

LUIZ FERNANDO LOPES



200207079

***INSTABILIDADE GÊNICA MEDIADA PELA
V(D)J-RECOMBINASE E A PRESENÇA DO GENE HÍBRIDO
V γ /J β EM PACIENTES PEDIÁTRICOS ONCOLÓGICOS
EXPOSTOS A QUIMIOTERAPIA***

CAMPINAS

2001

LUIZ FERNANDO LOPES

**INSTABILIDADE GÊNICA MEDIADA PELA
V(D)J-RECOMBINASE E A PRESENÇA DO GENE HÍBRIDO
V γ /J β EM PACIENTES PEDIÁTRICOS ONCOLÓGICOS
EXPOSTOS A QUIMIOTERAPIA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica.*

Orientador: *Profa. Dra. Irene Gyongyvér Heidemarie Lorand Metze*

Co-orientador: *Dr. Andrew John George Simpson*

CAMPINAS

2001

UNIDADE **BC**
 N.º CHAMADA: **1/UNICAMP**
L881i
 V. **47722**
 T. **837/02**
 P. **837/02**
 C. **11,00**
 D. ☒
 PREÇO **R\$ 11,00**
 DATA **08-02-02**
 N.º GPO

CM00163530-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

L881i

Lopes, Luiz Fernando

Instabilidade gênica mediada pela V(D) J-Recombinase e a presença do gene híbrido V γ / J β em pacientes pediátricos oncológicos expostos à quimioterapia / Luiz Fernando Lopes. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Irene Gyongyvér Heidemarie Lorand Metze, Andrew John George Simpson

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer-tratamento. 2. Leucemia-quimioterapia. 3. Genética molecular. I. Irene Gyongyvér Heidemarie Lorand Metze. II. Andrew John George Simpson. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientadora: *Profa. Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze*



Membros:

Professor Doutor Vicente Odone Filho

: *Vicente Odone Jr.*

Professor Doutor Luiz Gonzaga Tone

Luiz Gonzaga Tone

Professor Doutor Fernando Ferreira Costa

Fernando Ferreira Costa

Professor Doutor Cármino Antonio de Souza

Cármino Antonio de Souza

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/05/2001

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

MANOEL LOPES TROYA (in memoriam)

ALZIRA MINA LOPES

Presentes sempre.

Minha eterna gratidão e profundo respeito, pela sua sabedoria, simplicidade e generosidade.

Às crianças portadoras de Ataxia Teleangiectasia Patrícia C.S. e Juliana L.P. e a todos os pacientes e seus pais, que permitiram a coleta de sangue e compreenderam a importância deste estudo.

Quanto e como poderei recompensar tamanha confiança e desprendimento ?

A eles, minha promessa de continuar lutando.

AGRADECIMENTOS

“O homem que aprendeu a caminhar com desenvoltura pelo mundo elogia com honestidade, critica com suavidade, recompensa com generosidade e pune com sabedoria.”

DR EMMANUEL DIAS NETO

Pesquisador do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

*Pela rigorosa metodologia, pelo seu desprendimento ao
transmitir, e sobretudo pela amizade.*

Prof. Dr RICARDO RENZO BRENTANI

*Diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
Presidente da Fundação Antônio Prudente*

*Pela oportunidade que me deu para realizar este trabalho e
mais ainda, pela confiança.*

VALÉRIA APARECIDA PAIXÃO

*Bióloga do Laboratório de Genética do Câncer do Instituto
Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer*

Agradeço a boa vontade e as longas horas de ajuda e apoio.

E a grande amizade ? Essa, nem se fala.

À Profª Dra Irene Gyongyvér Heidemarie Lorand Metze, Profª Titular, pela orientação deste trabalho, por sua experiência e ajuda, com capacidade de trabalho admirável. Meu profundo respeito pela sua sabedoria.

Ao Dr Andrew John George Simpson, Coordenador do laboratório de genética do câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, pelo incentivo, pela disponibilidade na co-orientação, no laboratório e por todos “você consegue”.

À Profª Dra Maria do Rosário D.O.Latorre, estatística da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela orientação, pela prazerosa convivência e por me ensinar estatística de forma objetiva e prática.

Ao Dr Alois Bianchi, Diretor do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer pela oportunidade que sempre me deu, pelo privilégio de tê-lo como meu mestre e por continuar me ensinando.

À Dra Beatriz de Camargo, Chefe do Serviço de Oncologia Pediátrica do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer, pela grande amizade, pelo cuidado e pelo incentivo de tantos anos.

À Dra Anamaria Aranha Camargo, Pesquisadora do laboratório de genética do câncer, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pelo apoio constante no laboratório, pelas valiosas sugestões e por me ensinar a técnica de Southern Blot, utilizada neste trabalho.

À Profª Dra Beatriz T.C.Carvalho, da Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria da UNIFESP-EPM, pela forma amiga com que me recebeu e identificou os pacientes com Ataxia Teleangiectasia. Sem seu apoio, este trabalho não teria sido possível.

À amiga Helena Paula Brentani Samaia, colega de doutorado, por me ensinar o significado das palavras perseverança, esforço e dedicação.

Ao Dr Humberto Torloni, Diretor do Centro de Pesquisas do Hospital do Câncer, por me fazer entender que “aquele que se propõe a educar deve ser um modelo daquilo que pretende ensinar”.

Aos Colegas do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer, médicos da equipe e médicos residentes, pelo prazer do convívio e pela ajuda na identificação dos pacientes do estudo.

A Maria Aparecida B.Sampaio, administradora do Ambulatório de Pediatria, e aos funcionários da recepção pelo trabalho incansável no agendamento dos pacientes do estudo.

A Andréa Yamaguchi Kurashima, enfermeira, e Maria de Fátima e Silva, auxiliar de enfermagem, pelo auxílio na coleta de sangue dos pacientes do ambulatório de Pediatria.

A Elisangela Monteiro, pela ajuda no seqüenciamento; a Edina da Conceição Rodrigues Pires e Ricardo Pereira de Moura, por me ensinarem a técnica de “PCR”; a Diana Noronha Nunes e Nídia Alice Pinheiro, pelo incentivo e amizade e aos demais colegas do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela convivência tão boa.

A Sra Sueli Francisco, a Sra Rosineia Aguiar Carneiro e aos demais funcionários da biblioteca do Hospital do Câncer, pela valorosa contribuição.

À Srta Hirde Contesini e aos demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer, pela preciosa ajuda na identificação dos prontuários e pelo carinho sempre presente.

Às secretárias Arlete da Rocha, (Hemocentro, UNICAMP) e Renata Maia (Sub Comissão, Pós Graduação- UNICAMP), pela ajuda imprescindível.

Meu sincero reconhecimento a todos aqueles que por descuido não foram aqui mencionados e que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

"...de tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro..."

Cecília Meireles

“A observação lê a natureza, a experiência a interroga”

(Zimmermann)

	<i>Pág</i>
RESUMO	xxxix
1. INTRODUÇÃO	45
1.1. Instabilidade gênica e câncer.....	47
1.2. Leucemias secundárias associadas à quimioterapia.....	48
1.3. Leucemogênese e desordens genéticas associadas.....	49
1.4. V(D)J recombinase e formação do gene híbrido $V\gamma/J\beta$	51
1.5. Ataxia teleangiectasia e o gene híbrido $V\gamma/J\beta$	53
1.6. O gene híbrido $V\gamma/J\beta$ e trabalhadores rurais.....	54
2. OBJETIVOS	57
3. PACIENTES E MÉTODOS	61
3.1 Pacientes.....	65
3.2. Protocolos de tratamento.....	67
3.3. Pacientes com ataxia teleangiectasia (Controle Positivo).....	70
3.4. Métodos e padronização dos experimentos.....	70
3.5. Interpretação dos resultados obtidos a partir das bandas geradas com produto de PCR dos DNAs dos 210 pacientes do estudo.....	83
4. RESULTADOS	85

5. DISCUSSÃO	93
5.1. Utilização da técnica da revelação pela prata em substituição à técnica de Southern Blot.....	95
5.2. Estudo do gene híbrido $\nu\gamma/\text{j}\beta$ e quimioterapia.....	95
6. CONCLUSÕES.....	103
7. SUMMARY	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
9. PUBLICAÇÃO.....	127
10 ANEXOS.....	139

Anelamento: processo bioquímico em que ocorre a união de duas seqüências complementares de DNA.

bp: o DNA é formado por nucleotídeos que se pareiam de acordo com as regras da complementaridade, sendo cada par denominado “base pairs” ou pares de base.

Cromossomo: unidade do genoma, contendo um grande número de genes; uma molécula de DNA de duplo filamento longa e linear e uma quantidade aproximadamente igual de proteínas.

