

Universidade Federal De Minas Gerais  
Instituto De Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Projeto de Biologia Molecular

**Aspectos peculiares da leucemia em crianças com Síndrome de Down**

**Alunas:** Bárbara Cristina  
Carina Dumont  
Flávia Lage  
Luiza Dias

**Professores:** Miguel Ortega e Santuza Teixeira

Dezembro de 2007

## 1. INTRODUÇÃO:

A Síndrome de Down é uma síndrome genética causada pelo excesso de material genético proveniente do cromossomo 21. Seus portadores apresentam três cromossomos 21, ao invés de dois, e por isto a síndrome é também denominada Trissomia do 21. As características clínicas da Síndrome de Down são congênitas e incluem, principalmente: atraso mental, fraqueza muscular, baixa estatura, anomalia cardíaca, perfil achatado, orelhas pequenas com implantação baixa, olhos com fendas palpebrais oblíquas, língua grande, protrusa e sulcada e prega única nas palmas. Estes pacientes também apresentam imunodeficiência, o que leva a maior suscetibilidade a infecções, além de risco aumentado de desenvolver neoplasias (câncer), particularmente, a leucemia.

Estudos realizados com crianças portadores de síndrome de Down demonstram que as mesmas apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de certas doenças hematológicas, tais como a leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda, síndromes mielodisplásicas e síndrome mieloproliferativa transitória neonatal do que crianças normais. Por outro lado, no entanto, as crianças portadoras da síndrome apresentam um menor risco para os tumores sólidos e carcinomas na fase adulta.

A condição de portador de Síndrome de Down desperta, então, especial interesse nos estudos sobre leucemogênese, pois, experimentos realizados sugerem que crianças portadoras da síndrome de Down apresentam uma chance vinte vezes maior de desenvolverem leucemia quando comparadas à crianças normais. O tipo de leucemia geralmente desenvolvido por estas crianças portadoras é a do tipo megacarioblástica aguda, também conhecida como leucemia mielóide aguda, que é extremamente rara em crianças sem síndrome de Down.

A leucemia mielóide aguda caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e exagerado das células indiferenciadas chamadas "blastos". Estas células não apresentam as funções normais dos glóbulos brancos. Além disso, existe um bloqueio na fabricação das células normais, havendo

uma deficiência de glóbulos vermelhos (anemia), plaquetas (plaquetopenia) e glóbulos brancos (neutropenia).

Pesquisas recentes demonstram também que pacientes leucêmicos portadores da Síndrome de Down e pacientes normais leucêmicos respondem de maneira diferenciada a tratamentos quimioterápicos, sendo que os primeiros grupos reagem melhor ao tratamento. Isto se deve principalmente a boa resposta ao uso do quimioterápico Aracatin. A sensibilidade aumentada ao Aracatin é explicada pela codificação de sua enzima de metabolização no cromossoma 21. E como os pacientes com Síndrome de Down apresentam três cromossomos 21, conseqüentemente, codificam em maior quantidade esta enzima, o que justifica sua melhor resposta ao tratamento quimioterápico.

## 2. JUSTIFICATIVA:

Sabendo-se que crianças portadoras da Síndrome de Down apresentam maior probabilidade de desenvolverem quadros leucêmicos megacarioblásticos do que crianças normais, surge, inicialmente, a idéia de se investigar se ocorrem diferenças na expressão gênica nestes dois grupos. Também instiga nosso interesse a análise do proteoma de crianças normais leucêmicas e de crianças leucêmicas portadoras desta síndrome, antes e após o tratamento com quimioterápicos.

## 3. OBJETIVO GERAL:

Comparar o proteoma de pacientes normais leucêmicos com o proteoma de pacientes com síndrome de Down leucêmicos, antes e depois de submetidos aos tratamentos quimioterápicos.

## 4. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Comprovar que nosso trabalho trará contribuições significativas à pesquisas direcionadas à busca de tratamentos mais eficazes para a leucemia e através disso conseguir autorização do comitê de ética para a realização do projeto
- Selecionar células de medula óssea de pacientes dos seguintes grupos:
  - GRUPO I: Pacientes sem leucemia e sem síndrome de down.
  - GRUPO II: Pacientes leucêmicos sem síndrome de down.
  - GRUPO III: Pacientes com síndrome de down.
  - GRUPO IV: Pacientes com síndrome de down, leucêmicos sem tratamento quimioterápico;
  - GRUPO V: Pacientes com síndrome de down, leucêmicos, em tratamento quimioterápico;
- Extrair a porção citoplasmática de células dos grupos acima.
- Purificar as proteínas citoplasmáticas
- Comparar o perfil dessas amostras anotando as diferenças encontradas
- Identificação das proteínas que obtiveram expressão diferenciada nos grupos IV e V.
- Comparar o proteoma de pacientes normais leucêmicos e de pacientes com Síndrome de Down leucêmicos.

- Comparar o proteoma de pacientes com síndrome de down, leucêmicos, sem tratamento quimioterápico e pacientes com síndrome de down, leucêmicos, em tratamento.

