização por calor úmido (autoclave)**

A autoclave é o método de esterilização mais utilizado, altamente efetivo e de baixo custo. É usado para todos os itens que não sejam sensíveis ao calor e à umidade, como soluções, vidrarias, etc. Os materiais esterilizados em autoclave para o presente estudo foram submetidos a um calor de 134°C.

Os artigos termossensíveis não devem sofrer autoclavagem, pois a temperatura mínima do processo é de 121°C (OPPERMANN, 2003). A alta temperatura em conjunto com alta pressão e umidade é suficiente para esterilização rápida e eficaz. O vapor saturado a 750 mmHg na temperatura de 121°C é suficiente para a execução da metodologia em 30 minutos. Quanto mais alta a temperatura, mais curto o tempo de ação (MORIYA; MÓDENA, 2008).

O processo consiste numa câmara com vapor de água saturado sob pressão, o que corresponde à alta temperatura de ebulição da água. O calor úmido destrói os microrganismos por coagulação e desnaturação irreversíveis de suas enzimas e proteínas estruturais (KALIL; COSTA, 1994).

### 3.5.2 Esterilização em óxido de etileno (ETO)

A esterilização por ETO é utilizada principalmente para produtos que não podem suportar a esterilização convencional com vapor em alta temperatura. Na pesquisa, essa esterilização foi realizada para diversos materiais como pinças, espátulas, papel absorvente, vidrarias, etc.

O óxido de etileno é um gás incolor, inflamável, tóxico, altamente reativo, que penetra em substâncias porosas (MORIYA; MÓDENA, 2008). É um procedimento de alto risco pessoal e custo operacional. Age por alcalinização de proteínas, DNA e ácido ribonucleico (RNA), porém sua eficácia depende da concentração do gás, temperatura, umidade e do tempo de exposição (KALIL; COSTA, 1994).

### 3.6 Coleta de tecido fresco tumoral do grupo 2B

As amostras de tecido gástrico fresco de pacientes portadores de linfoma MALT foram coletadas pela equipe de endoscopistas do IAG durante os procedimentos de rotina da ecoendoscopia, que envolveu o procedimento padrão do hospital e coleta de material biológico específico para o estudo.

As amostras coletadas por biópsia gástrica foram removidas da região periférica tumoral com auxílio de pinças modelo Radial Jaw® da *Boston Scientific* compatíveis com endoscópio com canal de trabalho de 2,8 mm. Caso houvesse mais de um foco tumoral ficava a critério do médico qual tumor seria biopsiado. O número de fragmentos foi variável, pois dependia do tamanho da lesão. Em torno de três a cinco fragmentos foram coletados de cada paciente. Os tecidos foram transferidos e individualmente armazenados imediatamente (prazo máximo de 15 s) em frasco estéril, previamente preparado, contendo RNAlater® (Ambion Cat. # AM7020) - solução estabilizadora de RNA que rapidamente penetra no tecido para proteger o RNA em amostras frescas, o que elimina a necessidade de processamento ou congelamento imediata.

Os frascos foram devidamente identificados para cada paciente e encaminhados à temperatura ambiente (25°C) ao Laboratório de Pesquisa. Os mesmos foram conservados a

4°C *overnight*, para permitir que a solução penetrasse completamente no tecido e posteriormente foram congelados a -20°C ou -80°C. Ambas as temperaturas preservam os tecidos a longo prazo por tempo indeterminado, o que permite a preservação do DNA e RNA para utilização posterior em pesquisas moleculares e citogenéticas.

### **3.7 Extração do RNA das amostras de tecido fresco**

#### **3.7.1 Preparo dos materiais**

Primeiramente, foram separados e preparados todos os materiais a serem utilizados na metodologia. Todos os materiais que tiveram contato direto com a amostra estavam livres de RNase, enzima que degrada o RNA presente nas amostras. O tratamento químico das vidrarias e do Gral + Pistilo, utilizado para maceração do tecido, foi realizado com hidróxido de sódio (NaOH 5M) por 24 horas e enxaguados com água tratada com *Diethylpyrocarbonate* (DEPC *Ultrapure Treated water*). A bancada de trabalho e a capela de fluxo laminar também foram higienizadas e a luz UV da capela ligada por 15 minutos para esterilização dos materiais antes de iniciar o procedimento de extração do RNA.

#### **3.7.2 Descongelamento e recuperação das amostras armazenadas em *RNAlater*®**

As amostras foram retiradas do *freezer* para descongelamento à temperatura ambiente (TA) por tempo suficiente para que, com auxílio de uma pinça estéril, o tecido fosse removido.

#### **3.7.3 Fragmentação das amostras para extração do RNA**

##### **A) Fragmentação das amostras com nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>)**

Para fragmentação de amostra em NL<sub>2</sub>, a mesma foi colocada em gral (cadinho) após retirado o excesso de *RNAlater* e foi adicionada a quantidade suficiente de nitrogênio líquido para congelação do tecido por completo e trituração. A amostra foi triturada com auxílio de pistilo até virar pó (FIG. 6). A amostra triturada foi coletada com espátula estéril

e transferida para tubo *ependorf* estéril contendo 1 mL de Trizol® reagente para extração do RNA de acordo com a bula e protocolo do reagente.

FIGURA 6 - Maceração do tecido fresco em gral com nitrogênio líquido



### **B) Fragmentação manual das amostras**

Para fragmentação manual, a amostra foi colocada em placa petri sem retirar o excesso de RNAlater. O tecido foi fragmentado e macerado com o auxílio de pinça, tesoura e bisturi esterilizados (em fluxo laminar) em um tempo máximo de 10 min., para romper a cápsula do tecido e células, até restar somente uma mistura homogênea. Após fragmentação, o material foi transferido para tubo *ependorf* estéril com auxílio de pipeta Pasteur. As células foram concentradas por centrifugação a 1.500-2.000 rotações por minuto (rpm) por 15 min. e foi descartado o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de Trizol para extração do RNA de acordo com a bula e protocolo do reagente.

### **C) Fragmentação das amostras com homogeneizador**

A fragmentação mecânica ocorre diretamente em tubo *ependorf* estéril contendo amostra e 1 mL de Trizol. O homogeneizador deve ser submerso no tubo para trituração da amostra e a extração do RNA realizada de acordo com a bula e protocolo do Trizol.

No presente estudo, as amostras foram fragmentadas com nitrogênio líquido ou manualmente. Como opção, pode-se utilizar homogeneizador de acordo com a descrição supracitada. As três formas de fragmentação fornecem material para estudo, mas a fragmentação com homogeneizador é mais prática. Esta não foi realizada, pois no início do estudo não se dispunha desse acessório.

### 3.7.4 Extração do RNA

A extração do RNA total foi obtida com base em metodologia rotineira utilizando-se Trizol® reagente (Invitrogen Cat. # 15596-026). O Trizol é composto de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, solução de desnaturação para isolamento do RNA pela dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Durante o manuseio da amostra com o Trizol é mantida a integridade do RNA e o material está protegido de qualquer contaminação por RNase. Porém, sem o reagente as amostras devem ser manipuladas sempre em gelo (baixas temperaturas inibem a enzima RNase de degradar o RNA das amostras) e com vidrarias e plásticos RNase-Free.

Conforme descrito anteriormente, após a fragmentação do tecido, o mesmo foi imerso no Trizol. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 15-30°C para permitir completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. O sobrenadante contendo o RNA foi transferido para novo tubo seguido da adição de clorofórmio, incubação e centrifugação do material a 4°C, na fase de separação, conforme protocolo. A adição de clorofórmio, seguida da centrifugação, separa a solução em uma fase orgânica inferior avermelhada de fenol-clorofórmio com proteínas, uma interfase com DNA e uma fase superior incolor aquosa, na qual está presente o RNA.

A precipitação do RNA se deu a partir da adição do álcool isopropílico e incubação das amostras a -80°C por 30 minutos para precipitação mais rápida e eficiente. Seguida de centrifugação a 4°C, descarte do sobrenadante e lavagem com Etanol 70%. Ao final do procedimento o *pellet* de RNA foi parcialmente seco a 37°C em placa térmica por 10 minutos, ressuspendido em 20 microlitros (µL) de água livre de RNase (água tratada com DEPC) e incubado por 10 minutos em placa térmica a 58°C. As amostras foram mantidas em gelo a -4°C para uso imediato ou armazenadas em *freezer* a -80°C para uso posterior. O RNA extraído foi quantificado em Nanodrop (*Thermo Scientific*) utilizando 2 µL de cada amostra.

O protocolo foi realizado com clorofórmio e álcool 75% (em água tratada com DEPC) convencional para pesquisa, água tratada com DEPC (*Ultrapure DEPC Treated Water/* invitrogen Cat. # 750023) e álcool isopropílico/isopropanol (*Isopropyl Alcohol/*Amresco Cat. # 0918). Foi adicionado à metodologia o procedimento opcional de limpeza, que

antecede a fase de separação, com centrifugação do material por 10 min. a 4°C a 13.000 rpm ( $12.000 \times g$ ) para todas as amostras.

### 3.7.5 Avaliação da integridade do RNA extraído

A fim de avaliar a integridade do RNA extraído antes de prosseguir com a metodologia de RT-PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (FIG. 7). Todas as vidrarias e materiais de eletroforese utilizados foram lavados com água estéril e água milliQ. A bandeja de corrida da cuba de eletroforese e o pente foram lavados com água estéril, milliQ e finalizados com água tratada com DEPC. Foram utilizadas ponteiras e tubos livres de RNase.

A partir dos valores da quantificação de ácidos nucleicos de cada amostra, foi calculada a quantidade de amostra e de reagentes utilizados para a corrida. O gel foi preparado com agarose de rotina (*agarose for routine use*/ Sigma Cat. # A9539), tampão Tris-Borate-ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (TBE 1x) (TBE 10x/invitrogen Cat. # 15581-044) e brometo de etídio a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*Ethidium bromide solution - BioReagent, for molecular biology*, 10 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$ / Sigma Cat. # E1510). A corrida foi realizada em cuba horizontal 15x15 com o mesmo tampão TBE 1x utilizado para o preparo do gel, à voltagem de cerca de 110 volts por aproximadamente 120 min.

Tanto o padrão de peso molecular 50 bp DNA *Step Ladder* (Promega Cat. # G452A) quanto amostras de RNA foram utilizadas na concentração de 1 micrograma ( $\mu\text{g}$ ) com 1  $\mu\text{L}$  do tampão *Dye 1x (Blue/Orange 6x Loading Dye)* (Promega Cat. # G190A) para um volume final de 6  $\mu\text{L}$  completado com água tratada com DEPC.

O gel foi analisado e registrado utilizando-se sistema de fotodocumentação GelDoc-It TS 310 *Imaging System* - UVP. Com a análise das bandas formadas foi possível verificar se a corrida procedeu corretamente e se o material extraído estava íntegro ou degradado.

FIGURA 7 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade molecular



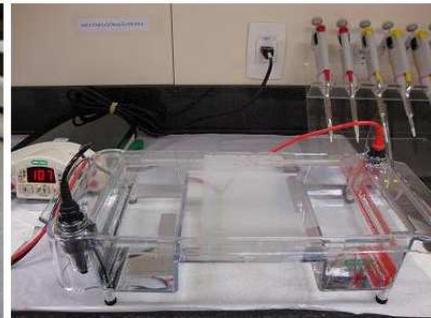
A) Dosagem da Agarose para preparo do gel



B) Gel de agarose em cama de corrida com pente para formação dos poços onde são aplicadas as amostras



C) Amostras



D) Corrida de eletroforese em gel de agarose

### 3.7.6 Tratamento com DNase

O RNA total isolado é livre de proteínas e de contaminação do DNA se manuseado de acordo com o protocolo do Trizol. Para eliminar qualquer vestígio de DNA genômico, antes de submeter as amostras de RNA ao RT-PCR estas foram purificadas em incubação com a enzima DNase utilizando o *kit* RQ1 RNase-Free DNase (Promega Cat. # M6101) e água tratada com DEPC livre de nuclease. A enzima DNase, quando incubada junto das amostras de RNA, elimina vestígios de DNA pela degradação do mesmo.

### 3.7.7 Fenol:clorofórmio

A reação de fenol:clorofórmio é utilizada para a separação de ácidos nucleicos. O fenol desnatura as proteínas (fase orgânica) tornando-as insolúveis à fase aquosa e o clorofórmio facilita a remoção de contaminantes proteicos e de resíduos do próprio fenol. A metodologia em conjunto com a precipitação em etanol remove também sais e impurezas.

Assim, fez-se necessária esta reação para remoção de sais presentes no tratamento com DNase por meio do *kit* RQ1 RNase-Free DNase. A presença de proteínas e sais atrapalha consideravelmente qualquer reação subsequente, como RT e PCR.

Na reação de fenol:clorofórmio, foi adicionada à solução tratada com DNase o mesmo volume de fenol 100%. O material foi centrifugado à temperatura ambiente a 14.000 rpm por cinco minutos para separação das duas fases (fase aquosa - amostra/ fase orgânica-fenol). A fase aquosa contendo a amostra foi transferida para novo tubo e adicionado 100% do volume de clorofórmio. O material foi centrifugado novamente e a fase aquosa transferida para novo tubo. A esse tubo foi adicionado duas vezes o volume de etanol 100% ou uma vez o volume de álcool isopropílico para precipitação a -80°C por 30 minutos, pois os ácidos nucleicos precipitam em etanol/isopropanol à baixas temperaturas. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C para formação do *pellet*.

Ao *pellet* formado foram adicionados 100 µL de etanol 70% para lavagem e este foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado e o *pellet* seco em bloco térmico a 37°C. Em seguida, foi ressuspendido em 15 µL de água RNase-Free, incubado por 10 minutos em bloco térmico a 58°C, para dissolver o *pellet*, e armazenado a -80°C. O RNA extraído foi quantificado em Nanodrop (*Thermo Scientific*) utilizando-se 2 µL de cada amostra.

### **3.8 Pesquisa da translocação *API2-MALT1* por RT-PCR das amostras de tecido fresco**

#### **3.8.1 Reação de transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)**

A transcrição reversa pela enzima RT é uma importante ferramenta na biologia molecular para diversas aplicações, incluindo utilização na metodologia de RT-PCR (CARTER; SAUNDERS, 2007). Estudos moleculares por RT-PCR podem detectar ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) expresso especificamente em células tumorais (WRIGHTSON *et al.*, 2001), bem como avaliar qualquer outro gene a partir dos respectivos mRNAs e análise de expressão genética para detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas.

A RT-PCR envolve duas etapas: transcrição reversa e síntese do DNA complementar à sequência do RNA (cDNA) a partir do molde de RNA (FIG. 8) seguido da amplificação deste (VIEIRA, s.d.). A amplificação *in vitro* do fragmento executada pela PCR é realizada com uma enzima polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA (FIG. 9 e 10). Para que ambas as reações ocorram, é necessária a presença de iniciadores de síntese chamados “*primers*”, sequências de nucleotídeos específicas que indicam o local de início da replicação, que determinará a região a ser transcrita e/ou amplificada (OLIVEIRA, 2000).