Desnaturação: é a separação das moléculas de DNA dupla fita para fita simples; geralmente obtida através da elevação da temperatura ou através da utilização de substâncias alcalinas.

DNA: ácido desoxirribonucleico, molécula que codifica os genes responsáveis pela estrutura e função dos organismos vivos e permite a transmissão das características das espécies para a progênie na forma de genes.

Exon: região do gene que contém a seqüência que codifica um dado polipeptídeo.

Gene: Unidade hereditária; em termos moleculares, uma seqüência de DNA cromossômico, necessária à formação de um produto funcional

Hibridização: é o pareamento complementar de fitas de DNA ou RNA para produção de híbridos do tipo DNA-DNA ou DNA-RNA. Se o DNA dupla fita é desnaturado, e as fitas irmãs se encontram, elas se reassociam. Se, após a separação da dupla fita, adicionarmos um excesso de DNA denominado sonda, complementar à seqüência de interesse, devido à vantagem numérica, a sonda encontrará o alvo antes da fita “irmã”, ocorrendo uma hibridização e não a reassociação de duas fitas irmãs.

Intron: segmento do gene que se localiza entre os exons. Essa região é eliminada no nível de RNAm (responsável pela codificação da proteína). Desta forma não há expressão na proteína.

Nucleotídeo: é a unidade formadora dos ácidos nucléicos compostos por grupos fosfatos, uma ribose ou deoxirribose, e as bases pirimidínicas (C,T,U) ou purínicas (A,G).

Oligonucleotídeo: pequena sequência de nucleotídeos.

Oncogene: gene com a capacidade de transformar células normais em neoplásicas.

PCR: “polimerase chain reaction” ou reação em cadeia por polimerase, que permite a amplificação do DNA por meio de dois oligonucleotídeos flanqueadores, ou “primers”, e os ciclos repetidos de amplificação com DNA-polimerase. Permite a análise de uma sequência curta de quantidades muito pequenas de DNA ou RNA sem a necessidade de clonagem prévia.

“primers”: sequência iniciadora, geralmente curta (20 a 30 pb), que é pareada a uma das fitas de DNA para dar início à síntese de uma nova cadeia de desoxirribonucleotídeos.

Sonda: pequeno fragmento de DNA utilizado para a detecção de outro fragmento de DNA complementar que é o alvo, através de hibridização molecular. A sonda é marcada com substâncias radioativas ou não radioativas.

Southern Blot: método de transferência de fragmentos de DNA, que foram separados por eletroforese em gel de agarose, para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, onde poderá ser hibridizado com um ácido nucléico complementar.

Translocação cromossômica: transferência de um segmento de um cromossomo para outro cromossomo. Caso dois cromossomos homólogos troquem fragmentos, a translocação é recíproca.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

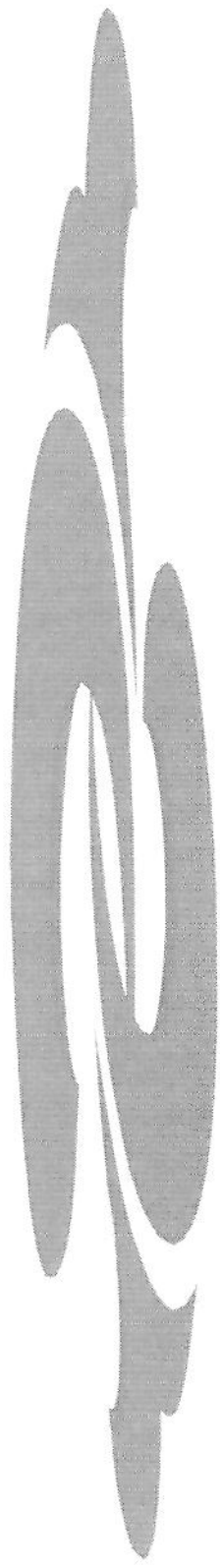
A	Adenina
AT	ataxia teleangiectasia
BFM	grupo cooperativo alemão Berlin, Frankfurt, Münster
C	citosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleosídeos trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
G	guanina
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
MLL	gene Myeloid-Lymphoid Leukemia ou Mixed-Lineage Leukemia
PCR	reação em cadeia por polimerase
QT	quimioterapia
SNC	sistema nervoso central
T	timina
TCR	receptor de células T
t-LMA	termo utilizado para designar uma leucemia mielóide secundária a agentes químicos ou físicos
TS	tumor sólido

LISTA DE TABELA

	Pág
TABELA I: Grupo de pacientes do estudo, subdivididos por período de tratamento.....	67
TABELA II: Características dos protocolos de tratamento das LLA e dos Tumores Sólidos.....	69
TABELA III: Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ou sondas nas PCRs.....	72
TABELA IV: Média das idades dos pacientes do estudo.....	87
TABELA V: Frequência do rearranjo TCR γ/β dos pacientes com LLA e TS..	89

LISTA DE FIGURA

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Representação esquemática do gene híbrido V γ / J β	52
FIGURA 2 : Amplificação do gene V γ / J β nos pacientes com Ataxia Teleangiectasia.....	75
FIGURA 3 : Amplificação por “Nested” PCR do gene V γ / J β pela técnica de Southern- Blot.....	77
FIGURA 4 : Seqüenciamento automático do gene V γ / J β utilizando DNA de um paciente com Ataxia Teleangiectasia.....	78
FIGURA 5 : Padronização das condições de PCR com o gene GAPDH.....	80
FIGURA 6 : Gel de poliacrilamida com visualização do gene V γ / J β com um paciente com Tumor Sólido.....	81
FIGURA 7 : Controle interno utilizando o gene GAPDH quando o gene V γ / J β não é visualizado.....	82
FIGURA 8 : Visualização gráfica da freqüência do gene V γ / J β dos pacientes com LLA e TS	90



RESUMO

Lopes LF - **Instabilidade gênica mediada pela V(D)J-recombinase e a presença do gene híbrido V γ /J β em pacientes pediátricos oncológicos expostos à quimioterapia.** Campinas; 2001. [Tese de Doutorado- UNICAMP]

No presente estudo foi investigado um tipo de instabilidade específica dos linfócitos que, segundo dados de literatura, pode estar relacionado com o desenvolvimento de neoplasias “de novo” ou associadas ao aparecimento de neoplasias secundárias. Esta instabilidade estudada é definida através da frequência de rearranjos que ocorrem entre o segmento V no receptor de células T no locus gamma (7p14-15) e do segmento J do receptor de células T no locus beta (7q 35). Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) utilizando o gene híbrido V γ /J β como marcador, estudar a instabilidade gênica induzida pela quimioterapia antineoplásica em pacientes pediátricos portadores de leucemia linfocítica aguda ou tumores sólidos; 2) estudar o grau de reversibilidade desta instabilidade após o final da exposição aos agentes quimioterápicos e 3) demonstrar a validade da abordagem de estudo da recombinação, avaliando os produtos da “nested PCR” de DNA genômico dos pacientes em gel de poliacrilamida, posteriormente revelado pela prata (abordagem ainda não descrita na literatura para o estudo do gene em questão).

Foram analisadas 210 amostras de DNA de indivíduos agrupados desta maneira: sem neoplasia- 30 indivíduos, 90 pacientes com LLA (15 pré Qt, 15 com QT 3-6 meses e 15 com 9 a 12 meses, 15 pacientes após término entre 6 e 12 m, 15 após 2 a 4 anos e 15 após 5 anos ou mais) e 90 pacientes com Tumor Sólido, também subagrupados da mesma forma que os pacientes com LLA . Todos os 210 pacientes foram classificados com resultado positivo ou negativo para o rearranjo, de acordo com a presença ou ausência da banda esperada após a segunda PCR. Para cada indivíduo foram estudadas 6 diferentes quantidades de DNA (525ng, 350,175,35,17.4, e 8.75) e, em cada uma delas, chamamos de positivo ou negativo para o rearranjo de acordo com a presença ou ausência da banda visualizada no gel revelado.