## 5. MATERIAS E MÉTODOS:

Para realizar a comparação do proteoma de indivíduos portadores da síndrome de down leucêmicos com indivíduos leucêmicos sem a síndrome e subsequente comparação do efeito da quimioterapia no proteoma de indivíduos com síndrome de down e leucêmicos antes e em tratamento devemos organizar 5 grupos :

- GRUPO I: Pacientes sem leucemia e sem síndrome de down.
- GRUPO II: Pacientes leucêmicos sem síndrome de down.
- GRUPO III: Pacientes com síndrome de down.
- GRUPO IV: Pacientes com síndrome de down, leucêmico, não submetidos à quimioterapia;
- GRUPO V: Pacientes com síndrome de down, leucêmicos, submetidos à quimioterapia;

Nessa organização teremos o grupo I e o grupo III como controles dos grupos II e IV e o grupo IV sendo controle do grupo IV quando realizarmos a comparação da expressão gênica de pacientes antes e em tratamento.

Coletaremos em seguida células extraídas da medula óssea de pacientes cadastrados no REDOME (Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea) para serem nossas amostras do grupo I e realizaremos campanhas para recrutar voluntários do CEMO (Centro de transplante de medula óssea) para a coleta de células de pacientes pertencentes aos demais grupos. Essas células deverão ser clonadas (Procedimento 5.1) para que não seja preciso recorrer novamente a bancos de medulas e voluntários.

Iremos investigar nesse projeto apenas as proteínas citoplasmáticas, para isso, o primeiro passo é a realização de uma centrifugação diferencial

(Procedimento 5.2) dessas células, em que excluiremos as porções membranosas e nucleares.

Uma vez purificadas essas proteínas, faremos inicialmente uma comparação entre amostras dos quatro primeiros grupos usando géis bidimensionais de poliacrilamida - SDS (Procedimento 5.3). Com isso esperamos encontrar uma expressão protéica característica do grupo IV, investigando tanto as proteínas expressas exclusivamente no grupo IV quanto as que tiveram sua expressão suprimida no mesmo grupo. Seqüenciar por espectrometria (Procedimento 5.4) de massa essas proteínas. Comparar o peso molecular das proteínas seqüenciadas com o peso molecular exato de produtos protéicos do genoma humano a fim de identificá-las. Caso as proteínas obtidas sejam muito grandes as mesmas serão fragmentadas em partes menores permitindo, então, a sua identificação.

Para avaliar se ocorre mudança na expressão protéica de células do grupo IV e V, suas proteínas purificadas irão correr em um gel bidimensional de poliacrilamida, as bandas diferentes originadas dessa eletroforese serão identificadas utilizando o procedimento 5.4..

### Procedimento 5.1 Clonagem

### Procedimento 5.2

#### **Centrifugação diferencial.**

A separação é obtida principalmente com base no tamanho das partículas na centrifugação diferencial. Primeiro, as células são quebradas para liberar o seu conteúdo interno. Esta mistura celular crua e rompida é denominada homogenado.

Quando um homogenado celular é centrifugado a 1000 x g por 10 minutos, as células intactas e os núcleos densos sedimentam para o fundo do tubo. O sobre - nadante pode ser ainda mais centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos para granular as organelas subcelulares de velocidades intermediárias como mitocôndrias, lisossomos e microrganismos. Algumas destas organelas em sedimentação podem ser obtidas em pureza parcial, e em geral elas estão

contaminadas com outras partículas. A lavagem repetida dos grãos pela ressuspensão em solventes isotônicos e re-granulação pode resultar na remoção dos contaminantes de tamanho inferior.