FIGURA 8 - Esquema representativo da transcrição reversa e síntese do cDNA a partir do molde de RNA

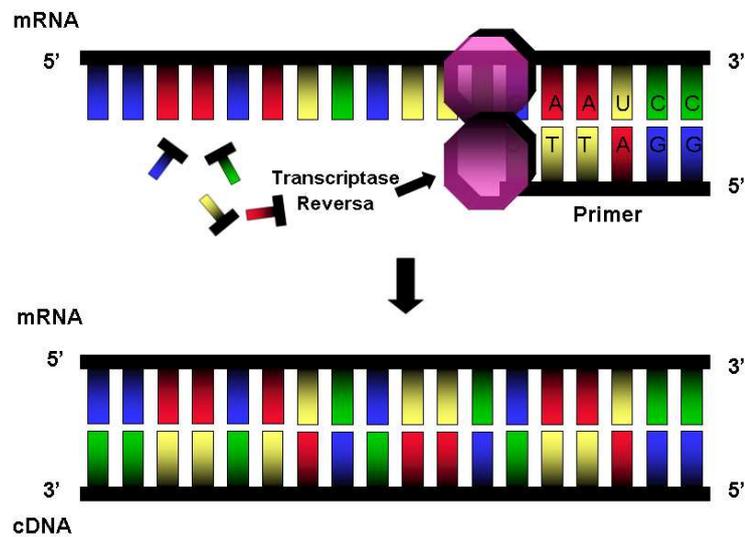


FIGURA 9 - Esquema representativo da PCR no primeiro ciclo

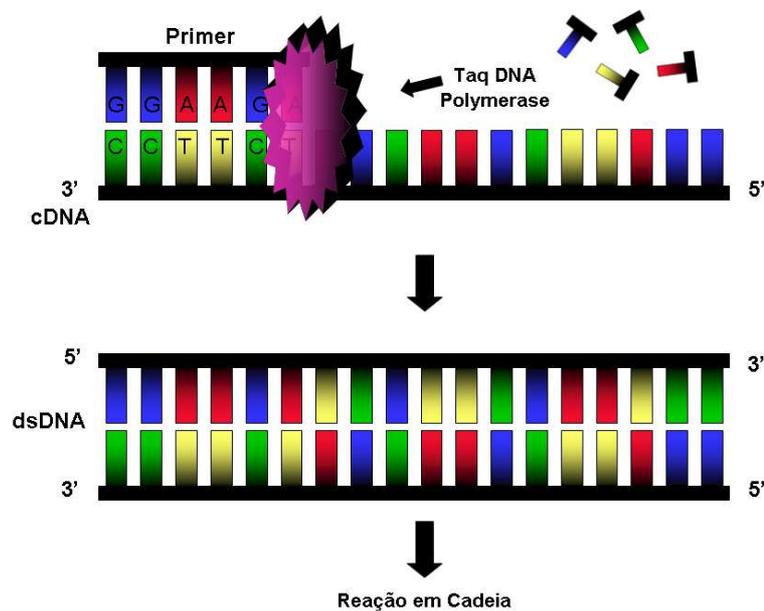
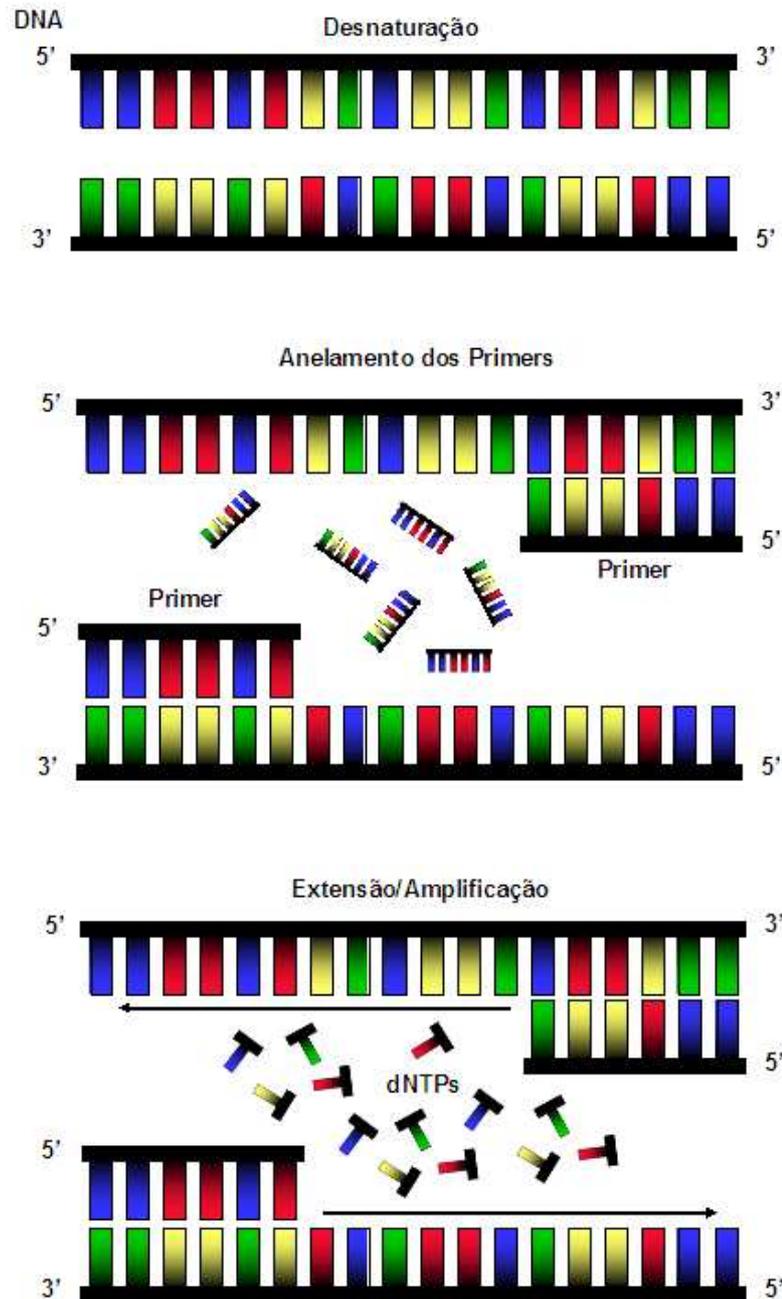


FIGURA 10 - Esquema representativo dos demais ciclos da PCR



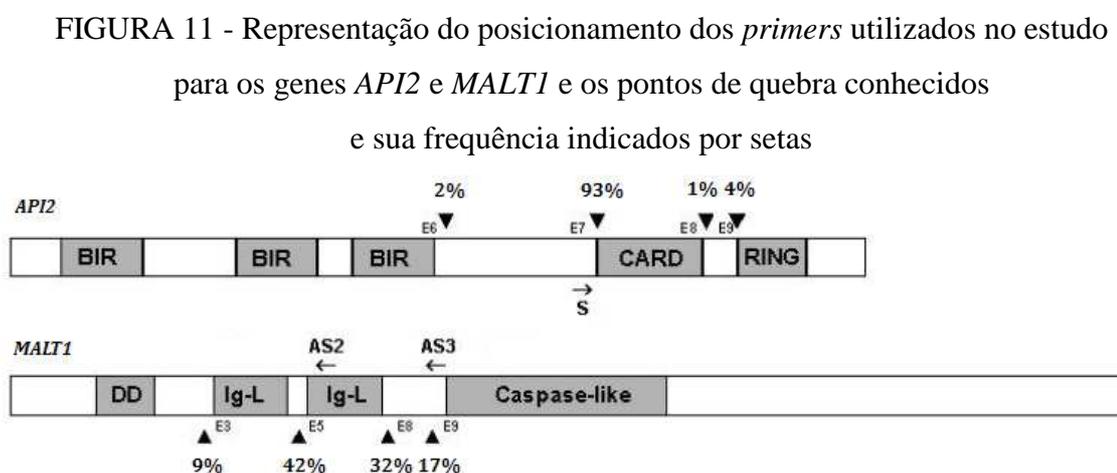
Na reação de transcrição reversa os *primers* se anelam ao RNA para que a enzima RT atue na extensão do anelamento para obter o cDNA. Podem ser usados *primers* específicos, oligo (dT) (compostos de várias timinas consecutivas que são anelados às regiões *Poly-A* na extremidade 3' do RNA) ou *random primers* (*primers* randômicos ou aleatórios de pequenos segmentos de oligonucleotídeos). Na reação da PCR, os *primers* se anelam ao cDNA para que a enzima DNA polimerase atue na extensão do anelamento, e devem ser utilizados *primers* específicos para a região em análise (OLIVEIRA, 2000).

### 3.8.2 Metodologia da RT-PCR

Por se tratar de uma nova metodologia no setor, com a padronização da coleta de tecido fresco, bem como das técnicas em estudo, é indicado o uso de *primers* randômicos ou *primers* específicos em vez de oligo (dT). Assim, no caso de uma eventual degradação do RNA durante a coleta ou manuseio do tecido, a transcrição reversa da região-alvo desejada não seria dependente de uma cauda *Poly-A* intacta.

A RT-PCR foi conduzida com base no *RETROscript® kit* (Ambion Cat. # AM1710). Foram utilizados *primers* randômicos - *random decamers* - para a transcrição reversa, que posteriormente foram substituídos por *primers* específicos do gene *API2-MALT1* e dos genes constitutivos *S15* e *G6PD* como controle positivo (+), para maior especificidade da metodologia, baseado nos artigos de Liu *et al.* (2001b; 2002). A reação de transcrição reversa foi catalisada pela enzima RT chamada *M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)* – MMLV-RT. Foram testadas diversas temperaturas de incubação enzimática e diferentes programações de termociclagem ao longo da padronização.

O produto de fusão *API2-MALT1* foi amplificado pela PCR utilizando *primers forward* (*sense* - S) e *reverse* (*anti-sense* - AS) para avaliação da t(11;18)(q21;q21). Os *primers* para o gene *API2-MALT1* envolvem um iniciador no gene *API2* (S) e dois iniciadores no gene *MALT1* (AS2 e AS3) (FIG. 11). Esses *primers* flanqueiam segmentos de reduzidas dimensões, contendo zonas de fusão, e permitem a amplificação de fragmentos pequenos de cDNA obtidos a partir do RNA isolado (LAGE *et al.*, 2005).



Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2001b).

Os *primers* do gene *S15* amplificam um mRNA ribossomal expresso constitutivamente (*S15*, uma proteína de subunidade ribossomal). O gene *G6PD* pertence à via glicolítica. Inicialmente, foi realizada RT-PCR teste para definir qual desses genes seria utilizado na rotina metodológica. A RT-PCR para o gene *S15* foi procedida conforme RETROscript® *kit* e para o *G6PD* foi montada uma reação-padrão de PCR, com concentrações comumente empregadas como primeira tentativa de uma amplificação desconhecida.

### 3.8.2.1 Preparo dos *primers*

Para o estudo foram desenhados três *primers* para pesquisa do gene *API2-MALT1*, sendo um *forward* e dois *reverse*s; e para o gene *G6PD* um par de *primer* (*forward* e *reverse*) sintetizado pela empresa IDT - Prodimol Ltda. Os *primers* do gene *S15* pertencem ao RETROscript® *kit* (QUADRO 3).

QUADRO 3 – *Primers forward* e *reverse* utilizados para o estudo

Gene	Primer	Sequência do Primer*	Produto da PCR (bp)
<i>API2-MALT1</i>	S	5'-GGA AGA GGA GAG AGA AAG AGC A- 3'	67; 340 73; 100; (133; 197; 230); 409
	AS2	5'-GGA TTC AGA GAC GCC ATC AA- 3'	
	AS3	5'-CAA AGG CTG GTC AGT TGT TT- 3'	
<i>G6PD</i>	S	5' -ACG GCA ACA GAT ACA AGA AC- 3'	87
	AS	5' -CGA AGT GCA TCT GGC TCC- 3'	
<i>S15</i>	S	5' -TTC CGC AAG TTC ACC TAC C- 3'	361
	AS	5' -CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG- 3'	

\* Com exceção do *S15*, os *primers* dos genes *API2-MALT1* e *G6PD* foram desenhados de acordo com Liu *et al.* (2002) e averiguados no banco de dados de sequências genéticas GeneBank® para os genes *API2* (NM\_001165), *MALT1* (AB026118) e *G6PD* (M12996), disponível pelo *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Os *primers* liofilizados adquiridos foram preparados de acordo com sua concentração inicial, dissolvidos em água DNase/RNase-Free para uma concentração estoque de 100 pmol/μL, em seguida, foram aquecidos em bloco térmico a 37°C por 30 minutos e armazenados a -20°C. Estes foram aliquotados e diluídos de acordo com a necessidade de cada procedimento.

### 3.8.2.2 Reação da transcriptase reversa (RT)

Foram utilizadas as amostras de RNA em teste, amostra de RNA do *kit* como controle (+) e controle negativo (-) (reagentes s/ enzima RT). O gene *S15* foi escolhido como controle da reação na rotina.

Optou-se pela execução da técnica RT com pré-aquecimento da amostra a 85°C, para desnaturar estruturas secundárias que poderiam impedir a enzima RT de atuar, por se tratar de uma sequência em foco rica em ligações C≡G.

A metodologia foi estabelecida e padronizada de acordo com o protocolo:

Amostra de RNA -----	1 µg
Mix <i>Primers</i> *-----	50 µM cada
Mix RT**-----	7 µL
MMLV-RT (100 <i>units</i> /µL)-----	1 µL
<i>Nuclease-free Water</i> -----	para 20 µL

\*Mix contendo os *primers* reversos AS2 (50 µM) e AS3 (50 µM), mais *primer S15* (50 µM). A síntese é feita de forma reversa, da extremidade 3' para 5', por este motivo somente os *primers* reversos foram utilizados.

\*\**Mix* RT contendo 10x RT *Buffer*, dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) *Mix* (2,5 mM *each* dNTP), RNase *Inhibitor* (10 *units*/µL) do RETROscript® *kit*.

As amostras foram incubadas a 50°C por 1 hora, para anelamento dos *primers* e síntese do cDNA, seguida de outra incubação a 92°C por 10 minutos para inativação da enzima RT. As amostras foram armazenadas a -20°C (ou encaminhadas diretamente p/ PCR).

### 3.8.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizadas as amostras de cDNA em teste, amostra de cDNA controle (+) da RT, controle (-) da RT e controle (-) da PCR (reagentes s/ amostra).

A amplificação foi executada utilizando a enzima SuperTaq™ DNA *Polymerase* (Ambion Cat. # AM2052). Não foi necessário o tratamento das amostras de cDNA com a enzima RNase antes da PCR, pois a SuperTaq™ DNA *Polymerase* nada sintetiza a partir de RNA que possa estar presente na amostra.

A bibliografia estudada demonstrou diferentes concentrações utilizadas de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). O  $MgCl_2$  é essencial para o sucesso da amplificação por PCR, pois interfere na reação de amplificação por este ser co-fator da enzima Taq DNA *Polymerase*. A concentração de  $MgCl_2$  comumente utilizada varia entre 0,5 a 5 mM. É importante otimizar esta concentração para cada PCR individualmente em busca de um melhor resultado de amplificação.

Alguns transcritos podem apresentar amplificações mais eficientes com maiores concentrações de  $MgCl_2$ . Porém, o excesso de  $MgCl_2$  altera muito a concentração de sais da reação e favorece o acúmulo de produtos de amplificação inespecíficos que podem ser vistos como múltiplas bandas em gel de agarose, enquanto que a insuficiência de  $MgCl_2$  resulta no baixo rendimento do produto da PCR.

Sendo assim, foram realizadas duas PCRs para cada par de *primer* da translocação, uma com  $MgCl_2$  adicional (*API2-MALT1* (+)) e outra sem  $MgCl_2$  adicional (*API2-MALT1* (-)), empregando o  $MgCl_2$  do *kit* da SuperTaq™ DNA *Polymerase* (QUADRO 4).

QUADRO 4 – *Primers forward e reverse* utilizados na PCR

Gene*	Primer	Sequência do Primer
<i>API2-MALT1</i> (1) (+)	S	5`-GGA AGA GGA GAG AGA AAG AGC A- 3'
	AS2	5`-GGA TTC AGA GAC GCC ATC AA- 3'
<i>API2-MALT1</i> (1) (-)	S	5`-GGA AGA GGA GAG AGA AAG AGC A- 3'
	AS2	5`-GGA TTC AGA GAC GCC ATC AA- 3'
<i>API2-MALT1</i> (2) (+)	S	5`-GGA AGA GGA GAG AGA AAG AGC A- 3'
	AS3	5`-CAA AGG CTG GTC AGT TGT TT- 3'
<i>API2-MALT1</i> (2) (-)	S	5`-GGA AGA GGA GAG AGA AAG AGC A- 3'
	AS3	5`-CAA AGG CTG GTC AGT TGT TT- 3'
<i>S15</i>	S	5`-TTC CGC AAG TTC ACC TAC C- 3'
	AS	5`-CGG GCC GGC CAT GCT TTA CG- 3'

\* Foram realizadas duas PCRs para cada par de *primer*, uma com  $MgCl_2$  adicional (+) e outra sem  $MgCl_2$  adicional (-).

A metodologia foi estabelecida e padronizada de acordo com o protocolo:

Para cada teste foram utilizados 5  $\mu$ L de amostra (amostras de cDNA, controle [+] da RT, controle [-] da RT), sendo que para o controle (-) da PCR foi utilizada água DNase/RNase-Free como amostra.