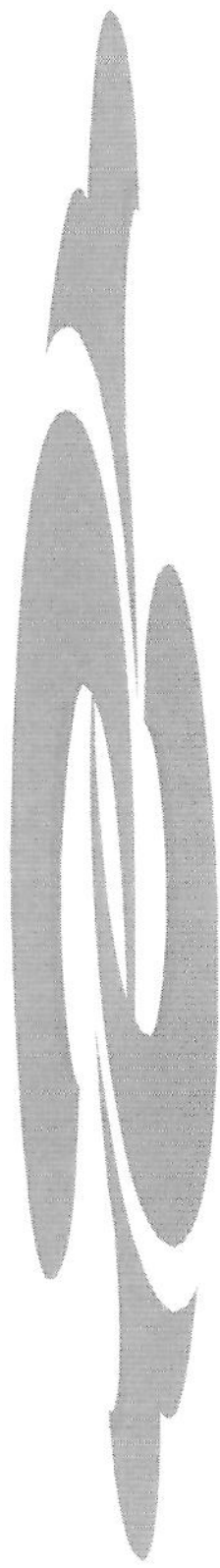
Foi determinada a média da frequência do rearranjo V γ /J β para cada grupo. O grupo de pacientes durante a quimioterapia foi comparado com a média da frequência dos rearranjos pré e pós-quimioterapia separadamente para o grupo de LLA e TS. As médias

foram comparadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram feitas através do método Tukey-HSD. A média da frequência de rearranjos foi de $10,2/10^5$ células para os pacientes com LLA que estavam expostos aos quimioterápicos no período de 3 a 6 meses e para o grupo em tratamento entre 9 a 12 meses foi de $13,8/10^5$.

Para o grupo controle (30 indivíduos) e para o grupo com LLA pré-tratamento os valores foram $1,3/10^5$ e $3,1/10^5$. O estudo estatístico comparando grupos -controle, LLA pré-QT e LLA durante QT - mostrou tratar-se de valores altamente significativos ($p < 0,001$).

No grupo de pacientes com Tumor Sólido, a média da frequência de rearranjos durante o tratamento foi de 9,2 e $9,1/10^5$ células respectivamente para 3 a 6 meses de tratamento e 9 a 12 meses. O grupo controle, sem neoplasia, foi o mesmo descrito acima e a média de rearranjo foi de $1,3/10^5$ e para os TS pré-quimioterapia foi de $0,6/10^5$ células. Novamente o estudo estatístico comparando grupos -controle, TS pré QT e TS durante QT - mostrou tratar-se de valores altamente significativos ($p < 0,002$).

Desta forma pode-se concluir que: 1) o método utilizando gel de poliacrilamida corado pela prata pode ser substituído pelo gel de agarose corado com brometo de etídio e hibridizado pela técnica de Southern Blot, sem prejuízo dos resultados e com a vantagem de ser mais rápido, de menor custo e da não-necessidade de utilização de material radioativo e 2) os resultados do estudo indicam que os pacientes apresentaram instabilidade gênica onde a presença do gene híbrido $V\gamma/J\beta$ pôde ser observada em frequência mais elevada durante a fase de tratamento com quimioterapia.



1. INTRODUÇÃO

1.1. INSTABILIDADE GÊNICA E CÂNCER

A instabilidade gênica ocorre de forma natural na evolução e no desenvolvimento das espécies, estando presente também no desenvolvimento do câncer. O risco de um indivíduo apresentar um tipo particular de câncer está relacionado à sua propensão de desenvolver mutações genéticas, deleções, amplificações, inserções ou translocações, de maneira geral ou em uma linhagem celular específica. Translocações associadas a neoplasias, envolvendo linfócitos humanos, freqüentemente estão relacionadas a rearranjos associados aos receptores de células T (TCR) e imunoglobulinas. Estes genes podem ter origem durante a fase de maturação dos linfócitos T e B, bem como no processo de estimulação antigênica (MEYDAN D et al, 1999). Tem sido sugerido na literatura que estes eventos sejam utilizados como marcadores de instabilidade gênica, de exposição genotóxica e também do risco de câncer.

Indivíduos com história de câncer na infância apresentam 10 a 20 vezes maior risco de desenvolver um segundo câncer em relação à população normal. O tempo de aparecimento deste segundo câncer não está bem definido, mas 3 a 12% das crianças o desenvolvem nos primeiros 20 anos (ANDRIEU JM et al, 1990; BLAYNEY DW et al, 1987; GLICKSMAN AS et al, 1982; HENRY-AMAR M et al, 1993; KALDOR JM et al, 1990; MEADOWS AT et al, 1989). Esta porcentagem varia de acordo com idade, tipo de tratamento usado no primeiro câncer, diagnóstico do primeiro câncer, condições genéticas propícias para o aparecimento etc. Pacientes conhecidos como de maior risco são os portadores de linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, câncer de ovário, retinoblastoma, tumor de Wilms com história genética, pacientes expostos a radioterapia e agentes alquilantes, xeroderma pigmentoso, doença de von Reicklinghausen, síndrome de Klinefelter etc (ANDRIEU JM et al, 1990; BLAYNEY DW et al, 1987; GLICKSMAN AS et al, 1982; HENRY-AMAR M et al, 1993; KALDOR JM et al, 1990; MEADOWS AT et al, 1989).

Os pacientes com linfoma de Hodgkin apresentam risco relativo para desenvolvimento de leucemia de 37.4 e linfoma não Hodgkin 20.6 (TUCHER MA et al, 1987; van LEEUWEN FE et al, 1994). Alguns estudos mostram que o tempo de aparecimento varia de 3 meses a 21 anos após o diagnóstico do primeiro câncer (média de

5.5 anos). Tumores não hematológicos surgidos nos pacientes que trataram de linfoma de Hodgkin parecem mostrar relação direta com a radioterapia recebida (campo, dose etc). Os segundos tumores mais comuns nestes pacientes foram tumores ósseos, sarcomas de partes moles, carcinoma de pele e carcinoma de tireóide (média de latência de 9.5 anos a 12 anos com incidência atuarial de 5.8% em 12 anos)(ANDRIEU JM et al, 1990; BLAYNEY DW et al, 1987; BOIVIN JF et al, 1984 ; DEVEREUX S et al, 1990; GLICKSMAN AS et al, 1982; HENRY-AMAR M et al, 1993; KALDOR JM et al, 1990; MEADOWS AT et al, 1989).

1.2. LEUCEMIAS SECUNDÁRIAS ASSOCIADAS À QUIMIOTERAPIA

Das doenças malignas hematopoiéticas como segundo câncer, a mais freqüente é a leucemia mieloide aguda (LMA). Sugere-se que há relação direta com exposição aos agentes quimioterápicos (GREENE MH et al, 1982; KALDOR JM et al, 1987; PEDERSEN-BJERGAARD J et al, 1985; REIMER RR et al, 1987; VALAGUSSA P et al, 1987). Estes agentes indutores de LMA são divididos em dois grupos: agentes alquilantes e agentes inibidores de topoisomerase II. Pacientes com tumores de ovário, gastrointestinais, tumores germinativos que foram tratados com agentes alquilantes, tiveram LMA em incidência que variou de 5 a 20% (GREENE MH et al, 1982; KALDOR JM et al, 1987; PEDERSEN-BJERGAARD J et al, 1985; REIMER RR et al, 1987; VALAGUSSA P et al, 1987).

Dados de literatura mostram que a incidência de segundo câncer em pacientes sobreviventes de leucemia linfocítica aguda (LLA) é bastante baixa, na ordem de 62/100.000 pacientes por ano, comparado com 280/100.000 nos pacientes com linfoma de Hodgkin, sendo o risco cumulativo estimado de 2,5% a 8% em 15 anos após o diagnóstico. Entretanto, tem sido mostrado mais recentemente um risco maior de desenvolvimento de LMA entre os pacientes com LLA expostos a epipodofilotoxinas (um dos agentes do grupo das drogas inibidoras da topoisomerase II) cujo risco cumulativo em 6 anos foi de 3,8%. Com estes dados tem-se observado que pacientes com tumores sólidos expostos a esta droga também desenvolvem LMA. A partir do conhecimento do efeito indutor de leucemia das epipodofilotoxinas, alguns estudos mais recentes descreveram outras drogas do mesmo grupo dos inibidores da topoisomerase II, tais como as antraciclinas e o mitoxantrone,

levando a efeitos semelhantes e indutores de leucemias (ANDRIEU JM et al, 1990; BLAYNEY DW et al, 1987; BOIVIN JF et al, 1984; GLICKSMAN AS et al, 1982; HENRY-AMAR M et al, 1993; KALDOR JM et al, 1990; MEADOWS AT et al, 1989; PEDERSEN-BJERGAARD J, et al, 1982; TUCKER MA, et al, 1988).

As leucemias relacionadas com tratamento são desordens hematopoiéticas ocorridas nas células precursoras ou, em alguns casos, ligadas a uma linhagem progenitora específica. As que se originam de forma espontânea são chamadas de LEUCEMIA “DE NOVO”. Chama-se de LEUCEMIA SECUNDÁRIA (t-LMA) àquelas que estão relacionadas ao tratamento de um primeiro câncer ou à exposição prévia de um agente mielotóxico. A maioria das leucemias secundárias está relacionada a uma fase prévia de mielodisplasia, relacionadas ao uso de alquilantes. Existe, entretanto, um número menor de pacientes que desenvolvem as leucemias secundárias sem passar por uma fase prévia de mielodisplasia, mesmo tendo sido expostos a um agente quimioterápico relacionado aos inibidores da topoisomerase II (THEIRMAN MJ et al, 1996).