**Figure 1. Differential Centrifugation**

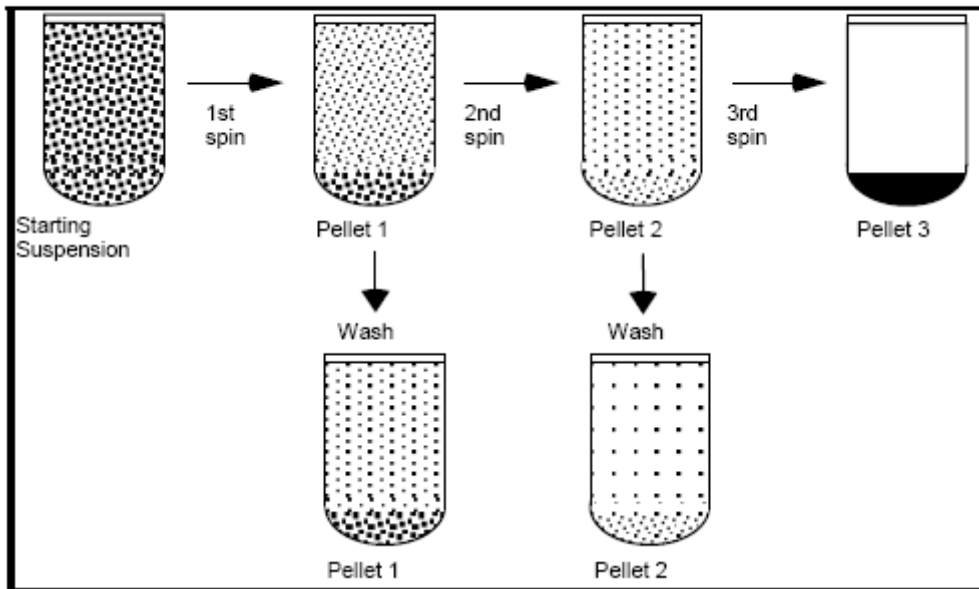


FIGURA 1: Esquema dos passos seqüenciais da centrifugação diferencial

### Procedimento 5.3

- Dissolver a amostra em um pequeno volume de uma solução contendo detergente não-ionico, juntamente com BETA mercapto e uréia.
- Essa amostra é aplicada em um gel com gradiente de pH estável.
- As cadeias polipeptídicas são separadas por focalização isoelétrica.
- Essas proteínas separadas são submetidas à outra eletroforese, mas na direção de um ângulo reto à direção utilizada na primeira etapa.
- O SDS é adicionado e as proteínas agora são separadas de acordo com seu tamanho.

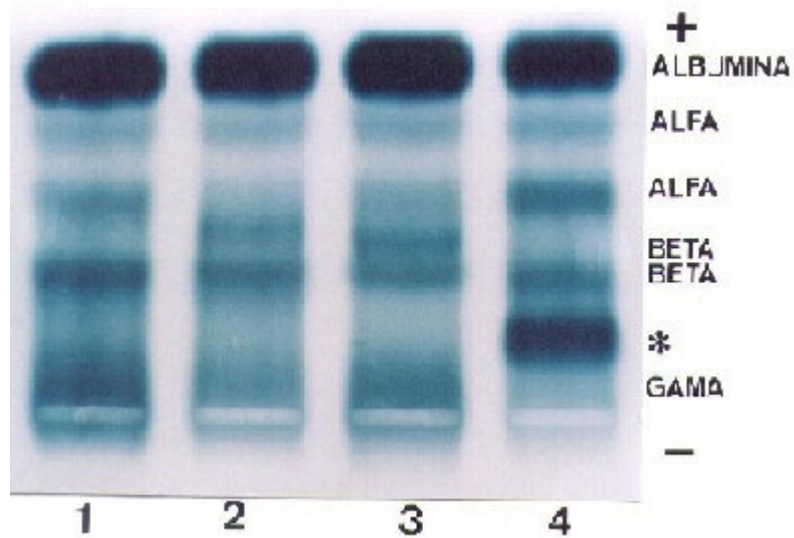


FIGURA 2:  
Purificação

de proteínas, usando géis bidimensionais de poliacrilamida – SDS.

#### Procedimento 5.4

- As proteínas são cortadas pela ação da enzima tripsina;
- Os fragmentos são aplicados no espectrômetro de massa e suas massas são calculadas;

#### 6. ORÇAMENTO

- Ponteiras
- Tubo falcon
- Meio para as células
- Reagente para eletroforese
- Cuba para eletroforese

Nosso projeto, felizmente, não terá o fator financeiro como limitante. Nosso orçamento indica a cuba para eletroforese como o único material necessário de alto valor, custando aproximadamente R\$4.000,00. Os demais materiais necessários, em conjunto, não ultrapassarão R\$2.000,00.



## 7. RESULTADOS ESPERADOS:

Esperamos encontrar e identificar proteínas, semelhantes e exclusivas, expressas em pacientes dos cinco grupos criados, além de uma expressão protéica diferencial entre pacientes normais leucêmicos e pacientes com Síndrome de Down leucêmicos que possa justificar a melhor resposta dos pacientes com síndrome ao tratamento quimioterápico. Espera-se também que haja mudança na expressão protéica em pacientes com síndrome de down, leucêmicos que foram submetidos a tratamentos com quimioterapias induzidos pelas drogas presentes.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

BRUCE A., ALEXANDER J., JULIAN L., MARTIN R., KEITH R. E PETER W.  
**Biologia Molecular da Célula**, Artmed, 2004.

GRIFFITHS, WESSLER, LEWONTIN, GELBART, SUZUKI, MILLER.  
**Introdução á genética**, Guanabara Koogan, 2006.

-Sites:

- [http://www.oncoteste.org/estatico/noticias/20\\_10\\_2005/leucemia.jsp](http://www.oncoteste.org/estatico/noticias/20_10_2005/leucemia.jsp)
- <http://www.cerebromente.org.br/n04/doenca/down/down.htm>
- [http://www.odontodicas.com/artigos/sindrome\\_de\\_down.htm](http://www.odontodicas.com/artigos/sindrome_de_down.htm)
- [http://www.meiregomes.med.br/down.php?cod\\_artigo=110](http://www.meiregomes.med.br/down.php?cod_artigo=110)
- <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2042/pgs/materia%2002-42.html>
- <http://genetica.ffcmpa.tche.br/seminarios%20apresentacoes/SDown.ppt#258,3,Histórico>
- <http://www.emedix.com.br/not/not2002/02ago11ped-ucmc-rfg-leucemia.php>
- <http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualHematologia/pages/LeucemiaMiel%C3%B3ideAguda.aspx>