Para a PCR do gene *S15*, que avaliou a presença do cDNA nas amostras antes de prosseguir com a metodologia para o estudo da translocação, foi adicionado às amostras o *mix* PCR:

10x PCR <i>Buffer</i> -----	5 µL
dNTP <i>Mix</i> (2,5 mM) -----	2,5 µL
<i>Primer S15</i> (S/AS) (5µM)-----	2,5 µL
SuperTaq™ DNA Polymerase ---	0,4 µL
Nuclease-free <i>Water</i> -----	para 50 µL

Para as PCRs do gene *API2-MALT1(+)* foi adicionado às amostras o *mix* PCR:

10x PCR <i>Buffer</i> -----	3 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) -----	0,6 µL
dNTP <i>Mix</i> (2,5 mM) -----	2,4 µL
<i>Primer S</i> (100 µM)-----	0,75 µL
<i>Primer AS2</i> ou <i>AS3</i> (100 µM) ---	0,75 µL
SuperTaq™ DNA Polymerase ---	0,5 µL
Nuclease-free <i>Water</i> -----	para 30 µL

Para as PCRs do gene *API2-MALT1(-)* foi adicionado às amostras o seguinte *mix* PCR:

10x PCR <i>Buffer</i> -----	3 µL
dNTP <i>Mix</i> (2,5 mM) -----	2,4 µL
<i>Primer S</i> (100µM)-----	0,75 µL
<i>Primer AS2</i> ou <i>AS3</i> (100 µM) ---	0,75 µL
SuperTaq™ DNA Polymerase ---	0,5 µL
Nuclease-free <i>Water</i> -----	para 30 µL

As amostras de cDNA fita simples foram submetidas como molde à termociclagem, na qual são realizados vários ciclos térmicos de incubação com tempos preestabelecidos específicos em termociclador para cada reação. Após o primeiro ciclo da PCR, a fita simples de cDNA passa a ser fita dupla (dsDNA – *Double stranded* cDNA). Os ciclos térmicos são divididos em etapas de desnaturação a 94°C para separação da dupla-fita, anelamento dos *primers* à fita molde de cDNA com redução da temperatura de acordo com

cada *primer*, e amplificação (extensão) a 72°C para atuação da enzima DNA polimerase. A determinação da quantidade de ciclos depende da taxa de replicação que se busca.

A termociclagem para a PCR utilizando *primers S15* foi realizada de acordo com o programa descrito no manual do RETROscript® kit:

- Desnaturação inicial: 94°C por 4 min.
- Desnaturação, anelamento e amplificação: 94°C por 30 seg.  
55°C por 30 seg.  
(30 ciclos) 72°C por 1 min.
- Extensão final: 72°C por 5 min.

Na PCR do gene *API2-MALT1* foi utilizada uma programação chamada “*Touchdown PCR*”, com emprego inicial da temperatura de anelamento a 65°C e redução progressiva de 1°C por ciclo até alcançar 58°C, a qual foi mantida por mais 35 ciclos. O *Touchdown PCR* otimiza o processo e proporciona mais especificidade à reação.

A amplificação do gene *API2-MALT1* foi baseada nos artigos de Liu *et al.* (2001b; 2002) e padronizada com as seguintes características:

- Desnaturação inicial: 94°C por 5 min.
- Desnaturação, anelamento e amplificação: 94°C por 1 min.  
A cada ciclo a temp. de anelamento foi reduzida 1°C (65°C até 58°C) por 1 min.  
(8 ciclos) 72°C por 1,5 min.
- Desnaturação, anelamento e amplificação: 94°C por 1 min.  
58°C por 1 min.  
(35 ciclos) 72°C por 1,5 min.
- Extensão final: 72°C por 10 min.

As amostras amplificadas foram armazenadas a -20°C ou prosseguiu-se imediatamente para a eletroforese e análise em transiluminador UV.

#### 3.8.2.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose consiste no método-padrão usado para separação de moléculas por migração de partículas durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico. Durante a corrida em gel a água é eletrolisada, gerando um polo negativo (ânodo) e um polo positivo (cátodo). As moléculas de DNA com suas cadeias com grupos fosfato possuem carga líquida negativa e migram para polo positivo. Moléculas de menor massa migram mais rapidamente e os fragmentos de tamanhos diferentes são separados e identificados em “bandas” (LODISH *et al.*, 2002).

O tamanho da molécula e seu formato, bem como a viscosidade do meio (tampão) determinada pelo tamanho dos poros devido à concentração de agarose utilizada, podem interferir na mobilidade eletroforética. A mobilidade também é influenciada pela voltagem aplicada na corrida do gel.

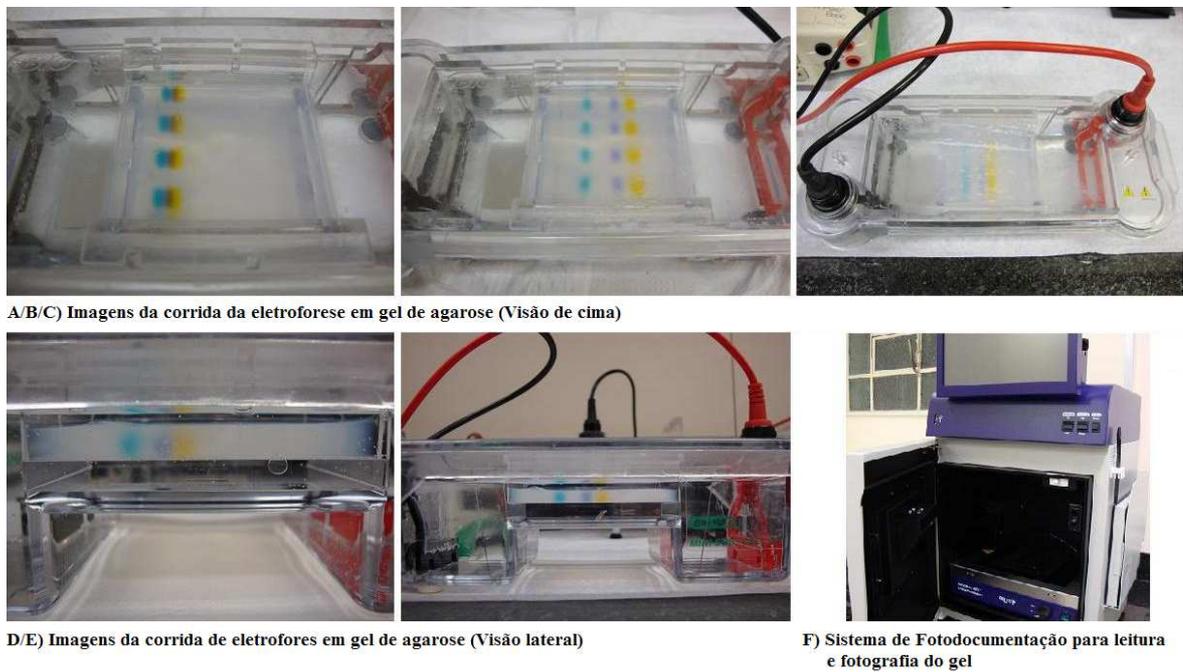
No presente estudo, a verificação da amplificação dos produtos de PCR foi realizada por meio de metodologia rotineira de eletroforese em gel de agarose a 2% com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x) e brometo de etídio (corante fluorescente) a 1 µg/mL (*Ethidium bromide solution - BioReagent, for molecular biology*, 10 mg/mL in H<sub>2</sub>O/ Sigma Cat. # E1510) em cuba horizontal 15x15 ou 07x07. A corrida foi realizada à voltagem de 140 volts quando utilizada cuba de 15x15 e 80 a 90 volts para cuba de 7x7, por cerca de 40 a 50 min. Todas as vidrarias e materiais para eletroforese foram lavados com água estéril e água milliQ e usadas ponteiras e tubos livres de DNase.

A metodologia (FIG. 12 e 13) foi realizada para todas as amostras e controles, incluindo os padrões de peso molecular 25bp DNA *Step Ladder* (Promega Cat. # G451A) e 50 bp DNA *Step Ladder* (Promega Cat. # G452A) com tampão *Dye 1x (Blue/Orange 6x Loading Dye/ Promega Cat. # G190A)* para cada gel, a fim de visualizar-se a corrida de eletroforese em tempo real (FIG. 13) e, posteriormente em transiluminador UV, observar as bandas formadas.

FIGURA 12 - Imagens da execução da técnica PCR em termociclador e preparo da eletroforese em gel de agarose



FIGURA 13 - Imagens da execução da corrida de eletroforese em gel de agarose



As amostras foram aplicadas no gel, de acordo com o protocolo:

- Para verificação do gene *S15* (amostras com volume final da PCR de 50  $\mu\text{L}$ ):
  - a) Corrida dos padrões: 1  $\mu\text{L}$  tampão *Dye*, 2  $\mu\text{L}$  água DEPC, 3  $\mu\text{L}$  padrão 25 bp ou 50 bp para um volume final de 6  $\mu\text{L}$ ;
  - b) Corrida das amostras e dos controles: tampão *Dye* 1x, 15-25  $\mu\text{L}$  do produto da PCR.
- Para verificação do gene *API2-MALT1* (amostras com volume final da PCR de 30  $\mu\text{L}$ ):
  - a) Corrida dos padrões: 1  $\mu\text{L}$  tampão *Dye*, 2  $\mu\text{L}$  água DEPC, 3  $\mu\text{L}$  padrão 25 bp ou 50 bp para um volume final de 6  $\mu\text{L}$ ;
  - b) Corrida das amostras e dos controles: tampão *Dye* 1x, 10-15  $\mu\text{L}$  do produto da PCR.

A quantidade de amostra utilizada deve ser suficiente para a visualização das bandas.

As bandas no gel foram evidenciadas por luz UV, pela excitação do corante fluorescente brometo de etídio que detecta a molécula e a cora por intercalar-se entre os pares de base. O resultado da eletroforese foi analisado e registrado utilizando-se sistema de fotodocumentação GelDoc-It TS 310 *Imaging System* – UVP.

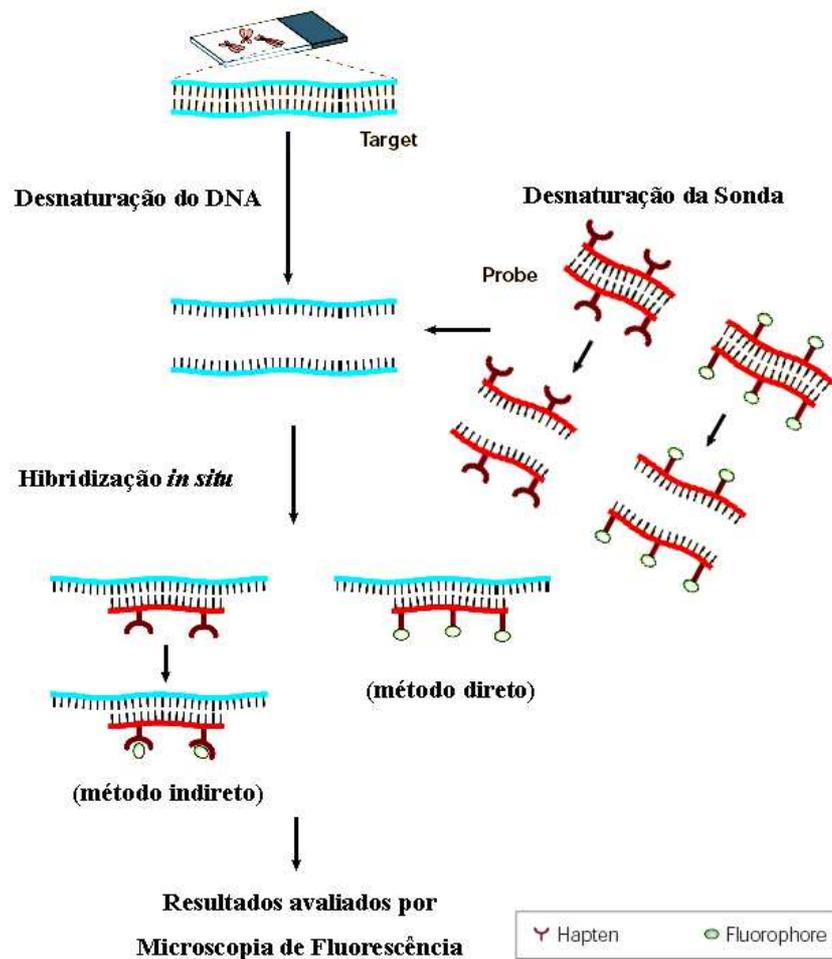
### **3.9 Metodologia estabelecida para pesquisa da translocação por FISH em tecidos incluídos em parafina**

#### **3.9.1 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

A técnica FISH (do inglês *fluorescent in situ hybridization*) baseia-se na formação *duplex*, entre uma sonda (fragmento de ácido nucleico de fita simples modificado) e sua sequência complementar (sequência-alvo) para detecção de regiões específicas nos cromossomos de células em metáfase ou interfase previamente isoladas (FIG. 14) (SCAPIN, 2009).

Existem sondas centroméricas, sondas de sequência única específicas para o cromossomo, sondas para cromossomo inteiro e cariotipagem por espectro multicolorido. Algumas sondas são marcadas diretamente com o fluorocromo (método direto), outras são marcadas com molécula sinalizadora (ex.: biotina ou digoxigenina, também chamadas de haptenos), que se conjuga com outra molécula ligada a um fluorocromo (ex.: avidina ou anticorpo) (método indireto) (FIG. 14) (SCAPIN, 2009).

FIGURA 14 - Esquema representativo da reação de hibridização *in situ* por método direto e indireto



Fonte: Modificado de Speicher e Carter (2005).

FISH é uma importante ferramenta para demonstração de anomalias citogenéticas como monossomias e trissomias cromossômicas, microdeleções e rearranjos cromossômicos, como nas translocações, utilizando sondas específicas como, por exemplo, para evidenciar a t(11;18) presente em alguns pacientes com LMG.

É imperativo identificar genes expressos no desenvolvimento do câncer porque eles podem fornecer alvos para uma terapia dirigida, apesar da heterogeneidade genética da população e variabilidade genética dessas mutações (BISHOP, 2010). Cânceres histologicamente semelhantes que parecem idênticos ao microscópio podem ter cursos clínicos bastante distintos, resultado de diferentes eventos genéticos. A patologia molecular tenta auxiliar no diagnóstico e na precisão morfológica dessas análises, a partir da caracterização de mutações genéticas e produtos de genes. FISH permitiu avanços significativos no

diagnóstico e desenvolvimento de tecnologias *in situ* para detecção de vários alvos e informações ainda desconhecidas sobre a expressão de genes (LEVSKY; SINGER, 2003). Abordagem e interação recíprocas entre médicos, geneticistas e patologistas são essenciais, pois as informações geradas contribuirão para o diagnóstico mais preciso e tratamento mais eficaz (VENTURA *et al.*, 2006).

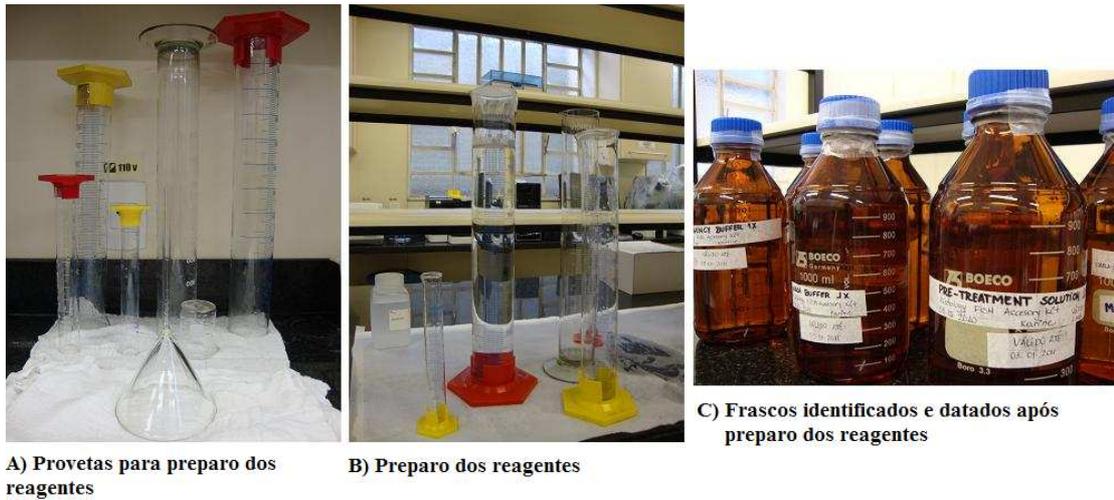
A técnica tem alta sensibilidade e especificidade com alta eficiência de hibridização e detecção. Uma vantagem particular é a possibilidade de realização da metodologia diretamente em preparados citológicos/histológicos e seções do tecido (BISHOP, 2010). Devem-se levar em consideração vários fatores para a análise dos resultados, como as características do tecido, fixação prévia à realização da metodologia e a natureza complexa dos arranjos genéticos de algumas neoplasias linfoides (VENTURA *et al.*, 2006).