1.3. LEUCEMOGÊNESE E DESORDENS GENÉTICAS ASSOCIADAS

Foi descrito que 80 dias são suficientes para provocar a transformação de uma célula tronco-hematopoiética em clone leucêmico através da ação carcinogênica e mutagênica *in vitro*. (KOEFLER HP et al, 1984) *In vivo*, em estudos clínicos, o período esperado mais aceito é de 5 a 7 anos para o aparecimento desta leucemia (sobreviventes da Bomba de Hiroshima e Nagasaki apresentaram média de 7 anos)(LEVINE EG & BLOOMFIELD CD, 1992). Mais recentemente, foi publicado estudo de pacientes com câncer de mama e que receberam mitoxantrone (pertencente ao grupo da Topo II), ciclofosfamida e fluoracil associada a radioterapia (LINASSIER C et al, 2000). Estes pacientes apresentaram t-LMA 13 a 36 meses após o início do tratamento com quimioterapia e 4 a 28 meses (mediana 10,5 meses) após o término do tratamento.

Os fatores que interferem no tempo de aparecimento das leucemias secundárias podem estar ligados à especificidade dos agentes carcinogênicos tais como: farmacologia da droga, dose e intensidade, exposição à radiação ionizante, fatores biológicos que exprimem a presença da deleção ou inativação de gene supressor previamente à exposição desses agentes (quimioterápicos, radioterápicos ou outras drogas leucemogênicas).

As alterações que envolvem tais leucemias se devem a várias lesões que ocorrem no DNA (deleções, inativações de genes supressores, mudanças de expressões do gene). As perdas de material cromossômico ou translocações são descritas nos pacientes que recebem agentes inibidores da topoisomerase II (enzima que envolve a replicação do DNA), sendo estes agentes: etoposide (VP16), tenitoposide (VM26) ou antraciclinas (DAVIES SM, 1996; RUBNITZ JE et al, 1996; WINICK NJ et al, 1993).

As t-LMA induzidas pela inibição da topoisomerase II expressam em 85% dos casos a presença de uma lesão envolvendo o cromossomo 11, banda q23. O mesmo gene pode ser encontrada em 10% dos pacientes com LLA e em 5% das LMA "DE NOVO". Chamou-se de gene MLL (*myeloid-lymphoid leukemia ou mixed lineage leukemia*) a esta alteração cromossômica. Este mesmo gene também foi chamado por outros centros de pesquisa de: ALL-1, HRX, H-trx, etc (DAVIES SM, 1996; RUBNITZ JE et al, 1996; WINICK NJ et al, 1993). Foram encontrados alguns dados clínicos associados a esta anormalidade: as leucemias linfocíticas agudas em lactentes expressam este gene em 68 a 81% dos casos (CHEN CS et al, 1993; CIMINO G et al, 1993; PUI CH et al, 1994). O *Pediatric Oncology Group* publicou trabalho mostrando que a média de leucócitos para os pacientes que apresentam esta anormalidade cromossômica foi de $497.000/mm^3$ X $33.300/mm^3$ dos que não têm esta translocação.

Além do gene MLL descrito, vários genes associados à 11q23 foram demonstrados: AF-4 t(4;11) (q21;q23); ENL t(11;19) (q23;p13.3); AF-9 t(9;11) (p22;q23) e outros. As funções específicas destes genes ainda não foram totalmente definidas (GU Y, NAKAMURA T et al, 1992; MITANI K et al, 1995; MORRISSEY J et al, 1993; NAKAMURA T et al, 1993; RUBNITZ JE et al, 1996; TKACHUK DC et al, 1992). Estas translocações já eram conhecidas nas leucemias agudas *de novo* e consideradas sinal de mau prognóstico. Outras alterações cromossômicas, além das relacionadas ao cromossomo

11, têm sido descritas nas leucemias secundárias. Além de pacientes com 11q23, um trabalho publicado em literatura recente descreve pacientes com inv(16)(p13q22), t(15;17)(q22;q11), t(8;21)(q22;q22) e del(20q)(q11). (LINASSIER C et al, 2000).

1.4. V(D)J RECOMBINASE E FORMAÇÃO DO GENE HÍBRIDO $V\gamma/J\beta$

A V(D)J (*variable diversity-joining*) recombinase, de forma fisiológica, catalisa a recombinação de segmentos de DNA nas cadeias leves e pesadas em receptores de células T (TCR) no processo de estimulação antigênica (TEWEY KM et al, 1984; WALDMANN TA, 1987). Conhece-se também o seu papel nas translocações das doenças malignas linfocitárias que resultam na desregulação do gene, afetando as células em desenvolvimento e em diferenciação. Algumas modificações gênicas em que a **V(D)J-recombinase** atua como desreguladora são conhecidas em genes já estudados em linfócitos malignos. São eles: o c-MYC, o BCL-2 ou o SCL (ADAMS JM et al, 1983; BERGER NA et al, 1991; BOEHM T, & RABBITTS TH, 1989; GRIESSER H et al, 1989; SHOWE LC & CROCE CM, 1987; WALDMANN TA, 1987).

Além das aberrações encontradas nos linfócitos malignos, a **V(D)J-recombinase** pode, também, gerar anormalidades citogenéticas vistas em linfócitos de sangue periférico de indivíduos normais, tais como t(14; 18) em células B e inversão do cromossomo 7 em células T. A Inv(7) origina-se da recombinação entre o TCR beta localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q35) e o braço curto do cromossomo 7 (7p14-15). (Figura 1). Esta inversão resulta em um gene híbrido $V\gamma/J\beta$ que está presente em uma baixa frequência em células T de indivíduos normais (BEGLEY CG et al, 1989; BODER E, 1985; BOEHM T & RABBITTS TH, 1989). Estas anormalidades ocorrem através do V(D)J-recombinante entre 2 locus antígeno-receptor, resultando em um gene híbrido antígeno-receptor (BAER R et al, 1985; BAER R et al, 1987; DENNY CT et al, 1986; DENNY CT et al, 1986; LIPKOWITZ S et al, 1990; STERN MH et al, 1989; TYCKO B et al, 1989).

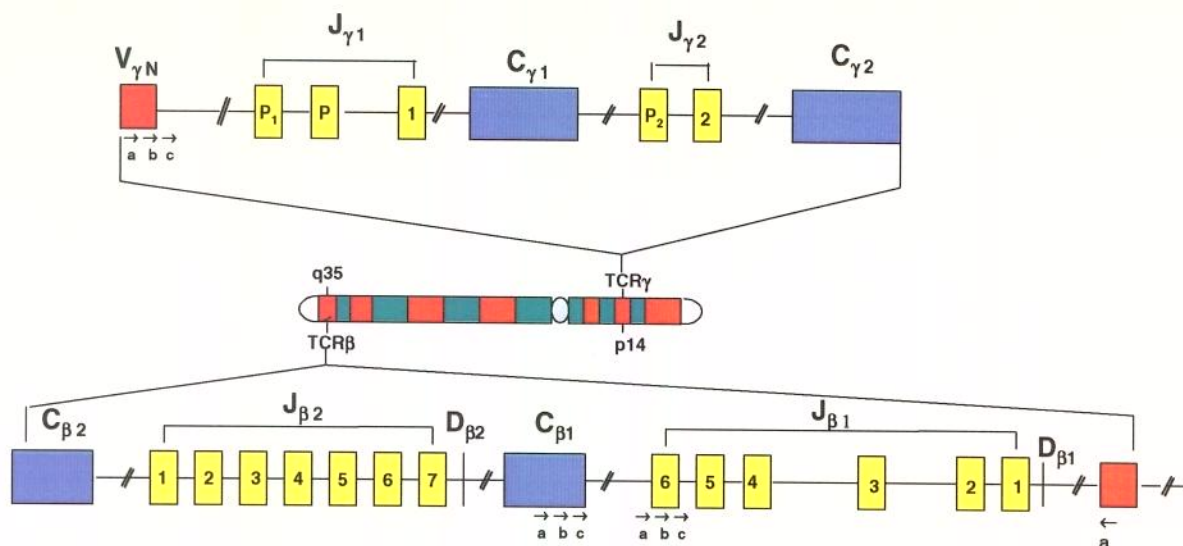


FIGURA 1 – Representação esquemática do gene híbrido formado pela recombinação entre receptor de células T γ (TCR γ) segmento V e receptor de células T β (TCR β) segmento J. A recombinação leva à inversão do cromossomo 7 nas regiões 7q35 e 7p14-15.