### **3.9.2 Metodologia da FISH**

A técnica FISH foi desempenhada utilizando-se o *Histology FISH Accessory Kit* (DakoCytomation Cat. # K5599) para tecido fixado em formol e incluído em parafina. O *kit* contém todos os reagentes para hibridização, exceto a sonda para identificação do produto de fusão *API2-MALT1* (*MALT1 FISH DNA Probe, Split Signal/DakoCytomation* Cat. # Y5409).

A reação ocorre em lâmina, sendo o preparo da mesma e a desparafinização, que antecedem a metodologia de hibridização, realizados com materiais adquiridos separadamente. Todos os reagentes necessários foram previamente preparados e diluídos na quantidade necessária para execução da metodologia (FIG. 15). Provetas, frascos, cubas, jarras de Coplin (*Coplin jars*) e demais itens foram higienizados com detergente neutro e enxaguados com água estéril (ou água destilada) e milliQ.

FIGURA 15 - Imagens do preparo dos reagentes para a técnica FISH



Trata-se de uma metodologia muito sensível em que todas as etapas possuem variáveis para que tudo transcorra da forma esperada. A técnica foi realizada diversas vezes, com diferentes temperaturas de incubação, banhos e tempos de digestão proteolítica para a padronização. A escolha adequada da sonda e a temperatura de uso dos reagentes são imprescindíveis para alcançar os resultados esperados (QUADRO 5). As temperaturas devem ser verificadas com termômetros de imersão mergulhados diretamente no reagente.

QUADRO 5 – Reagentes utilizados para FISH

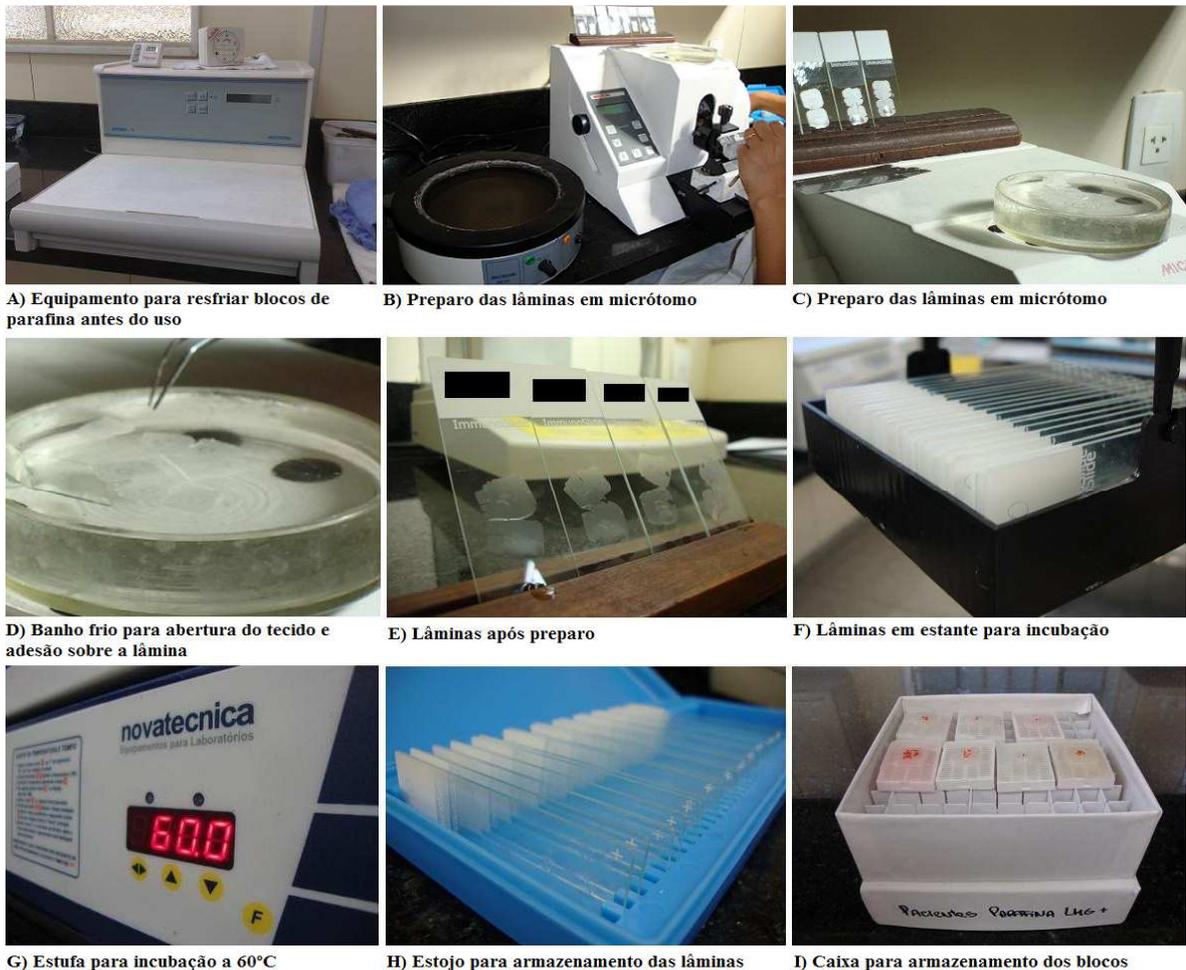
Produto original	Reagente	Concentração de uso	Temperatura de armazenamento da solução de uso	Temperatura de uso dos reagentes
Xilol	Xilol	Pronto para uso	TA* ou 2-8°C	TA* ou 2-8°C
Álcool Absoluto	96% Etanol	96% Etanol	Validade:	TA* ou 2-8°C
	85% Etanol	85% Etanol	Para uso de até	TA* ou 2-8°C
	70% Etanol	70% Etanol	200 lâminas	TA* ou 2-8°C
Histology FISH Accessory Kit	<i>Pre-treatment Solution 20x</i> (Solução de pré-tratamento)	[1x]	2-8°C Validade: 1 mês	95-99°C em <i>Coplin Jar</i>
	Pepsina	Pronto para uso	-20°C	2-8°C em gelo
	<i>Wash Buffer 20x</i> (Tampão de lavagem)	[1x]	2-8°C Validade: 1 mês	TA* em <i>Coplin Jar</i>
	<i>Stringency Buffer 20x</i> (Tampão de estringência)	[1x]	2-8°C Validade: 1 mês	TA* em <i>Coplin Jar</i> 63-67°C em <i>Coplin Jar</i>
	<i>Fluorescence Mounting Medium</i> (Meio de montagem com fluorescência)	Pronto para uso	-20°C	2-8°C em gelo

\*TA- Temperatura ambiente entre 20 e 25°C.

### 3.9.3 Produção das lâminas

As amostras de tecido gástrico (grupo 1 - não portadores de LMG e grupo 2A - portadores de LMG), incluídas em blocos de parafina pelo Laboratório de Anatomia Patológica do IAG, foram preparadas conforme orientações do *Histology FISH Accessory Kit*. Os blocos pertencentes a cada grupo, com tecidos fixados em formol a 10%, foram separados e identificados por caixa. Estes foram resfriados e submetidos a dois cortes de 4  $\mu\text{m}$  cada em micrótomo rotativo. Os cortes foram mergulhados em banho frio para abertura do tecido e adesão sobre lâminas sinalizadas com carga (+) para melhor fixação do tecido, previamente identificadas por código. Posteriormente, foram mergulhados em banho histológico a 50°C para fixação do tecido na lâmina. Após o preparo, as lâminas foram incubadas em estufa a 60°C por 60 min-2 horas, resfriadas em TA e armazenadas em estojo individual por grupo em geladeira 2-8°C até o uso (FIG. 16). Para reduzir o *background*, as lâminas foram incubadas a 60°C por 1 hora em bloco térmico, antes da desparafinização.

FIGURA 16 - Metodologia de produção de lâminas para a técnica FISH



### 3.9.4 Desparafinização das lâminas

A desparafinização ocorreu de acordo com o protocolo:

Cuba 1: Xilol-----	5 min. de imersão
Cuba 2: Xilol-----	5 min. de imersão
Cuba 3: Álcool 96%-----	3 min. de imersão
Cuba 4: Álcool 96%-----	3 min. de imersão
Cuba 5: Álcool 70%-----	2 min. de imersão
Cuba 6: Álcool 70%-----	2 min. de imersão
Cuba 7: <i>Wash Buffer</i> (1x)	2 min. de imersão

### 3.9.5 Hibridização *in situ*

O protocolo foi desenvolvido seguindo todas as orientações do *Histology FISH Accessory Kit* com a seguinte determinação dos tempos e temperaturas:

- Pré-tratamento

Solução de pré-tratamento em banho-maria (com água) a 98°C por 15'.

Nova solução a TA (20-25°C) por mais 15'.

Lavar lâminas com *Wash Buffer* (solução-tampão) a TA por 3', repetir em novo frasco.

- Digestão proteolítica com pepsina

Aplicar cinco gotas de pepsina a 2-8°C diretamente na amostra.

Incubar em bloco térmico a 37°C por 6-8'.

Lavar lâminas com *Wash Buffer* a TA por 3', repetir em novo frasco.

- Hibridização

Desidratar os cortes de tecido em etanol a 2-8°C por uma série de banhos: etanol 70% por 2', etanol 85% por 2', etanol 96% por 2'.

Aplicar 10 µL da sonda *MALTI* na área em foco para interação às sequências-alvo.

Colocar lamínula 18 mm x 18 mm e passar goma selante em volta da lamínula.

Incubar em bloco térmico para lâminas a 82°C por 5'.

Deixar lâminas em câmara úmida escura a 45°C por 14-20 horas.

- Lavagem

Lavar lâminas sem o selante com *Stringency Buffer* à TA para remoção de todas as lamínulas e depois em banho-maria a 65°C por 10'.

Lavar lâminas com *Wash Buffer* à TA por 3', repetir em novo frasco.

Desidratar os cortes de tecido em etanol a 2 a 8°C por uma série de banhos: etanol 70% por 2', etanol 85% por 2', etanol 96% por 2'.

- Montagem

Aplicar 15 µL do *Fluorescence Mounting Medium* (DAPI), contraste de fundo fluorescente azul para a área-alvo da lâmina.

Colocar lamínula e selar com esmalte.

- Leitura

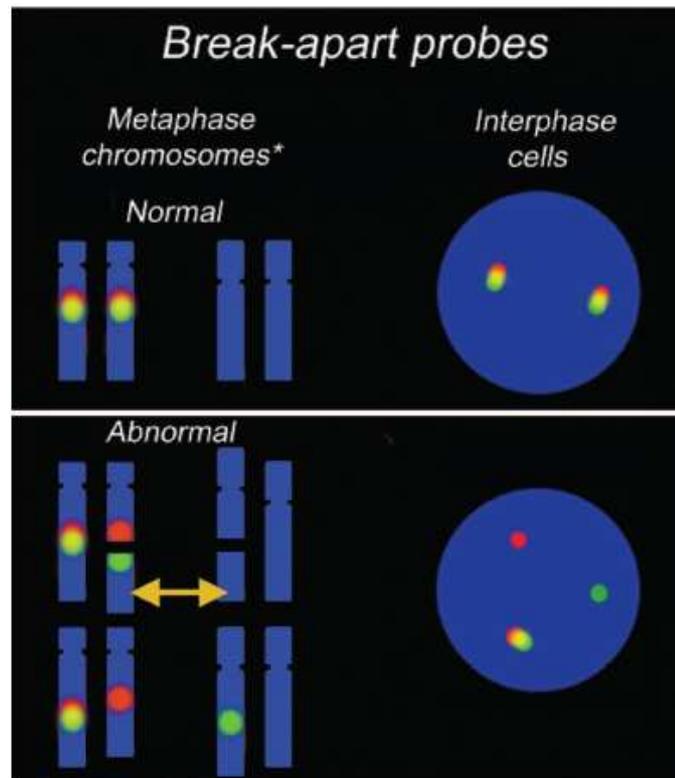
Realizar leitura das lâminas após 15' ou até no máximo sete dias após montagem.

A leitura deve ser realizada em toda a área hibridizada.

Armazenar as lâminas em câmara escura para evitar perda da fluorescência a -20°C.

De acordo com a bula da sonda *MALT1 FISH DNA Probe*, as sequências marcadas são projetadas para hibridizar nos dois sentidos da região dos pontos de quebra do cromossomo 18q21: *MALT1-Upstream (Texas Red)* e *MALT1-Downstream (FITC)*. Os resultados são evidenciados por um sinal conjugado vermelho/verde, nos núcleos sem translocação, enquanto que em achados com a translocação as cores aparecem separadas, um sinal vermelho (*Texas Red*) e outro verde (*Fluorescein isothiocyanate - FITC*) (FIG. 17).

FIGURA 17 - Esquema representativo da leitura da hibridização da sonda *MALT1 Split Signal*, utilizada no estudo



Esta sonda identifica as sequências-alvo emitindo coloração vermelha e verde que, quando aparecem unidas, caracteriza indivíduo normal; e quando separadas, indica translocação.

Fonte: Modificado de Ventura *et al.* (2006).

A hibridização *in situ* foi avaliada em microscópio de fluorescência (BX-51 *Olympus*) utilizando filtros Dapi, FITC, FITC-*TexasRed* (duplo), com lâmpada de alta pressão de mercúrio (100 W) e objetivas de 10X, 20X, 40X e 100X com imersão em óleo. Os filtros são desenhados para fluorocromos específicos e devem ser escolhidos de acordo com os sinais a serem detectados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização deste projeto foi inicialmente realizada ampla estruturação do Laboratório de Pesquisa do IAG-HC-UFMG, com aquisição de novos equipamentos, acessórios e demais materiais, incluindo *kits* e reagentes necessários ao desenvolvimento do estudo. O apoio do Instituto foi imprescindível para a execução do trabalho e implementação da rotina envolvendo estudos moleculares e de hibridização *in situ* essenciais para o projeto. Atualmente, o espaço conta com uma estrutura que possibilita a realização de diversos tipos de pesquisas científicas, histológicas e genéticas moleculares para diferentes doenças.

Para o estudo, primeiramente foi realizada a validação dos processos e procedimentos requeridos ao projeto em relação à segurança e replicabilidade das técnicas. Os protocolos descritos para a pesquisa da translocação foram primeiramente analisados e adaptados ao ambiente de trabalho e realidade do IAG. A mesma padronização foi feita em relação aos procedimentos de rotina, como: triagem, seleção e inclusão de pacientes, aplicação do TCLE, coleta de dados, coleta de material biológico, preparo e armazenamento dos tecidos. Os protocolos e procedimentos desenvolvidos serão executados futuramente na rotina hospitalar, sempre acompanhados da avaliação clínica dos pacientes e seguimento por equipe multidisciplinar capacitada e dedicada.

Das quatro metodologias previstas no projeto inicial para estudo da translocação  $t(11;18)(q21;q21)$ , RT-PCR e FISH, para tecido fresco e em parafina, foi possível apenas a realização do RT-PCR para tecido fresco e FISH para tecido em parafina. Mesmo com o detalhamento das duas metodologias não utilizadas, as mesmas não puderam ser aplicadas nas duas diferentes amostras propostas no projeto, pelas questões técnicas a seguir:

- a) RT-PCR para tecido em parafina: não foi possível a realização em decorrência da escassez do material arquivado de pacientes positivos para LMG (material de arquivo que foi utilizado na metodologia de FISH);
- b) FISH para tecido fresco: não foi possível a realização devido à falta de sujeitos de pesquisa doadores de tecido tumoral fresco durante o decorrer do estudo.