A ação da **V(D)J-recombinase** é descrita por alguns autores como sendo “ilegítima” (MEYDAN D et al, 1999). O estudo dos mecanismos envolvidos tem particular interesse, pois os rearranjos cromossômicos são associados às doenças hematológicas malignas. Vários estudos sugerem que xenobióticos podem induzir a recombinação ilegítima, tais como tratamento *in vitro* de células linfóides com cafeína e a elevação na frequência da recombinação (MENETSKIJP et al, 1990). *In vivo*, a exposição a quimioterápicos tais como VP16 e cisplatina também mostrou aumento na frequência de recombinação no gene *hprt* (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*), mediado pela V(D)J-recombinase (FUSCOE JC et al, 1992).

A frequência do gene **V γ J β** encontrado no receptor de células T dos pacientes portadores de linfoma de Hodgkin foi estudado por Abdallah et al (1995). O gene foi procurado no sangue periférico dos pacientes antes, durante e após o tratamento com quimio e/ou radioterapia. O gene **V γ J β** encontrado foi chamado pelos autores de *rearranjo-trans*, uma vez que o que se observou no estudo foi uma incidência aumentada deste rearranjo de forma transitória, sendo observado mais frequentemente durante o tratamento. Após 1 a 5 meses do final do tratamento, a frequência do gene V γ J β voltava a índices normais.

MEYDAN et al (1999) estudaram a presença do gene $V\gamma/J\beta$, chamado por estes autores de gene “ $TCR\beta/\gamma$ ilegítimo”. Os autores correlacionaram a frequência deste gene com a idade, exposição ocupacional, tratamento citostático, correlação com a translocação t(14;18) e com a mutação do gene *hprt*. O gene $V\gamma/J\beta$ foi encontrado em uma frequência 5 vezes maior entre indivíduos de 23-61 anos (chamados de “meia idade”) quando comparados com recém-nascidos ou indivíduos acima de 81 anos. Pacientes com tumor de testículo expostos a VP16 ou a outros quimioterápicos citostáticos foram estudados e não se observou aumento na frequência do gene, quando comparados com indivíduos controle, do início do tratamento até 6 anos após o seu término (MEYDAN et al, 1999).

Estudos feitos por SMITH et al (1998) mostram que pacientes com anemia de Fanconi, que é uma doença de caráter hereditário, apresentam quebras cromossômicas espontâneas ou induzidas e rearranjos anormais mediados pela **V(D)J-recombinase**. Estes autores mostram que em linfócitos de pessoas normais a recombinação ocorre de forma precisa, enquanto em pacientes com Anemia de Fanconi ocorre um aumento significativo de rearranjos aberrantes. HSIEH et al. (1993) descrevem pacientes com desordens associadas à imunodeficiência tais, como pacientes com Síndrome de Bloom e Ataxia Teleangiectasia, estando a **V(D)J-recombinase** envolvida no processo de reparo do DNA nestas doenças.

1.5. ATAXIA TELEANGIECTASIA E O GENE HÍBRIDO $V\gamma/J\beta$

Em pacientes com ataxia teleangiectasia (AT), doença associada à imunodeficiência, de caráter hereditário, a síndrome de instabilidade gênica está associada com alta frequência a doenças malignas linfocitárias (DAVIES SM, 1996). Ataxia teleangiectasia é caracterizada pela degeneração cerebelar progressiva, teleangiectasia óculo-cutânea, imunodeficiência, radiosensibilidade, quebras cromossômicas e risco aumentado de desenvolvimento de doenças malignas, principalmente linfóides. Nestes pacientes sabe-se que o gene híbrido antígeno-receptor $V\gamma/J\beta$ é formado pela recombinação entre receptor de células T γ (TCR γ) segmento V e receptor de células T β (TCR β)

segmento J. A especificidade deste gene recombinante entre TCR γ e TCR β não tem sua atividade transformadora bem definida, resultando na chamada translocação “inocente”. O gene recombinante nos linfócitos do sangue periférico ocorre em uma frequência de 10 a 100 vezes maior que o normal (DAVIES SM et al, 1990). Coincidência ou não, o risco de os pacientes com AT desenvolverem câncer é também de 10 a 100 vezes maior (BODER E, 1985; GATTI RA & GOOD RA, 1971; DAVIES SM et al, 1990). Esta frequência é semelhante para esses indivíduos desenvolverem alterações malignas linfocitárias. Desta forma, a frequência do gene híbrido encontrado no sangue periférico dos pacientes com AT é paralela à predisposição destes pacientes a desenvolverem doenças malignas linfocitárias. Há também uma alta frequência de anormalidades citogenéticas mediadas pelo interlocus recombinante entre pacientes não AT e linfoma não Hodgkin, sugerindo relação entre esta translocação “inocente” e doenças malignas linfocitárias (CARRIER F et al 1997, LIPKOWITZ S et al, 1992).

TAYLOR et al (1996) reforçam os dados de literatura de que o risco maior de câncer em pacientes com AT ocorre entre 10 até 100 vezes. Estes autores referem não haver anormalidades no complexo da V(D)J recombinase entre os pacientes com AT, por isso continuam utilizando o termo gene “inocente”. LOEB et al (2000) descrevem lactentes em que o diagnóstico de AT foi feito posteriormente ao diagnóstico de neoplasias de linhagem linfóide. Os casos de leucemias de lactentes mostravam sintomas ligados à neoplasia antes dos sintomas ligados à AT.

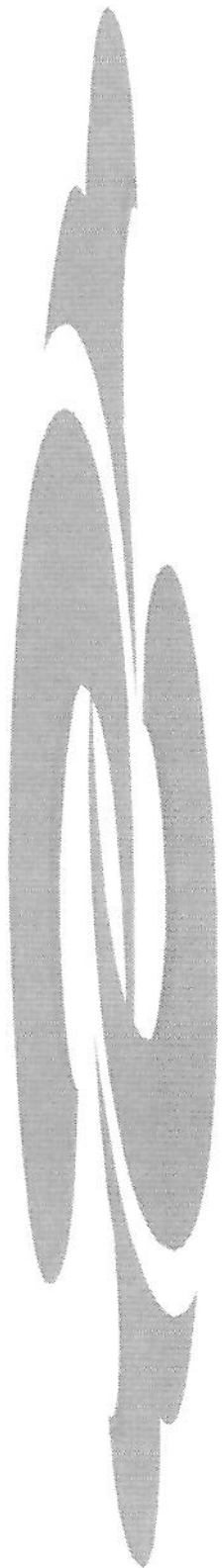
1.6. O GENE HÍBRIDO V γ /J β E TRABALHADORES RURAIS

LIPKOWITZ et al (1992) descreveram um grupo de trabalhadores rurais que viviam no chamado “cinturão leucemia-linfoma” no sudoeste de Minnesota e noroeste de Iowa, nos Estados Unidos. Neste estudo foi encontrado um aumento na frequência de recombinação relacionada com exposição a herbicidas e pesticidas usados na produção ou estocagem de grãos. Encontrou-se alta frequência de anormalidades citogenéticas em sangue periférico destes trabalhadores rurais, sendo que o padrão de anormalidade é semelhante aos pacientes com AT (GARRY VF et al, 1989). O gene estudado foi também o

gene $V\gamma/J\beta$. Estes trabalhadores apresentam também elevado risco de desenvolver doenças malignas de linfócitos T ou B (ALAVANJA, MC et al, 1990; BLAIR A et al, 1985; BROWN LM et al, 1990; HOAR S et al, 1986; ZAHM SH et al, 1990). A base genética para o aumento de frequência dos genes híbridos no sangue periférico entre agricultores e pacientes com AT é desconhecida.

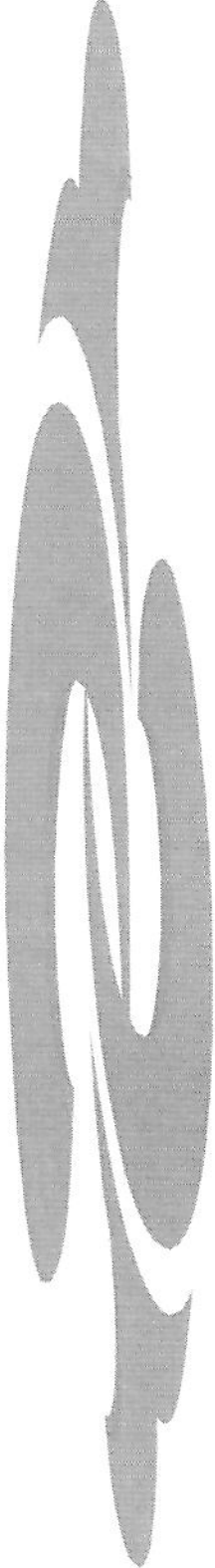
A representação esquemática do gene estudado, originalmente descrita por LIPKOWITZ et al (1990 & 1992) pode ser visualizada na figura 1.

No presente estudo foi investigado um tipo de instabilidade específica dos linfócitos que, segundo dados de literatura, pode estar relacionado com o desenvolvimento de neoplasias “de novo” ou associadas ao aparecimento de neoplasias secundárias. Esta instabilidade estudada é definida através da frequência de rearranjos que ocorrem entre o segmento V no receptor de células T no locus gamma (7p14-15) e do segmento J do receptor de células T no locus beta (7q 35). Este rearranjo resulta na inversão no cromossomo 7 e é mediado pela ação da **V(D)J-recombinase**. Este rearranjo é chamado de gene $V\gamma/J\beta$, como descrito anteriormente.



2. OBJETIVOS

1. Utilizando o gene híbrido $V\gamma/J\beta$ como marcador, estudar a instabilidade gênica induzida pela quimioterapia antineoplásica em pacientes pediátricos portadores de leucemia linfocítica aguda ou tumores sólidos.
2. Estudar o grau de reversibilidade desta instabilidade após o final da exposição aos agentes quimioterápicos.
3. Demonstrar a validade da abordagem de estudo da recombinação, avaliando os produtos da “nested PCR” de DNA genômico dos pacientes em gel de poliacrilamida posteriormente revelado pela prata (abordagem ainda não descrita na literatura).



3. PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES E MÉTODOS. Resumo das etapas

1. Pacientes e delineamento do estudo

Este é um estudo transversal constituído de 3 grupos de pacientes

DNA de duas crianças com ataxia teleangiectasia foi utilizado como controle positivo para padronização das técnicas utilizadas para os 210 pacientes do estudo.

- **LLA:** ao diagnóstico, dois períodos durante a exposição aos quimioterápicos e três períodos pós-término do tratamento
- **Tumor Sólido:** nos mesmos períodos Dos pacientes com LLA
- **Controles :** 20 pacientes de 0 a 20 anos sem neoplasia, matriculados no Departamento de Pediatria e 10 voluntários adultos

Material colhido de cada caso:

- **Sangue periférico:** colhido em tubo *vacutainer* com EDTA.
- **Estudo de DNA de leucócitos:** com o objetivo de procurar e quantificar o gene híbrido $V\gamma/J\beta$ que foi utilizado como marcador de instabilidade gênica.

2. Protocolos de tratamento: foram utilizados de acordo com a época da admissão no Hospital do Câncer e tipo de tumor.

3. Padronização da análise do gene $V\gamma/J\beta$ em pacientes portadores de AT

- Amplificação do segmento TCR $V\gamma/J\beta$ através da técnica de “nested PCR”

- Revelação pela prata de produtos de PCR separados em gel de poliacrilamida, método este inédito para pesquisa do gene híbrido $V\gamma/J\beta$

Verificação da presença do gene híbrido através da técnica de Southern-Blot

- Técnica convencional, habitualmente utilizada na literatura, nos estudos feitos com o gene híbrido de nosso interesse.

Seqüenciamento automático e análise em bancos de dados

- Utilização do seqüenciador automático a laser e comparação da seqüência obtida com outras, depositadas no “GeneBank”, para confirmação de que a banda obtida é realmente o gene de interesse do estudo.

Controle da reação com diferentes quantidades de DNA

- O objetivo é a confirmação de que todas as quantidades de DNA propostas para o estudo foram adequadas. É importante diferenciar a não amplificação resultante da ausência do gene híbrido, da não amplificação por haver pequenas quantidades ou quantidade excessiva de DNA que inibe a reação de amplificação. Nesta etapa introduzimos como controle uma reação positiva para a amplificação do gene da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), presente em todas as amostras.

Controle da reação sem DNA, chamado de controle negativo

- Usado com a finalidade de descartar a possibilidade de contaminação das amostras, o que poderia levar ao aparecimento de produto de PCR, mesmo na ausência do gene híbrido na amostra de DNA sob investigação. Este controle consiste em um tubo com todo o “mix” de amplificação, em que, no entanto, não ocorre a adição de DNA genômico.

4. Utilização de DNA genômico das 210 amostras do estudo utilizando a técnica de “nested PCR” e revelação pela prata de produtos de PCR separados em gel de poliacrilamida.

5. Controle interno das amostras que não apresentaram a banda de interesse

Utilizamos os iniciadores do gene GAPDH para a realização da PCR em todas as amostras em que a banda do gene híbrido $V\gamma/J\beta$ não foi visualizada, para confirmação de que não estava havendo inibição da PCR, ou algum problema com a extração de DNA.

6. Interpretação dos resultados obtidos na “nested PCR” e cálculo do número de células com o rearranjo.

7. Análise estatística dos resultados

3.1. PACIENTES

Com um estudo transversal, analisaram-se 210 amostras de DNA para verificação da frequência do gene híbrido em linfócitos do sangue periférico. Entre eles, 200 eram pacientes do Departamento de Pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa, Hospital do Câncer, São Paulo e 10 amostras foram obtidas a partir do banco de DNA do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo. O ANEXO 1 exibe autorização dada em 30/09/97 pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer. No ANEXO 2 estão listadas as características dos 210 indivíduos estudados, relacionados de acordo com as iniciais de seus nomes, data da coleta do sangue, divisão por grupos do estudo, além da frequência de rearranjos encontrada para cada paciente e a concentração mínima necessária de DNA que permitiu a visualização do rearranjo esperado e o cálculo da frequência. Foram recrutados pacientes do Ambulatório de Pediatria cujo termo de consentimento pós-informado foi assinado pelo paciente (quando maior de 18 anos) ou por um de seus pais ou responsáveis após esclarecimentos sobre os objetivos do estudo. (ANEXO 3)

Este é um estudo transversal, constituído de 3 grupos de pacientes:

- **Controles** : 20 pacientes de 0 a 20 anos sem neoplasia matriculados no Depto de Pediatria e 10 voluntários adultos
- **LLA**: ao diagnóstico, dois períodos durante a exposição aos quimioterápicos e três períodos pós-término do tratamento
- **Tumor Sólido**: nos mesmos períodos dos pacientes com LLA

3.1.1. Indivíduos sem neoplasia

No grupo de indivíduos sem neoplasia, foram utilizadas 30 amostras de DNA (10 pacientes de 0 a 10 anos de idade, 10 pacientes de 11 a 20 anos, 10 voluntários > 20 anos). Amostras de 20 pacientes de 0 a 20 anos foram sendo coletadas na ocasião em que os pacientes eram matriculados no Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer para esclarecimento diagnóstico, porém sugerindo doença não neoplásica. Afastado o diagnóstico de neoplasia, o DNA era extraído e estocado. Outras 10 amostras foram aleatoriamente separadas no banco de amostras de DNA, colhidas entre os pesquisadores e funcionários do Instituto Ludwig, todos com idade superior a 20 anos de idade, que concordaram em que fosse colhido sangue para que houvesse um estoque de DNA de indivíduos normais. Antes da utilização para este estudo, todas as amostras do banco de DNA normal foram codificadas e previamente utilizadas em outros experimentos.

3.1.2. Crianças com leucemia linfóide aguda

Neste grupo foram coletadas amostras de 90 pacientes: 15 com LLA ao diagnóstico sem quimioterapia prévia, 15 em tratamento, expostas aos quimioterápicos entre 3 a 6 meses, 15 em tratamento, expostas aos quimioterápicos entre 9 e 12 meses, 15 crianças fora de tratamento de 6 meses a 1 ano, 15 crianças fora de terapia de 2 a 4 anos e 15 crianças fora de terapia há mais de 5 anos.

3.1.3. Crianças com tumor sólido

Foram coletadas amostras de crianças portadoras de linfoma de Hodgkin, osteossarcoma, sarcoma de Ewing ou rhabdomyosarcoma. Neste grupo também foram coletadas 90 amostras cujos subgrupos são iguais aos do grupo das leucemias, descritas acima no item 3.1.2. A Tabela I resume os grupos e os períodos acima descritos.

TABELA I – Grupo de pacientes do estudo, subdivididos por período de exposição aos quimioterápicos (pré, durante e pós) e diagnóstico (LLA vs Tumor Sólido).