O número de amostras de tecido fresco incluídas foi abaixo (oito pacientes) do estimado (20 pacientes), em decorrência do reduzido número de pacientes portadores de LMG atendidos no IAG-HC-UFMG no período do estudo. A taxa de incidência de atendimento na instituição a pacientes com suspeita ou portadores de LMG até o primeiro ano do estudo era ascendente no IAG. Estimou-se que seriam atendidos cerca de 10 casos/ano nos próximos anos, por esse motivo nossa estimativa otimista para o período do mestrado (dois anos) foi de 20 casos. Apesar de se ter superestimado a casuística desses pacientes, a atual redução desta, devido à determinação, pelo governo federal, de atendimento exclusivo aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) nos Hospitais Universitários Federais, excluindo, portanto, os pacientes particulares e usuários de planos de saúde, contribuiu para a redução do número de casos de LMG atendidos no Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG.

#### 4.1 RT-PCR – Avaliação do tecido fresco

A quantificação de ácidos nucleicos após extração do RNA das amostras de tecido fresco estudadas indicou uma boa quantidade de material para trabalho (QUADRO 6).

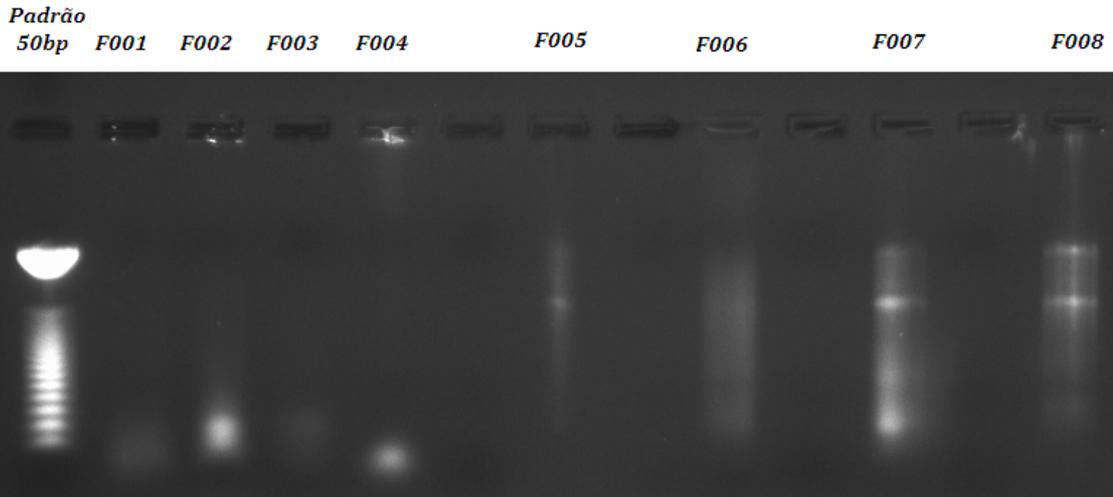
QUADRO 6 – Quantificação de RNA extraído das amostras de tecido fresco

<b>Leitura da Quantificação de Ácidos Nucleicos (RNA)</b>		
Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/ $\mu$ l)	Razão Absorbância 260/280
F001	1785,50	2,07
F002	313,40	2,08
F003	82,90	1,82
F004	1027,50	1,95
F005	1310,70	1,96
F006	1274,00	1,90
F007	2423,30	1,98
F008	1493,70	1,98

A avaliação de integridade do RNA extraído em gel de agarose demonstrou que possivelmente erros ocorreram durante o estabelecimento da coleta de tecido fresco no início do estudo, provavelmente devido ao intervalo de tempo entre a coleta do tecido e a imersão do mesmo em RNA $later$ , o que resultou na degradação de algumas amostras (FIG. 18). Esse fato não excluiu esse material do estudo, mas constituiu indício de possível

resultado falso-negativo na identificação da translocação. Por este motivo, foram desenhados *primers* específicos e de sequências curtas para que a degradação do material não interferisse na análise durante a RT-PCR. Os erros de coleta foram corrigidos para as amostras subsequentes durante a padronização do procedimento.

FIGURA 18 - Gel de agarose a 1% mostrando a integridade das amostras de RNA



As amostras F001 a F004 demonstraram estar degradadas, a amostra F006 provavelmente em fase de degradação e demais amostras com material satisfatório.

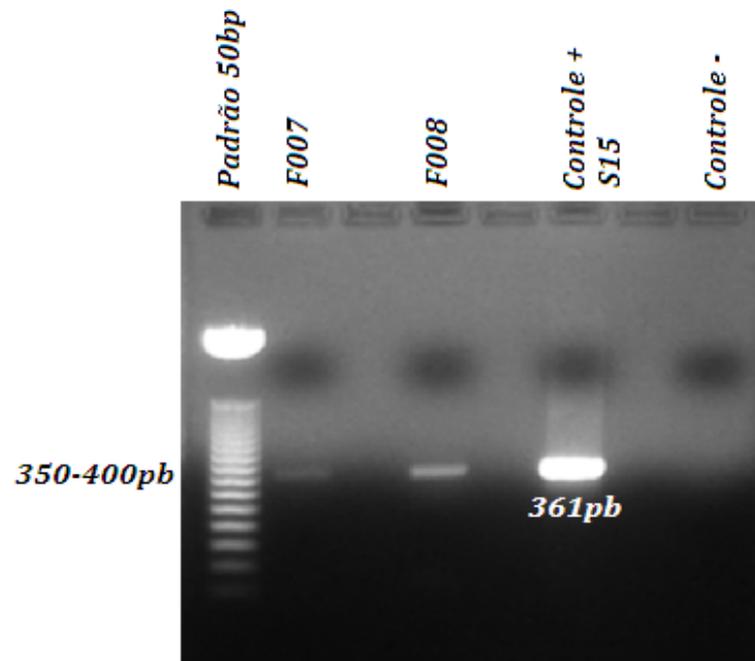
A purificação, das amostras de RNA total de cada sujeito de pesquisa, por incubação com a enzima DNase e reação de fenol:clorofórmio, levou a uma redução considerável na concentração do RNA (QUADRO 7), embora os valores tenham se mantido dentro da normalidade. É comum a perda de material durante a extração, purificação ou qualquer outra metodologia que envolva manipulação de amostra de ácido nucleico.

QUADRO 7 – Quantificação de RNA após purificação das amostras

<b>Leitura da Quantificação de Ácidos Nucléicos (RNA)</b>		
Amostra	Concentração de ácido nucleico (ng/ $\mu$ l)	Razão Absorbância 260/280
F001	210,40	1,98
F002	41,90	1,51
F003	30,20	1,76
F004	158,90	1,61
F005	229,40	2,02
F006	289,40	2,02
F007	1306,80	2,07
F008	397,60	2,04

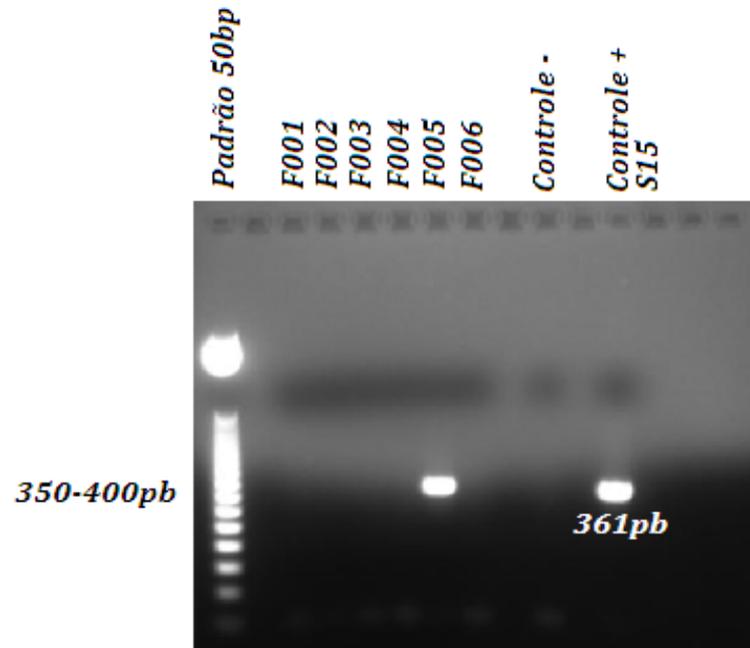
Conforme descrito no protocolo de RT-PCR, após o tratamento das amostras de RNA, a síntese do cDNA foi inicialmente realizada utilizando-se *primers* randômicos. A PCR executada para o gene *S15* como controle (+), comprovou a presença do cDNA apenas nas amostras F005, F007 e F008 (FIG. 19 e 20), resultado compatível com o quadro de degradação demonstrado no gel de análise da integridade das amostras, onde pôde ser verificada a degradação das amostras F001, F002, F003, F004 e F006 (FIG. 18).

FIGURA 19 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene *S15* nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de *primers* randômicos



Gene *S15* presente nas amostras F007, F008 e C +.

FIGURA 20 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene *S15* nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de *primers* randômicos



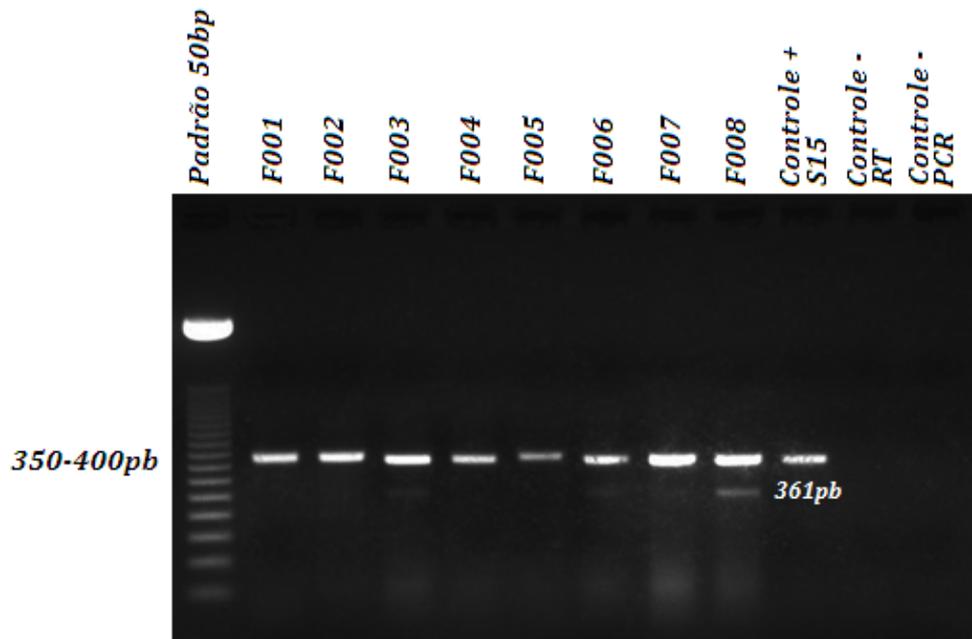
Gene *S15* presente apenas nas amostras F005 e Controle (+).

A PCR para o gene *API2-MALT1* e caracterização dos transcritos de fusão por eletroforese em gel de agarose a 2%, das amostras de cDNA sintetizadas a partir de *primers* randômicos, apontou muitas reações inespecíficas no gel. Evidenciou-se, inclusive, material genético em algumas amostras nas quais previamente não havia sido identificado o gene *S15*. Isso foi um indício de que algumas amostras poderiam estar um pouco degradadas, mas com o aumento da especificidade da reação seria possível conseguir identificar os genes em estudo.

Deste modo, optou-se, em seguida, pela síntese do cDNA com *primers* específicos em conjunto para a translocação *API2-MALT1* e para o gene *S15*. A síntese do cDNA realizada separadamente (individualmente) para cada *primer* gene-específico contribuirá ainda mais para mais especificidade. Porém, devido à escassez de material para estudo, a síntese foi realizada em conjunto com os *primers* específicos (*S15*, AS2 e AS3) e somente a PCR foi executada separadamente para cada par de *primer*.

A maior especificidade da reação, devido a síntese do cDNA com *primers* específicos, conduziu à detecção do gene *S15* em todas as amostras estudadas (FIG. 21).

FIGURA 21 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene *S15* nas amostras de cDNA do estudo, que foram sintetizadas a partir de *primers* específicos para o gene



Gene *S15* presente em todas as amostras, o que indica a síntese do cDNA com sucesso em todas elas.

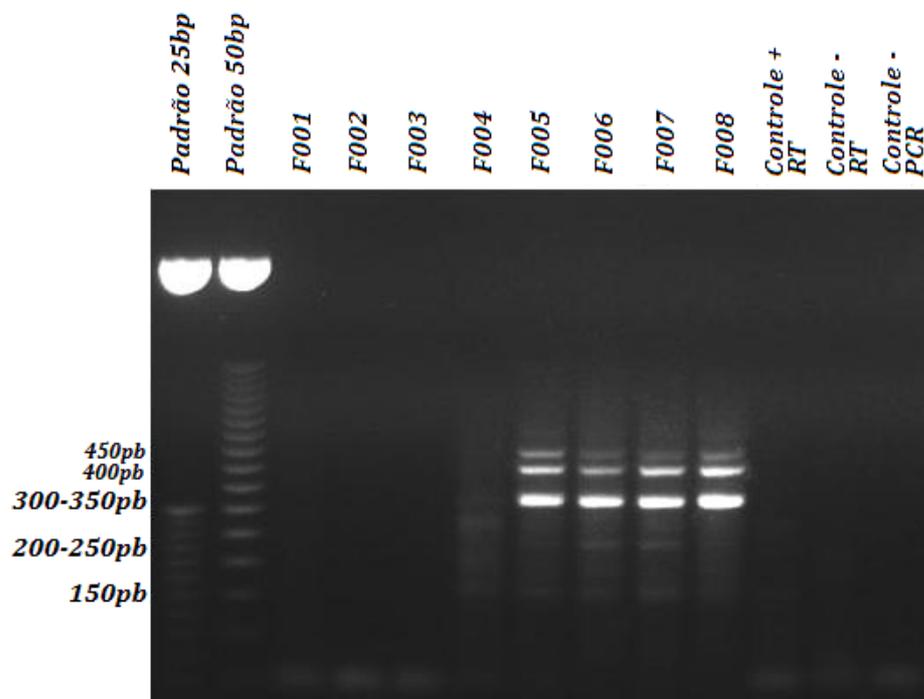
Na rotina de pesquisa é muito comum fazer a síntese inicialmente com os *primers* randômicos. Quando se faz a síntese do cDNA com *primers* randômicos ou oligo (dT), a síntese ocorre para todos os tipos de transcritos, o que significa ter menos especificidade da enzima RT. O RNA total, mesmo degradado, pode conter sequências identificáveis e o aumento da especificidade da reação nessas amostras fez com que fossem possíveis a identificação e a síntese do gene pela transcriptase reversa e amplificação de fragmentos do gene *S15*.

Perante os novos resultados, foi realizada a PCR para *API2-MALT1* utilizando-se cDNA sintetizado com *primers* específicos e diferentes concentrações de  $MgCl_2$  para cada par de *primer* para todas as amostras, como descrito na metodologia. As bandas identificadas ficaram mais bem apresentadas na reação sem adição extra de  $MgCl_2$ , pois, apesar do

aumento da concentração de magnésio ser positivo para algumas PCRs, pode também favorecer a ocorrência de reações inespecíficas.

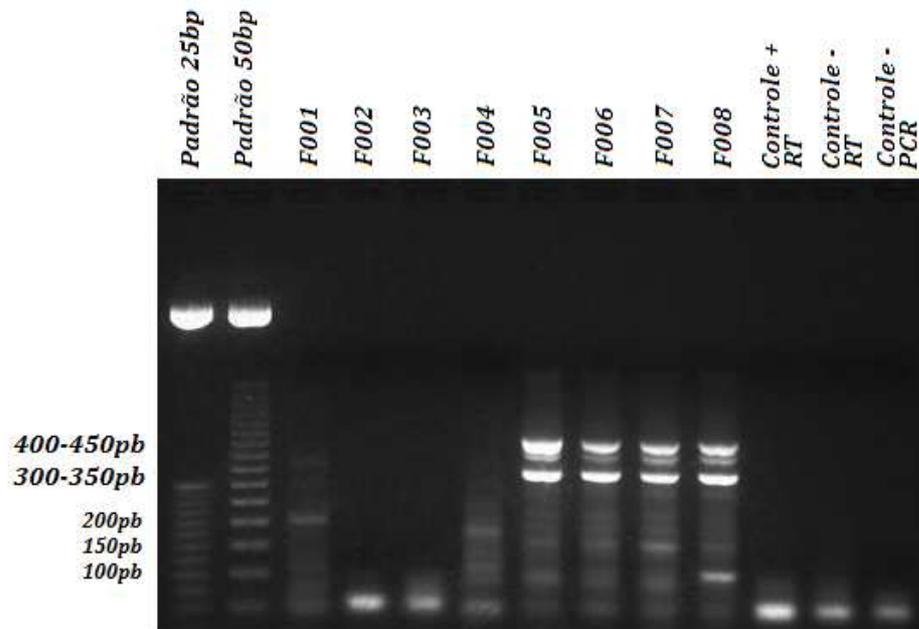
Embora algumas amostras estivessem um pouco degradadas, foi possível o estudo da translocação, tendo em vista que os *primers* desenhados eram bem curtos. Os resultados utilizando um iniciador no gene *API2* (S) e dois iniciadores no gene *MALT1* (AS2 e AS3), de acordo com os pontos de quebra descritos, detectaram a translocação *API2-MALT1* em quatro amostras: F005, F006, F007 e F008 (FIG. 22 e 23). O transcrito de comprimento total encontrado característico para AS2 contém entre 300 e 350 pares de bases (pb) (FIG. 22) e para AS3 contém entre 400 e 450pb (FIG. 23). Esses resultados são compatíveis com os produtos da PCR descritos por Liu *et al.* (2002), que ressaltam que AS2 apresenta fragmentos de 67pb e/ou 340pb e AS3 fragmentos de 73, 100 e/ou 409pb. A ausência de bandas no gel para *API2-MALT1* equivale a pacientes sem a translocação.

FIGURA 22 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene *API2-MALT1* (AS2) nas amostras F005, F006, F007 e F008



PCR realizada após RT das amostras utilizando *primers* específicos para o gene.

FIGURA 23 - Gel de agarose a 2% mostrando a presença do gene *API2-MALT1* (AS3) nas amostras F005, F006, F007 e F008



PCR realizada após RT das amostras utilizando *primers* específicos para o gene.

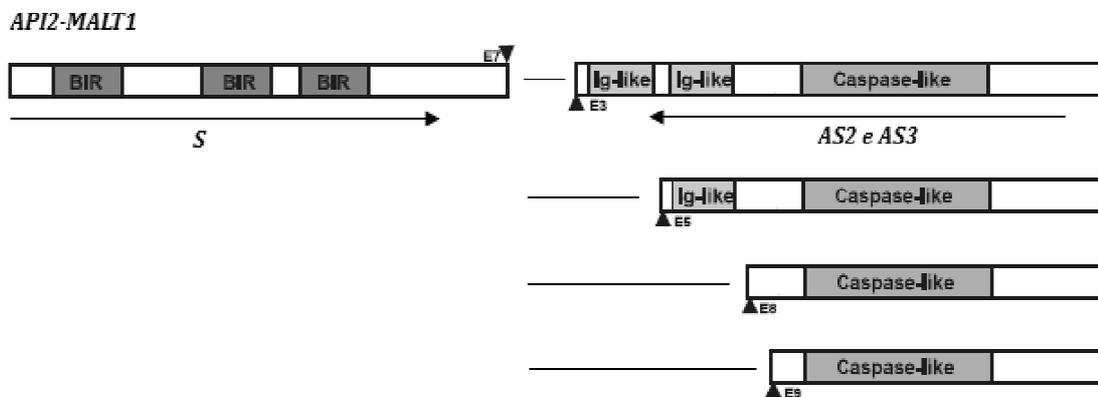
As demais bandas presentes em ambos os géis sugerem amplificações inespecíficas e/ou *splices* (ou *splicing*) alternativos na fase de síntese do mRNA (na célula ainda viva), devido à supressão ou deleção de um ou mais éxons do gene *MALT1*, sendo bem provável que as amplificações do produto *API2-MALT1* (AS3) de 100-250bp sejam *splices* alternativos do transcrito da fusão entre os genes, como também foi descrito por Liu *et al.* (2002).

As bandas encontradas com tamanhos diferentes dos de 100-250 bp não foram encontrados registros na literatura, existe a possibilidade que sejam interações inespecíficas com sequências do *S15* ou da outra translocação tendo em vista que fizemos a síntese do cDNA em conjunto (*S15+MALT1+MALT2*), mas devido às suas características e ausência em controles normais, caracterizam possivelmente novos rearranjos (outros tipos de translocações), o que poderá somente ser confirmado a partir do sequenciamento destes transcritos desconhecidos, verificação de similaridade com alguma parte dos demais genes sintetizados em conjunto, caracterização dos *splices* alternativos e estudo mais detalhado de pontos de *splicing*.

A caracterização por sequenciamento direto do transcrito confirmará também a presença do transcrito de fusão *API2-MALT1* resultante da translocação t(11;18)(q21;q21), bem como avaliará a frequência e o tipo de fusão *API2-MALT1* mais presente, o que pode exprimir importantes informações na correlação com os resultados do presente estudo.

Os resultados sugerem que o transcrito de fusão *API2-MALT1* encontrado nos quatro pacientes positivos para a t(11;18) é característico da fusão entre os éxons E7 do gene *API2* e E5 do gene *MALT1* (FIG. 24), corroborando os achados no estudo de Liu *et al.* (2002) com padrão de bandas similar. O tamanho das bandas indica o ponto de quebra do gene *MALT1* em cada paciente, porém só se pode saber ao certo com o sequenciamento desses produtos de fusão como já comentado. É necessário analisar cada resultado, pois o número de combinações possíveis é imprevisível. As consequências dos *splices* alternativos descritos na literatura ainda não são claras.

FIGURA 24 - Representação dos possíveis produtos de fusão *API2-MALT1* mais frequente



Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2002); Mathijs *et al.* (2000).

Segundo Lage *et al.* (2005), o domínio *Ig-like* no transcrito *API2-MALT1* resultante da translocação t(11;18)(q21;q21), caracterizado por uma banda de peso molecular aproximado de 400 pb, correlaciona-se diretamente com formas mais agressivas de linfoma e não regressão do LMG após resposta positiva à terapêutica de erradicação do *H. pylori*.

Os resultados obtidos revelam a necessidade de estudos adicionais, além da importância da caracterização por sequenciamento dos transcritos de fusão *API2-MALT1* encontrados para

um diagnóstico preciso, melhor compreensão da funcionalidade de cada tipo de transcrito e esclarecimentos quanto à sua patogenicidade. A caracterização desses transcritos determinará as características que cada um imprime na evolução do linfoma MALT gástrico.

É sabido a importância do sequenciamento dos produtos da PCR para a padronização da metodologia e como garantia e confirmação diagnóstica. Através da eletroforese em gel de agarose foi possível a verificação de todos os resultados descritos e das translocações presentes em alguns pacientes, mas para diagnóstico é imperativo o sequenciamento dos genes encontrados.

O sequenciamento não foi inicialmente previsto no estudo devido ao tempo hábil para conclusão do mesmo, pois envolve muitas etapas. Neste estudo especificamente, como foram identificadas diversas bandas (produtos de PCR com mais de uma amplificação) é necessária a purificação de cada uma delas individualmente pela extração dessas bandas do gel de agarose para posterior sequenciamento através do estabelecimento de parcerias ou colaborações para este serviço. A padronização da metodologia de purificação para a realização do sequenciamento, requer maior volume de amostras, tempo para execução, conhecimento técnico, reagentes e kits para padronização.

#### **4.1.1 Aspectos clínicos**

Na avaliação clínica dos pacientes pertencentes ao grupo 2B houve predomínio de sintomatologia dispéptica inespecífica. Os aspectos endoscópicos mais frequentemente observados consistiram em ulcerações com infiltrados linfoides sugestivos de LMG. Histologicamente, entre os oito pacientes estudados, sete correspondiam à LMG de baixo grau e um linfoma de alto grau. O tratamento anti-*H. pylori* consistiu na associação de omeprazol, claritromicina e amoxicilina durante uma ou duas semanas. Todos os pacientes obtiveram sucesso com a terapia de erradicação da bactéria, sendo que dois pacientes necessitaram de um segundo regime terapêutico e um paciente (F008) recebeu tratamento anti-*H. pylori* mesmo sem confirmação da infecção (QUADRO 8).

A ausência da translocação nos pacientes F001, F002 e F003 coincidiu com a evolução clínica favorável com regressão histológica tumoral (remissão completa do LMG) após erradicação do microrganismo, resultado condizente com os estudos descritos ao longo do trabalho. A translocação não foi detectada no paciente portador de linfoma com componente de alto grau (F004), que, devido ao comportamento tumoral, foi encaminhado à quimioterapia (QT).

Verificou-se a translocação (11;18) em 50% (4/8) dos casos com diagnóstico inicial de LMG de baixo grau (F005, F006, F007 e F008), caracterizados por bandas no gel de agarose com cerca de 300-350 e 400-450 pb. Entre eles, dois obtiveram regressão histológica tumoral após erradicação do microrganismo e os outros dois evoluíram para tratamento quimioterápico, sendo que um deles (F008) evoluiu para linfoma de alto grau estágio IV e foi encaminhado para quimioterapia e radioterapia. O perfil clínico dos oito pacientes portadores de LMG pertencentes ao grupo de estudo 2B encontra-se descrito no QUADRO 8.

A identificação da  $t(11;18)(q21;q21)$  em pacientes portadores de LMG é hoje conduta sugerida pelo consenso europeu sobre LMG (RUSKONE-FOURMESTRAUX *et al.*, 2011). Sua detecção precoce contribui significativamente para a melhor definição da terapêutica a ser implementada a cada paciente, além de promover redução de custos médicos e hospitalares durante o período de acompanhamento aos pacientes para verificação dos efeitos da erradicação do *H. pylori* sobre o tumor, período este que pode chegar a um ano ou mais.

As metodologias aplicadas no estudo possuem custo elevado, em torno de R\$ 900,00 por paciente, e levam em torno de três a cinco dias para se obter resultado quando executadas como rotina diagnóstica. Obviamente esse prazo de entrega é dependente da demanda do laboratório. Para análise isolada, o custo e o tempo de análise são superiores, devido ao preparo e consumo de materiais e reagentes, sugerindo que tal metodologia deva ser restrita a centros de referência para o estudo do LMG, como é o propósito do IAG-HC-UFMG.

QUADRO 8 - Perfil clínico dos pacientes portadores de LMG do grupo 2B

Código	Sexo Idade*	Diagnóstico Inicial	Apresentação Clínica Predominante	Alteração Endoscópica	Histologia	Controle de Erradicação**	Evolução Clínica
F001	F/73	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Úlcera gástrica acometendo mucosa e submucosa sugestiva de linfoma MALT.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Após dois tratamentos para <i>H. pylori</i> e erradicação do microrganismo, houve regressão histológica do tumor.
F002	M/40	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Processo inflamatório agudo, com erosões e ulcerações, acometendo pequena curvatura e parede anterior do corpo e antro. Alterações da mucosa sugestiva de linfoma MALT.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Após tratamento para <i>H. pylori</i> e erradicação do microrganismo, houve regressão histológica do tumor.
F003	M/73	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Áreas de infiltrado linfoide denso compatível com linfoma MALT de baixo grau residual.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Após tratamento para <i>H. pylori</i> e erradicação do microrganismo, houve regressão histológica do tumor.
F004	F/41	Linfoma (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Linfoma não Hodgkin de grandes células B.	Alto Grau	Linfoma (+) <i>H. pylori</i> (-)	Paciente diagnosticado com linfoma não Hodgkin de grandes células B e tratado com sucesso para <i>H. pylori</i> . Foi encaminhado para QT.
F005	F/66	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Sem informações.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Após dois tratamentos para <i>H. pylori</i> e erradicação do microrganismo, houve regressão histológica do tumor.
F006	F/38	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Gastrite leve e lesão elevada no corpo gástrico e infiltrado linfoide atípico de significado indeterminado sugestivo de linfoma MALT.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Realizado tratamento para <i>H. pylori</i> com erradicação do microrganismo. Não houve regressão tumoral e o paciente foi encaminhado para QT.
F007	F/51	LMG (+) <i>H. pylori</i> (+)	Dispepsia	Infiltrado linfoide atípico em mucosa antral sugestivo de linfoma MALT.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Após tratamento para <i>H. pylori</i> e erradicação do microrganismo, houve regressão histológica do tumor.
F008	F/73	LMG (+) <i>H. pylori</i> (?)	Dispepsia	Lesão infiltrativa no corpo gástrico. Infiltrado linfoide sugestivo de linfoma MALT.	Baixo Grau	LMG (+) <i>H. pylori</i> (-)	Paciente foi tratada apesar de não ter sido confirmada a presença do microrganismo. Evoluiu para estágio IV e foi encaminhado para QT e radioterapia.

\* Idade correspondente à data de realização da EDA/Biópsia, efetuada entre o período de 2009 e 2010.

\*\* O controle do tratamento de erradicação do *H. pylori* foi realizado por meio de histologia, teste da urease e/ou teste respiratório com 13C-ureia.

## 4.2 FISH – Avaliação do tecido parafinado

Foram utilizadas as amostras de tecido gástrico incluídas em blocos de parafina pertencentes ao grupo 1 (não portadores de LMG) e grupo 2A (portadores de LMG). O grupo 1 foi utilizado com o objetivo de determinação diagnóstica na contagem de translocações presentes na população sadia. E o grupo 2A para estudo da translocação  $t(11;18)(q21;q21)$  e correlação com os dados presentes em seus prontuários, visando à terapêutica utilizada e à evolução da doença. Entretanto, não foi possível obter nenhum resultado ou correlação para estas amostras devido a incompleta padronização da técnica de hibridização *in situ*.

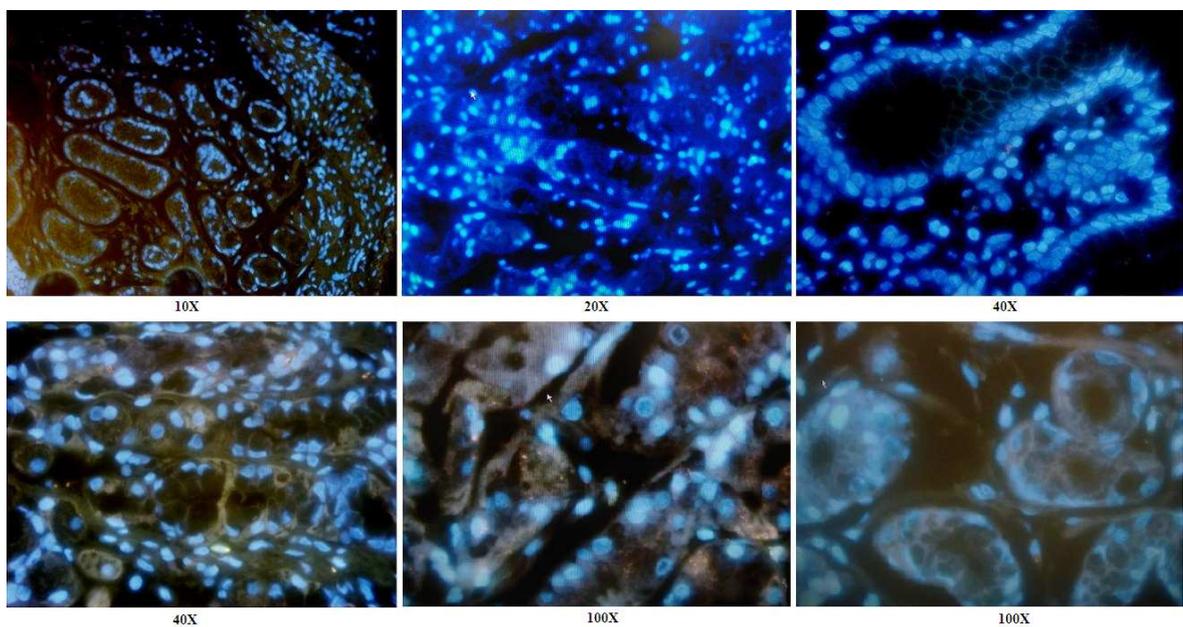
Durante a padronização desta metodologia, houveram algumas dificuldades para atingir a temperatura ideal de trabalho da solução de pré-tratamento dentro da jarra de Coplin em banho-maria para recuperação dos epítomos (determinante antigênico), devido aos equipamentos e materiais disponíveis no momento do estudo. Foi utilizado banho-maria com aquecimento até 100°C, que teoricamente atingiria a temperatura necessária, mas que, na prática, não conseguiu manter a temperatura dentro da jarra de Coplin acima de 90°C, ou seja, trabalhamos com a temperatura abaixo da ideal. É importante que a solução de pré-tratamento esteja aquecida entre 95°C e 99°C, sendo que após a imersão das lâminas na jarra de Coplin essa temperatura decai e somente após atingir novamente os 95°C mínimos deve ser cronometrado o tempo.