DIAGNÓSTICO	EM TRATAMENTO	PÓS-TÉRMINO
(1) Crianças sem neoplasia n=30	(4) LLA 3 a 6 meses n=15	(8) LLA 6 meses a 1 ano n=15
(2) Crianças com LLA n=15	(5) LLA 9 meses a 1 ano n=15	(9) LLA 2 e 4 anos n=15
(3) Tumor Sólido n=15	(6) Tu sólido 3 a 6 meses n=15	(12) LLA após 5 anos n=15
	(7) Tu sólido 9 a 12 meses n=15	(10) Tu sólido 6 meses a 1 ano n=15
		(11) Tu sólido 2 a 4 anos n=15
		(13) Tu sólido após 5 anos n=15
n= 60	n= 60	n= 90

3.2. PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

3.2.1. Pacientes com LLA

Pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) foram tratados de acordo com o protocolo utilizado no departamento na data de admissão, conforme descrito na tabela II. Os Protocolos Brasileiros para LLA chamados de GBTLI-80, 82 e 85 foram previamente descritos na literatura por BRANDALISE et al (1993). No GBTLI –85, foram utilizadas epipodofilotoxinas (VP16 e VM-26). Os pacientes analisados após terapia no período de 2 a 4 anos foram tratados com o protocolo brasileiro GBTLI-93 ou com o protocolo alemão BFM-86 (REITER A et al, 1994).

3.2.2. Pacientes com tumor sólido

Nos pacientes com tumor sólido, os protocolos utilizados dependeram do tipo de tumor que o paciente apresentava (osteossarcoma, sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma ou linfoma de Hodgkin) e do período em que foram admitidos para tratamento. As características destes pacientes e do tratamento podem ser encontradas na tabela II. Os pacientes com linfoma de Hodgkin foram tratados com MOPP e/ou ABVD e/ou OPPA utilizando protocolos terapêuticos previamente descritos na literatura (HUDSON MM, & DONALDSON SS, 1999). Todos os pacientes com sarcoma de Ewing receberam altas doses de ciclofosfamida assim como vincristina e adriamicina. Pacientes com osteossarcoma foram tratados com altas doses de MTX/CDDP/ADRIA (methotrexate/cisplatina/adriamicina) entre 1985-1989. A dose cumulativa de MTX foi de 144g/m^2 , CDDP 840mg/m^2 e ADRIA 210mg/m^2 . No período de 1994-1995 os pacientes foram tratados com IFO/ADRIA/CDDP/VP-16. A dose cumulativa foi de 54g/m^2 para IFO (ifosfamida), 375mg/m^2 para ADRIA, 720mg/m^2 para CDDP e 2.7g/m^2 para VP16. Durante o período de 1997-1999 o tratamento utilizado foi IFO/ADRIA/CARBO/CDDP com doses cumulativas de 45g/m^2 para IFO, 360mg/m^2 para ADRIA, 2.5g/m^2 para CARBO (carboplatina) e 500 mg/m^2 para CDDP. Pacientes com rabdomiossarcoma foram tratados por 50 semanas utilizando VAC quando eram não metastáticos ou VAC + IFO/ADRIA/VP16 se metastáticos ou com doença parameningea. A dose cumulativa de ADRIA foi de 360 mg/m^2 , IFO 81g/m^2 e VP-16 2g/m^2 .

TABELA II – Características dos protocolos de tratamento das LLA e dos Tumores sólidos .

	Pré-tratamento Ano de admissão	Períodos durante QT Anos do tratamento / Protocolos utilizados	Períodos pós QT Anos do tratamento/ Protocolos utilizados
LLA	1998	3-6m: 1997 a 1999/ LLA-93 9-12m: 1996 a 1998/ LLA-93	6-12m: 1995 a 1998/ LLA-93 2-4 anos: 1991 a1994/LLA-93 ou BFM-86 > 5anos: 1980 a1990/ LLA-80 ou LLA-82 ou LLA-85
TS	1998	3-6 m: 1997 a 1999/ * 9-12 m: 1997 a 1999/ *	6-12 m: 1997 a 1998/ * 2-4 anos: 1994 a 1995 /** 5 anos: 1985 a 1991/ ***

LLA 93 – Grupo Cooperativo Brasileiro- GBTLI-93

LLA –BFM 86 – Estudo Cooperativo Alemão – BFM 86

LLA 80 /LLA 82/ LLA 85 –Grupo Cooperativo Brasileiro- GBTLI-80, -82 e-85

* Protocolos para Tumores Sólidos utilizados entre 1997 e 1999:

Hodgkin : ABVD/ OPPA,

Sarcoma Ewing – CICLO, ADRIA,VCR com ou sem IFO, VP16

Osteossarcoma – IFO/ADRIA/CARBO/CDDP

Rabdomiossarcoma-VAC ou VAC+IFO/ADRIA/VP16

** Protocolos para Tumores Sólidos utilizados entre 1994 e 1995

Hodgkin : ABVD/ OPPA

Sarcoma de Ewing – CICLO, ADRIA,VCR com ou sem IFO, VP16

Osteossarcoma - IFO/ADRIA/CDDP/VP16

Rabdomiossarcoma- VAC ou VAC+IFO/ADRIA/VP16

*** Protocolos para Tumores Sólidos utilizados entre 1985 e 1991

Hodgkin : 1985-1987 ABVD , 1988-1991 ABVD/MOPP

Sarcoma de Ewing – 1985 – 1989 CICLO, ADRIA,VCR , MTX , 1990-1991
CYCLO, ADRIA, VCR

Osteossarcoma - HD MTX/CDDP/ADRIA

Rabdomiossarcoma- VAC ou VAC+IFO/ADRIA/VP16

3.3. PACIENTES COM ATAXIA TELEANGIECTASIA (CONTROLE POSITIVO)

Foi coletado sangue de dois pacientes com Ataxia Teleangiectasia (AT), registrados e acompanhados na Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria da UNIFESP-EPM. O DNA destas crianças foi extraído e as amostras codificadas como AT1 e AT2. O DNA destes pacientes foi utilizado como controle positivo para a padronização das técnicas utilizadas no estudo.

3.4. MÉTODOS E PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

3.4.1 Coleta de sangue e extração do DNA

Foram colhidas amostras de 10 ml de sangue periférico, em EDTA (250mM, pH=8.0), de crianças entre 0 e 18 anos de idade que estivessem incluídas em um dos 3 grupos descritos nos itens 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3.

As células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll Hipaque e, em seguida, centrifugadas. A extração do DNA foi feita com a ressuspensão e digestão das células mononucleares em TES (Tris/EDTA/SDS, Tris 10mM, pH=8.0; EDTA 1mM, pH=8.0 e proteinase K (20 mg/ml) a 37°C. A seguir, o DNA foi purificado das proteínas e lipídeos, por extração orgânica com fenol e clorofórmio-

álcool isoamílico (24:1) e precipitado com a adição de etanol e acetato de sódio, de acordo com protocolo padrão (BOYUM , 1968). Ressuspendeu-se o DNA em TE e então, foi estocado em freezer a -20°C em tubos Eppendorf até o momento de ser analisado.

3.4.2. Quantificação do DNA

1. Colocação em microtubos de polipropileno tipo Eppendorf de 1,5 ml, 1 ml de água *Milli-Q* e 5 µl de DNA. Agitação em vórtex.
2. Repouso em geladeira por uma noite para permitir total dissolução.
3. Leitura em espectrofotômetro após calibração com a mesma água utilizada para as diluições, em 260 nm (UV).
4. Cálculo: concentração de DNA em µg/ml = densidade óptica em 260 nm x 10.
5. Ajuste das concentrações de DNA das amostras para as reações de PCR para 0,1 µg/ml, pela fórmula $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ $\Rightarrow V_1 = \frac{N_2 \times V_2}{N_1}$ onde N_1 é o resultado do cálculo do item anterior, N_2 é a concentração desejada (0,1 µg/ml), V_2 é o volume final desejado (100 µl), e V_1 é a quantidade de água em µl necessária para completar 100 µl, ajustando a concentração da amostra para 0,1 µl.

3.4.3. Amplificação do segmento TCR V γ -J β através da técnica de PCR

A reação de amplificação tem como objetivo a análise de rearranjos entre segmento V dos TCR γ e segmento J dos TCR β . Os iniciadores utilizados neste trabalho foram sintetizados de acordo com o trabalho original de Stanley LIPKOWITZ et al (1990, 1992). Estes iniciadores amplificam uma porção do exon 2 do segmento V γ 1 V (5') e segmento J β 1,6(3') ilustrados na Figura 1.

A sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados encontra-se na Tabela III.

TABELA III – Sequência de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ou sondas nas PCRs dos experimentos do estudo.

V γ a	TACATCCACTGGTACCTACACCAG
V γ b	CTAGAATTCCAGGGTTGTGTTGGAATCAGGA
V γ c	TCTGGGGTCTATTACTGTGCCACCTGG
J β 1a	TTCCCAGCAACTGATCATTG
J β 1b	CCAGGATCCCCCGAGTCAAGA
J β 1c	CATACCTGTCACAGTGAGCC
GAPDHS	TTCATCCCTTCTCCCCACACAC
GAPDHA	AGTCCCAGGCTTTGATTG

Os oligonucleotídeos identificados como **a** foram utilizados como iniciadores externos na primeira PCR, os identificados como **b** foram utilizados como iniciadores internos na segunda PCR; aqueles chamados de **c** foram utilizados como sondas nos experimentos em que a técnica utilizada foi Southern-Blot. Os iniciadores utilizados no experimento para identificação do gene GAPDH foram identificados como GAPDHS e GAPDHA.