Tempo e temperatura de recuperação antigênica na técnica de FISH são pontos críticos considerados decisivos no resultado da metodologia. Novos ensaios devem ser realizados buscando-se inicialmente atingir a temperatura ideal de trabalho durante o pré-tratamento das amostras, empregando outros tipos de banhos como, por exemplo, banhos de óleo, que permitem uma temperatura de trabalho superior e, posteriormente, avaliar tempos de imersão variáveis entre 10 e 20 minutos.

Na digestão enzimática das amostras com pepsina, a fim de padronizar o melhor tempo, realizou-se a metodologia com 3', 4', 6', 8' e 10' a 37°C. Como opção, pode-se também digerir as amostras com pepsina à temperatura ambiente. Assim, estudos adicionais devem avaliar a digestão enzimática também à temperatura ambiente e talvez em novos tempos.

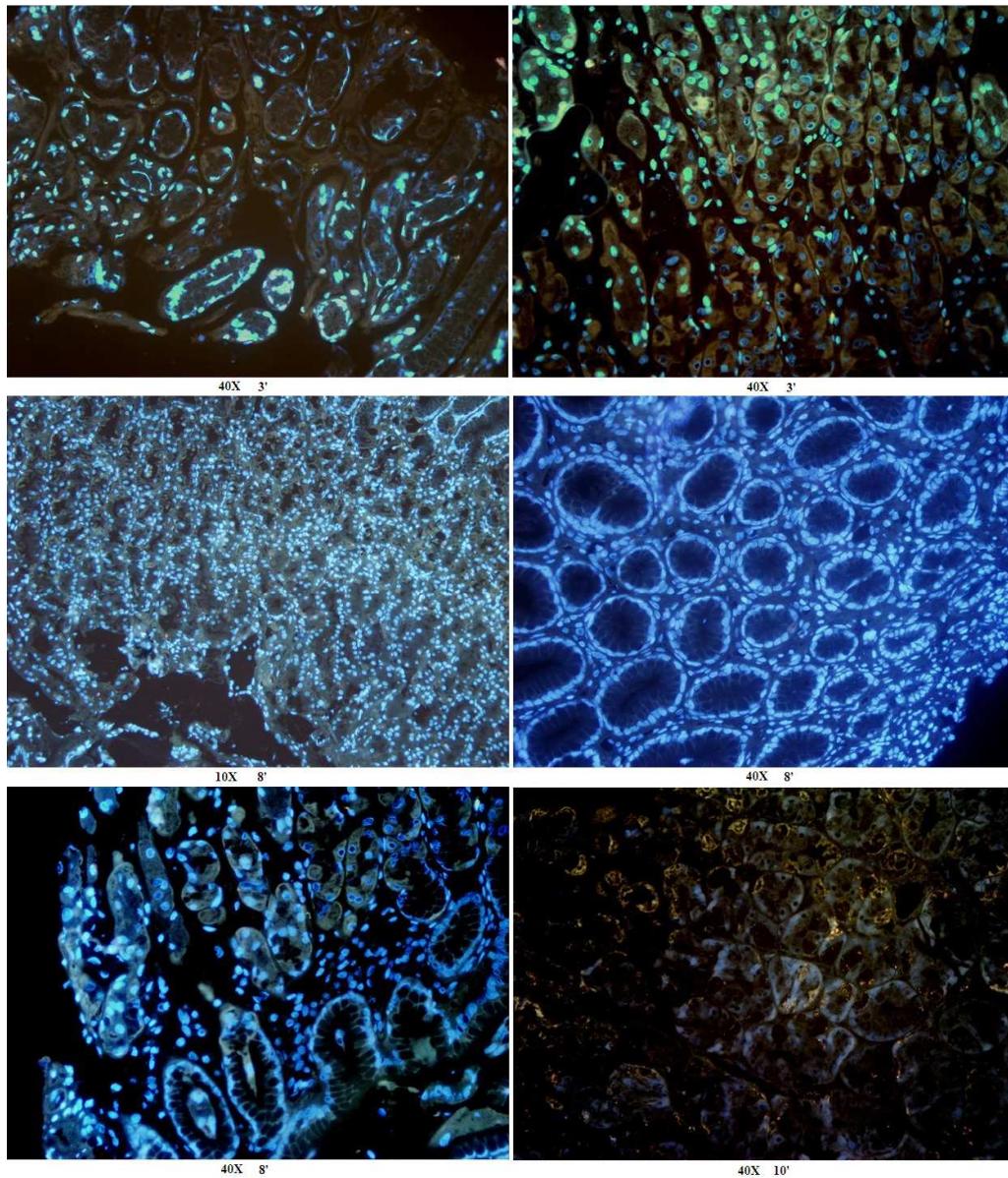
Cada técnica de FISH tem suas vantagens e limitações para a detecção de alterações genéticas. Para esse tecido, especificamente, a padronização demonstrou ser complexa, pois foram avaliados diferentes tempos de recuperação antigênica e digestão enzimática com variação de temperatura, em cada etapa da metodologia, porém sem atingir o resultado esperado. Os resultados obtidos até o momento indicam a hibridização da sonda fluorescente à outras estruturas celulares que não a área de interesse, que são os linfócitos e a área cromossômica em estudo (FIG. 25, 26 e 27).

FIGURA 25 - FISH com digestão enzimática a 37°C por 4' em diferentes amostras



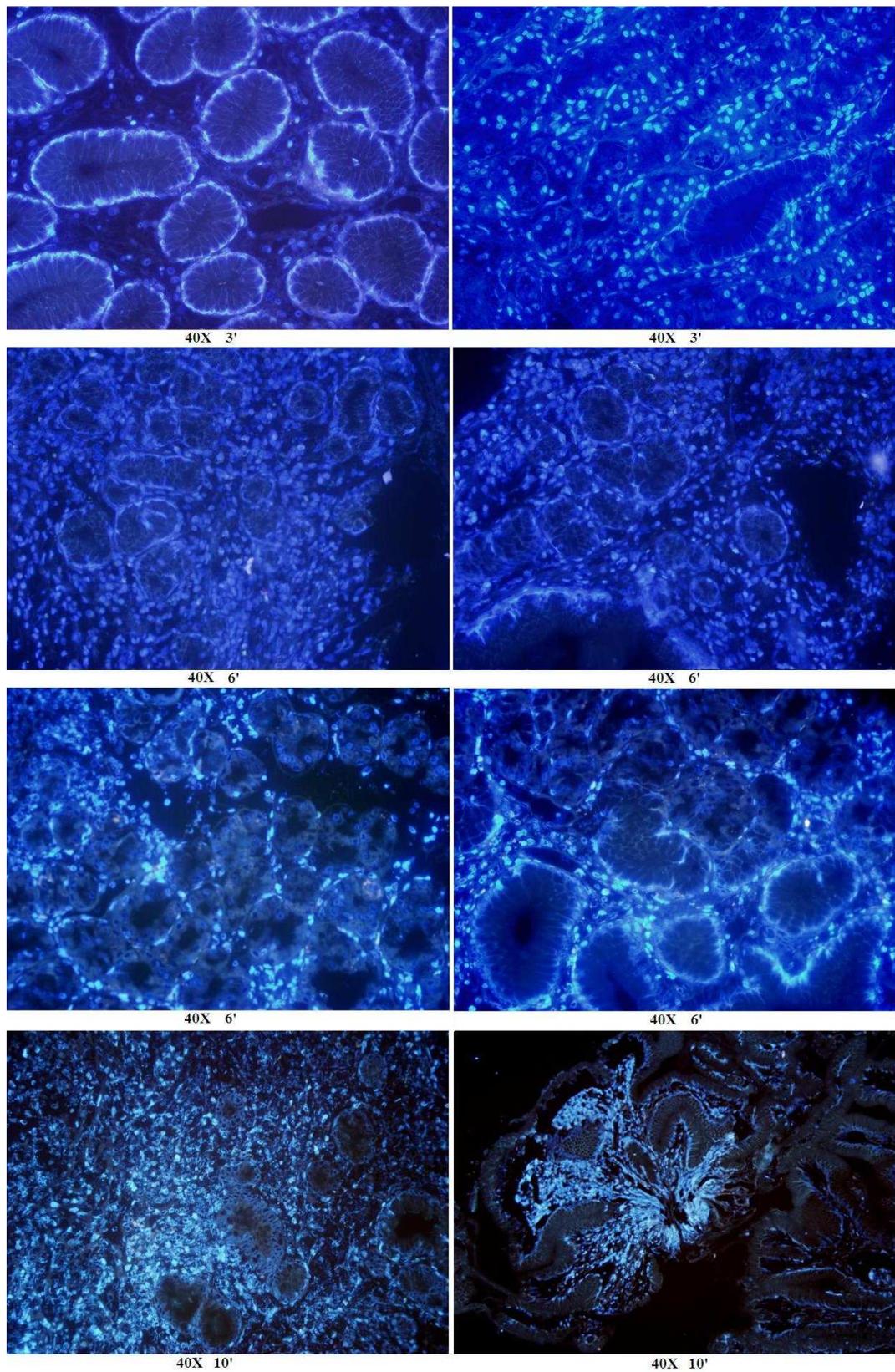
Hibridização da sonda fluorescente em estruturas celulares que não a área de interesse, que são os linfócitos e a área cromossômica em estudo.

FIGURA 26 - FISH com digestão enzimática a 37°C, respectivamente, por 3' 8' e 10' em diferentes amostras



Hibridização da sonda fluorescente em estruturas celulares que não a área de interesse que são os linfócitos e a área cromossômica em estudo.

FIGURA 27 - FISH com digestão enzimática a 37°C, respectivamente, por 3' 6' e 10' em diferentes amostras



Hibridização da sonda fluorescente em estruturas celulares que não a área de interesse, que são os linfócitos, e a área cromossômica em estudo.

## 5 CONCLUSÕES

Embora o número de sujeitos neste estudo tenha sido limitado, foi possível a implementação de uma metodologia rotineira (RT-PCR) para identificação da  $t(11;18)(q21;q21)$  a partir de tecido fresco em pacientes com LMG. Conforme descrito nos resultados, a metodologia de RT-PCR para tecido em parafina não pôde ser aplicada em decorrência da insuficiência do material arquivado de pacientes positivos para LMG.

A análise por FISH, como descrito, não foi concluída para o estudo das amostras de tecido em parafina, tendo em vista as dificuldades técnicas. A metodologia para tecido fresco, bem como a realização de estudos adicionais, não puderam ser realizadas devido à escassez de sujeitos de pesquisa doadores de tecido tumoral fresco durante o decorrer do estudo.

A análise por RT-PCR identificou a translocação cromossômica  $t(11;18)(q21;q21)$  em quatro pacientes portadores de LMG de baixo grau e ausência da mutação em três pacientes. Um paciente com LMG de alto grau também não apresentou a translocação.

Entre os pacientes com a translocação, 50% não apresentaram regressão do LMG apenas com a erradicação da bactéria. Todos os pacientes sem translocação obtiveram regressão do tumor com o tratamento anti-*H. pylori*.

A técnica de RT-PCR mostrou-se método viável e adequado para a detecção desse rearranjo genético. Devido às dificuldades técnicas de FISH para esse tipo de tecido, não foi possível estabelecer a padronização completa da técnica.

Ambas as metodologias possuem custo moderado-alto e obtém-se resultado em poucos dias na rotina diagnóstica, dependendo da demanda.

Este estudo foi mais um grande passo para o desenvolvimento e progresso do IAG como centro de referência em gastroenterologia e para o diagnóstico molecular do LMG.

## REFERÊNCIAS

- ALPEN, B. *et al.* Translocation t(11;18) absent in early gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type responding to eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Blood**, v. 95, p. 4014-15, 2000.
- ANDRADE, C.R.M. *et al.* Perfil dos portadores de linfoma MALT gástrico do setor de endoscopia do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte (IAG-UFMG), no período de 2006-2009. **Anais da IX Semana Brasileira do Aparelho Digestivo**. Florianópolis, Santa Catarina. 21-25 de novembro, 2010.
- AUER, I.A. *et al.* t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. **Ann Oncol**, v. 8, p. 979-85, 1997.
- BISHOP, R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. **Bioscience Horizons**, v. 3, n. 1, p. 85-95, 2010.
- CARTER J.B.; SAUNDERS, V.A. Virology: principles and application. Chichester, England; Hoboken, NJ : **John Wiley & Sons**, 2007. 382 p. ISBN 978-0-470-02386-0.
- CAVALLI, F. *et al.* Lymphomas. **Hematology**, Am Soc Hematol Educ Program, p. 241-58, 2001.
- COELHO, L.G. *et al.* II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro para o Estudo do *Helicobacter*. **Arq Gastroenterol**, v. 42, n. 2, pp. 128-132, 2005. ISSN 0004-2803.
- CORREA, P. *Helicobacter Pylori* infection and gastric cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 12, p. 238s-241s, 2003.
- COSTA, R.O. *et al.* Linfoma não Hodgkin gástrico. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.3 2, n. 1, pp. 63-69, Feb. 2010. ISSN 1516-8484.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.
- FISCHBACH, W. *et al.* Minimal residual lowgrade gastric MALT-type lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 360, p. 547-8, 2002.
- FOON, K.A.; FISHER, R.I. Lymphomas. *In*: BEUTLER, E. *et al.* **Williams hematology**. 5 ed. New York, McGraw-Hill, 1995.
- GEHONG, D. *et al.* BCL10 nuclear expression and t(11;18)(q21;q21) indicate nonresponsiveness to *Helicobacter pylori* eradication of Chinese primary gastric MALT lymphoma. **Int J Hematol**, v. 88, p. 516-523, 2008.
- GENTA, R.M.; HAMNER, H.W.; GRAHAM, D.Y. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. **Hum Pathol**, v. 24, p. 577-83, 1993.

GUANGHUA, W. *et al.* t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in stomach: a study of 48 cases. **Modern Pathology**, v. 22, p. 79-86. 2009.

GUERMAZI, A. *et al.* Extranodal Hodgkin disease: spectrum of disease. **Radiographics**, v. 21, p. 161-179, Já. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, RJ. Estimativa 2012. 2012; 25.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA. **Linfoma não Hodgkin**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma\\_ao\\_hodgkin](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_ao_hodgkin)>. Acesso em: 26 jun. 2012.

ISAACSON, P.G. Gastric MALT lymphoma: from concept to cure. **Ann Oncol**, v. 10, p. 637-45, 1999.

ISAACSON, P.G.; WRIGHT, D.H. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. **Cancer**, v. 52, p. 1410-1416, 1983.

KALIL, E.M.; COSTA, A.J.F. Desinfecção e esterilização. **Acta Ortop Brás**, v. 2, n. 4, out/dez, 1994.

LAGE P. *et al.* Detecção e caracterização da t(11;18)(q21;q21) no linfoma gástrico MALT: Resposta completa após erradicação do *H. Pylori* em doentes com a translocação. **GE - J Port Gastreterol**, v. 12, p. 68-77, mar/abr. 2005.

LEVSKY, J.M.; SINGER, R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 14, p. 2833-2838. 2003.

LIU, H. *et al.* T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, May. 2002.

LIU, H. *et al.* Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Lancet**, v. 357, n. 9249, p. 39-40, Jan. 2001a.

LIU, H. *et al.* T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. **Blood**, v. 98, n. 4, Aug. 2001b.

LODISH, H. *et al.* Biologia celular e molecular. 4. edição. **Revinter**, 2002. ISBN 85-7309-638-1.

MATHIJS, B.; MARYNEN, P. BIRC3 (baculoviral IAP repeat-containing 3). **Atlas Gen Cytogen Oncol Haematol**, v. 6, n. 1, p. 3-4, 2002a.

MATHIJS, B.; MARYNEN, P. *MALT1* mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1. **Atlas Gen Cytogen Oncol Haematol**, v. 6, n. 1, p. 13-14, 2002b.

MATHIJS, B.; MARYNEN, P. t(11;18)(q21;q21). **Atlas Gen Cytogen Oncol Haematol**, v. 6, n. 1, p. 32-33, 2002c.

MATHIJS, B. *et al.* The product of the t(11 ;18), an *API2-MLT* Fusion, Marks Nearly Half of Gastric MALT Type Lymphomas without Large Cell Proliferation. **Am J Pathol**, v. 156, n. 4, 2000.

MING-QING, D.U. MALT Lymphoma: many roads lead to nuclear factor-[kappa]b activation. **Histopathology**, v. 58, n. 1, p. 26-38, Jan. 2011.

MING-QING, D.U. MALT Lymphoma: recent advances in aetiology and molecular genetics. **J Clin Exp Hematopathol**, v. 47, n. 2, nov 2007.

MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. Assepsia e antissepsia, técnicas de esterilização. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 265-73, 2008.

OKEN, M.M. *et al.* Toxicity and response criteria of the eastern cooperative oncology group. EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP (ECOG), Robert COMIS M.D., Group Chair. ECOG Performance Status. **Am J Clin Oncol**, v. 5, p. 649-655, 1982. Disponível em: < <http://ecog.dfci.harvard.edu/>>. Acesso em: setembro de 2011.

OLIVEIRA, R.P.S. **Biologia molecular**: expressão gênica (RT-PCR). Protocolo das sessões práticas. Mestrado em Genética Molecular. Braga, 2000.

OPPERMANN, C.M. **Manual de biossegurança para serviços de saúde**. Porto Alegre, p. 34-41, 2003.

PARSONNET, J. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1267-71, 1994.

RADASZKIEWICZ, T. *et al.* Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa associated lymphoid tissue. Factors relevant to prognosis. **Gastroenterology**, v. 102, n. 5, p. 1628-38, 1992.

RUSKONE-FOURMESTRAUX, A. *et al.* EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 747-58, Feb 11, 2011.

SAGAERT, X. *et al.* Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 336-346, 2010. doi:10.1038/nrgastro.2010.58. Jun, 2010.

SCAPIN, F. **Técnicas citogenéticas**. UFCSPA. 14 Dec. 2009. Disponível em: <<http://genetica.ufcspa.edu.br>>. Acesso em: junho/2011.

SHAUN, R. *et al.* Cleavage of NIK by the *API2-MALT1* fusion oncoprotein leads to noncanonical NF- $\kappa$ B Activation. **Science**, v. 331, p. 6016, p. 468-472. 2011.

SPEICHER, M.R.; CARTER, N.P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Rev Gen**, v. 6, p. 782-792, Oct. 2005.

STOFFEL, A.; BEAU, M. The *API2/MALT1* fusion product may lead to germinal center B cell lymphomas by suppression of apoptosis. **Hum Hered**, v. 51, p. 1-7, 2001.

TSAI, A.G.; LU, Z.; LIEBER, M.R. The t(14;18)(q32;q21)/*IGH-MALT1* translocation in MALT lymphomas is a CpG-type translocation, but the t(11;18)(q21;q21)/*API2-MALT1* translocation in MALT lymphomas is not. **Blood**, v. 115, Issue: 17, p. 3640-3641, 2010.

VENTURA, R.A. *et al.* FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 2, May 2006.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. Aula 1 - PCR: princípios e tipos de reação. **Laboratório de Biologia Molecular-IPEN**, s.d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Official WHO** updates combined 1996-2009. CUMULATIVE OFFICIAL UPDATES TO ICD-10. Update and Revision Committee. v. 1, pp 26, Feb. 2010.

WOTHERSPOON, A.C. *et al.* *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet**, v. 338, n. 8776, p. 1175-6, Nov. 1991.

WOTHERSPOON, A.C. *et al.* Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 342, p. 575-7, 1993.

WRIGHTSON, W. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis of Nonsentinel Nodes Following Completion Lymphadenectomy for Melanoma. **J Surg Res**, v. 98, n. 1, Jun. 2001.

WYATT, J.I.; RATHBONE, B.J. Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. **Scand J Gastroenterology**, v. 142, p. 44-9, 1988.

YE, H. *et al.* Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. **Blood**, v. 102, n. 3, Aug. 2003.

ZULLO, A. **Primary low-grade and high-grade gastric MALT-lymphoma presentation: A systematic review.** J Clin Gastroenterol; Lipp Williams & Wilkins, Inc. Publish Ahead of Print, February 15, 2011.

## ANEXOS E APÊNDICES

### Anexo A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 216/09

Interessado(a): Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de junho de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação e padronização das técnicas FISH e RT-PCR para pesquisa de translocação cormossômicas t(11;18) (q21;q21) em portadores de Linfoma MLT Gástrico, em material parafinado e fresco**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral", is written over a light-colored horizontal line.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## Anexo B – Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado



### FACULDADE DE MEDICINA CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **KARINE SAMPAIO LIMA**, nº de registro 2009658986. Às quatorze horas do dia **treze de dezembro de 2011**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"AVALIAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA t(11;18)(q21;q21) EM PORTADORES DE LINFOMA MALT GÁSTRICO"**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho/ orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Ana Paula Lage Drummond Wainstein/ coordenadora	Instituição: FCMMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Maria do Carmo Friche Passos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Cláudio Gustavo Stefanoff	Instituição: INCA	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2011.

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho/ orientador [Assinatura]

Profa. Ana Paula Lage Drummond Wainstein/ coordenadora [Assinatura]

Profa. Maria do Carmo Friche Passos [Assinatura]

Prof. Cláudio Gustavo Stefanoff [Assinatura]

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari  
Coord. PG. em Ciências Aplicadas  
à Saúde do Adulto  
Faculdade de Medicina / UFMG

[Assinatura]  
CONFERE COM O ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação

## Anexo C – Declaração de Aprovação



### FACULDADE DE MEDICINA CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Luiz Gonzaga Vaz Coelho, Ana Paula Lage Drummond Wainstein, Maria do Carmo Friche Passos e Cláudio Gustavo Stefanoff, aprovou a defesa da dissertação intitulada: “**AVALIAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA t(11;18)(q21;q21) EM PORTADORES DE LINFOMA MALT GÁSTRICO**”, apresentada pela mestrand **KARINE SAMPAIO LIMA**, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 13 de dezembro de 2011.

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho  
Orientador

Profa. Ana Paula Lage Drummond Wainstein  
Coorientadora

Profa. Maria do Carmo Friche Passos

Prof. Cláudio Gustavo Stefanoff

## Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas

UFMG

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo: Avaliação e padronização das técnicas FISH e RT-PCR para pesquisa da translocação cromossômica t(11;18)(q21;q21) em portadores de Linfoma MALT Gástrico, em material parafinado e fresco.

Como você já foi informado pelo seu médico, você é portador de um tumor no estômago chamado Linfoma MALT Gástrico (LMG). Este tumor é, com frequência, associado a uma infecção por uma bactéria chamada *Helicobacter pylori*. Em determinados casos, o tratamento do tumor é realizado apenas através da erradicação desta bactéria. Entretanto, muitas vezes, a confirmação da regressão do tumor, depois da eliminação da bactéria, pode levar meses. Nosso estudo pretende investigar a existência de alterações genéticas nas células do seu tumor, que poderiam prever, de imediato, se o seu tumor irá ou não regredir apenas com a erradicação da bactéria, ou se você necessita ser encaminhado para outro tipo de tratamento. O grande benefício desta pesquisa é propiciar uma melhor compreensão sobre o comportamento e tratamento do LMG.

Estamos solicitando sua permissão para coletar, armazenar e realizar pesquisas com fragmentos de tecido tumoral, retirados do seu estômago durante a realização da ecoendoscopia de rotina solicitada pelo seu médico assistente no Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) da UFMG. A obtenção destes fragmentos não implicará em desconfortos adicionais ao procedimento padrão do exame e não implicam em nenhum custo adicional ao seu tratamento. Sua participação deverá ser mediante assinatura deste Termo de Consentimento. Caso as informações geradas possam causar algum benefício na condução do seu caso, você e seu médico serão informados.

Os Laboratórios de Pesquisa e de Anatomia Patológica do IAG serão encarregados do manuseio dos seus dados e materiais para pesquisa. O fragmento de tumor será identificado no laboratório por um código, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. Apenas os pesquisadores responsáveis pela pesquisa poderão associar você a seu material. Seus dados clínicos poderão ser acessados, mas não divulgados. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita sempre de modo a manter o seu anonimato. É importante ressaltar que sua participação é voluntária e não tem tempo de expiração, porém, você pode cancelar a mesma a qualquer momento entrando em contato com o responsável pela pesquisa. Qualquer que seja a sua decisão, isso não afetará positivamente ou negativamente a maneira como você é atendido ou tratado neste hospital.

Caso tenha alguma dúvida sobre este Termo de Consentimento ou sobre o estudo, por gentileza entre em contato conosco ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. No verso deste documento encontram-se listados os endereços e telefones de todos os pesquisadores envolvidos no estudo bem como do COEP-UFMG. Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste.

1-Tendo lido atentamente todo o texto do presente termo, concordo que fragmentos de tumor possam ser coletados, guardados e usados pelos Laboratórios de Pesquisa e Anatomia Patológica do IAG do Hospital das Clínicas da UFMG, para o presente estudo.

2-Concordo que todos os meus dados, como: idade, sexo, fatores relacionados, diagnóstico, tratamento e história familiar possam ser retirados do meu prontuário médico.

3-Minhas informações, mantendo o anonimato, poderão ser usadas para publicação de resultados.

Belo Horizonte,..... de ..... de .....

Nome do(a) Paciente ou Responsável Legal/Documento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_  
Paciente ou Responsável Legal

Investigador Principal: \_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

**Investigador Principal:** Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho  
Instituto Alfa de Gastroenterologia - HC/UFMG  
Av. Alfredo Balena, 110 - 2º andar -Sta. Efigênia - Belo Horizonte, MG. Telefone: (31) 3409-9403

**COEP - Comitê de Ética em Pesquisa**  
Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha - Belo Horizonte, MG - Cep: 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592  
coep@prpq.ufmg.br

## Apêndice B - Formulário do Paciente – Grupo 1

FORMULÁRIO PARA PACIENTE GRUPO CONTROLE (GRUPO 1)				
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE				
Data de inclusão:	Codigo no estudo:		Prontuário:	
Nome completo:				
Identidade:	CPF:		Data de nascimento:	
Idade:	Sexo:	Cor de pele:	Estado Civil:	
Profissão:			Naturalidade:	
Endereço completo:				
CEP:	Cidade/Estado:		Contato(s):	
Situação atual:	<input type="checkbox"/> Vivo	<input type="checkbox"/> Óbito		
HISTÓRIA PATOLÓGICA PROGRESSA				
Câncer:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tipo(s):	
Hipertensão:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo:	
Diabetes:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tipo/Tempo:	
HIV/AIDS:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo:	
Gastrite:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo:	
úlceras gástricas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo:	
Outras doenças:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual:	
Outras infecções:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual:	
HISTÓRIA FAMILIAR				
Câncer na Família:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
Tipo(s)/Diagnóstico/Parentesco/Idade:				
Outras doenças familiares:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
Tipo(s)/Diagnóstico/Parentesco/Idade:				
HISTÓRIA PESSOAL/SOCIAL				
Atividade física:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo por semana:	
Obesidade:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Tempo:	
Tabagismo:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Cigarros/dia:	Tempo:
Alcoolismo:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Frequência:	Tempo:
Outras drogas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual:	Tempo:
Exposição química:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual:	Tempo:
Exposição à radiação	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Local:	Tempo:
CRITÉRIOS DO ESTUDO				
Infecção por Helicobacter pylori:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
Indicação do exame endoscópico:				
Impressão diagnóstica:				
Data do exame EDA/Biópsia:				
Conclusão da EDA:				
Laudo da Biópsia:				

### Apêndice C - Formulário do Paciente – Grupo 2A e 2B

FORMULÁRIO PARA PACIENTE GRUPO 2A E 2B				
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE				
Data de inclusão:		Codigo no estudo:		Prontuário:
Nome completo:				
Identidade:		CPF:		Data de nascimento:
Idade:	Sexo:	Cor de pele:	Estado Civil:	
Profissão:			Naturalidade:	
Endereço completo:				
CEP:	Cidade/Estado:		Contato(s):	
Situação atual:	Vivo	Óbito		
HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA				
Câncer:	Sim	Não	Tipo(s):	
Hipertensão:	Sim	Não	Tempo:	
Diabetes:	Sim	Não	Tipo/Tempo:	
HIV/AIDS:	Sim	Não	Tempo:	
Gastrite:	Sim	Não	Tempo:	
úlcera gástrica:	Sim	Não	Tempo:	
Outras doenças:	Sim	Não	Qual:	
Outras infecções:	Sim	Não	Qual:	
HISTÓRIA FAMILIAR				
Câncer na Família:	Sim	Não		
Tipo(s)/Diagnóstico/Parentesco/Idade:				
Outras doenças familiares:	Sim	Não		
Tipo(s)/Diagnóstico/Parentesco/Idade:				
HISTÓRIA PESSOAL/SOCIAL				
Atividade física:	Sim	Não	Tempo por semana:	
Obesidade:	Sim	Não	Tempo:	
Tabagismo:	Sim	Não	Cigarros/dia:	Tempo:
Alcoolismo:	Sim	Não	Frequência:	Tempo:
Outras drogas:	Sim	Não	Qual:	Tempo:
Exposição química:	Sim	Não	Qual:	Tempo:
Exposição à radiação	Sim	Não	Local:	Tempo:
INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI				
Data do diagnóstico clínico inicial:				
Método diagnóstico inicial (Histologia/Teste da urease/Teste respiratório com 13C-uréia):				
Descrição do Laudo inicial:				
Tratamento de Erradicação				
Erradicação do H. pylori:	Sim	Não	Tratamento:	
Caso não tenha ocorrido erradicação na primeira tentativa detalhe a continuidade do tratamento:				
HISTÓRIA CLÍNICA DO LMG				
Sinais/Sintomas apresentados:				
Data do exame diagnóstico EDA/Biópsia:				
Conclusão da Endoscopia:				

Laudo da Biópsia:							
Controle de 2 meses após erradicação do Hp (Tu regrediu ou não):							
Exames e laudos subsequentes/Data:							
Situação atual:							
Outros:							
<b>TRATAMENTOS</b>							
Radioterapia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Forma de tratamento:							
Quimioterapia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Forma de tratamento:							
Outros medicamentos utilizados:							
<b>EVOLUÇÃO</b>							
Resumo da evolução clínica de acordo com o quadro de tratamento para LMG:							
<b>DEMAIS EXAMES</b>							
Marcadores tumorais:	2. CEA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Resultado	1.	2.	3.
	3. Alfa-fetoproteína	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Resultado	1.	2.	3.
	6. CA 72-4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Resultado	1.	2.	3.
	7. CA 125	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Resultado	1.	2.	3.
	8. CA 19.9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Resultado	1.	2.	3.
Endoscopia	Data/Laudos:						
Ecoendoscopia:	Data/Laudos:						
Ultrassonografia:	Data/Laudos:						
Outros exames:							
Status de desempenho do ECOG (0-5):							
Grau	Escala Status de Desempenho ECOG:						
0	Paciente ativo, sadio, capaz de desenvolver todas as atividades que desempenhava antes da doença.						
1	Capaz de realizar tarefas leves ou sedentárias. Restrição em atividades físicas extremas.						
2	Capaz de se cuidar sozinho mas incapaz de realizar qualquer atividade ocupacional						
3	Se cuida sozinho de modo limitado, confinado a uma cama ou cadeira + de 50% do tempo que fica						
4	Incapaz. Não consegue cuidar-se sozinho. Confinado a uma cama ou cadeira.						
5	Morto						