3.4.3.1. Diluição e quantificação dos iniciadores

1. Diluição do iniciador liofilizado em 1 ml de água *Milli-Q* estéril
2. Diluição para leitura- 20 μ l do *iniciador* diluído -980 μ l de água *Milli-Q* estéril
3. Leitura da Densidade Óptica (DO) em 260 nm
4. Cálculo da Densidade Óptica ajustada por volume (ODU): $\frac{VT \times DO}{20}$ onde VT= 1000 μ l (ver passo 2 acima)
5. Cálculo da concentração do iniciador (CP): $\frac{ODU \times 1000}{x 10}$ comprimento do *iniciador* (nº de bases)

6. Preparo da solução do *iniciador* para uso (10 µg/ µl, 200 µl de volume final):
$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{10 \times 200}{CP \text{ (passo 5)}}$$
, sendo V_1 - volume da solução estoque do *iniciador*, e $200 - V_1$ = volume de água para completar a solução do *iniciador* para uso.

3.4.3.2. Condições da PCR

Para verificar a presença da recombinação entre os segmentos $V\gamma$ e $J\beta$ foi padronizado um protocolo para PCR do tipo “nested”, utilizando os iniciadores $V\gamma a$, $J\beta 1a$, $V\gamma b$ e $J\beta 1b$ como descrito anteriormente e diferentes quantidades de DNA genômico. Na primeira PCR 525, 350, 175, 35, 17,4 ou 8,75 ng de DNA foram utilizados como molde em uma reação contendo 0.125 mM de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfato), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco/BRL), 1,5mM de $MgCl^2$ e 5 pmoles dos iniciadores $V\gamma a$ e $J\beta 1a$ denominados *iniciadores externos*, em uma solução tampão 10 X (20 mM Tris-HCl- pH 8.0 e 50 mM KCl). O volume final para amplificação foi de 25µl/amostra.

3.4.3.3. Programação do termociclador

- a- Desnaturação inicial a 95°C por 3 min,
- b- Anelamento a 58° C por 1 min,
- c- Extensão dos iniciadores a 72° C por 2 min,
- d- Desnaturação a 95° C por 1 min,
- e- 35 ciclos (passo b ao d),
- f- Um ciclo final com anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 5 min.

Do produto final da PCR foram retirados 2µl que foram utilizados como molde de amplificação em tubos novos. Esta segunda reação continha os mesmos componentes da reação anterior (nas mesmas concentrações), com exceção do uso de novos iniciadores (*Vγb* e *Jβ1b*), mais internos que os anteriores, e que permitiram a execução de uma PCR do tipo “nested”. As condições de amplificação foram idênticas às da primeira PCR.

3.4.4. Coloração pela prata de produtos de PCR separados em gel de poliacrilamida

Um volume de 3µl do produto da segunda PCR derivada das diferentes quantidades de DNA molde inicial foi aplicado em gel de poliacrilamida a 6% ou 8%.

A seguir as amostras foram submetidas a eletroforese por cerca de 45 minutos. Após a eletroforese, o gel foi fixado em 10% de etanol, ácido acético 0.5% por 3 minutos. A seguir foi corado em solução de nitrato de prata 0.2% e lavado com água-Milli-Q. O gel então foi revelado com 3% de Hidróxido de Sódio e 0.1% de formaldeído e lavado em água-Milli-Q. O gel foi fixado para secar em celofane hidrofílico com poro (SANGUINETTI CJ et al, 1994). Na Figura 2 pode-se visualizar o gel contendo os produtos amplificados do fragmento TCR *Vγ/Jβ* para os pacientes com Ataxia Teleangiectasia.

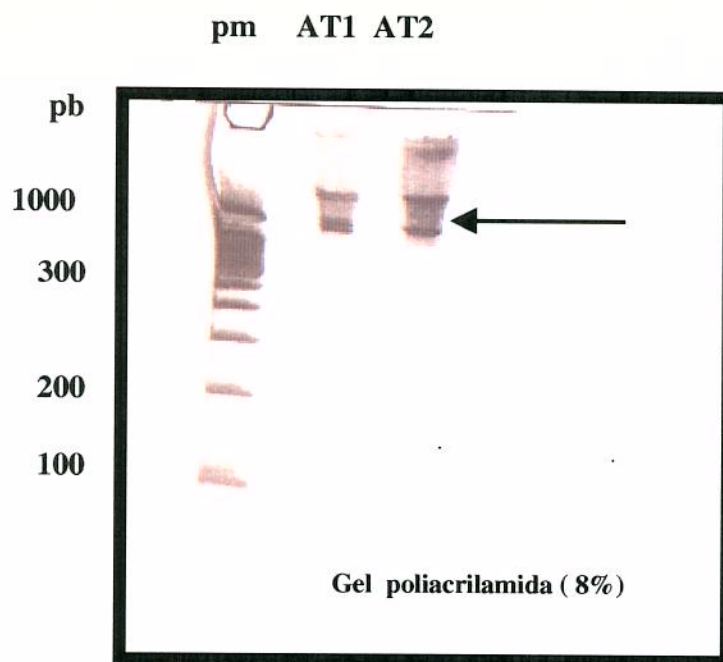


FIGURA 2 – Amplificação por “Nested PCR” do fragmento TCR V γ -J β a partir de leucócitos de 2 pacientes com Ataxia Teleangiectasia (AT1 e AT2).

Após amplificação por PCR com iniciadores externos e internos para o rearranjo mediado pela V(D)J recombinase, foi obtido o fragmento TCR V γ -J β . Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% e posteriormente corados com prata. Nas canaletas AT1 e AT2 foram aplicados 3 μ l do produto de PCR e na canaleta PM foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp. A seta indica o fragmento de interesse.

3.4.5. Utilização da técnica de Southern-Blot

Para padronização do experimento, utilizou-se DNA derivado dos dois pacientes com Ataxia Teleangiectasia, como controles positivos. Uma “nested” PCR foi realizada. Na primeira PCR 100ng de DNA foram utilizados como molde em uma reação

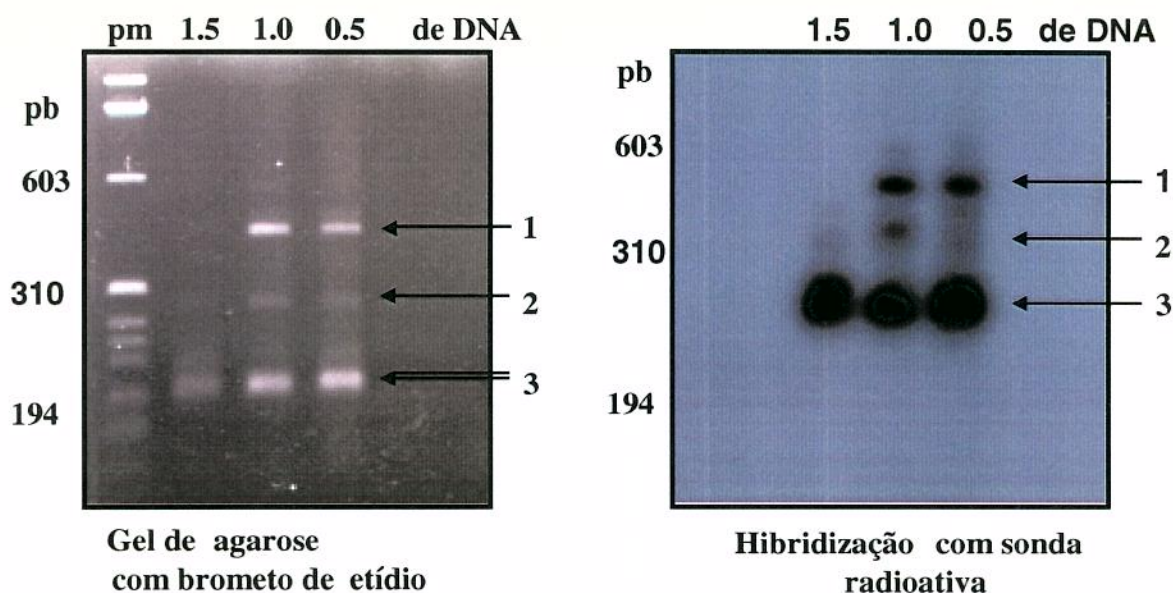
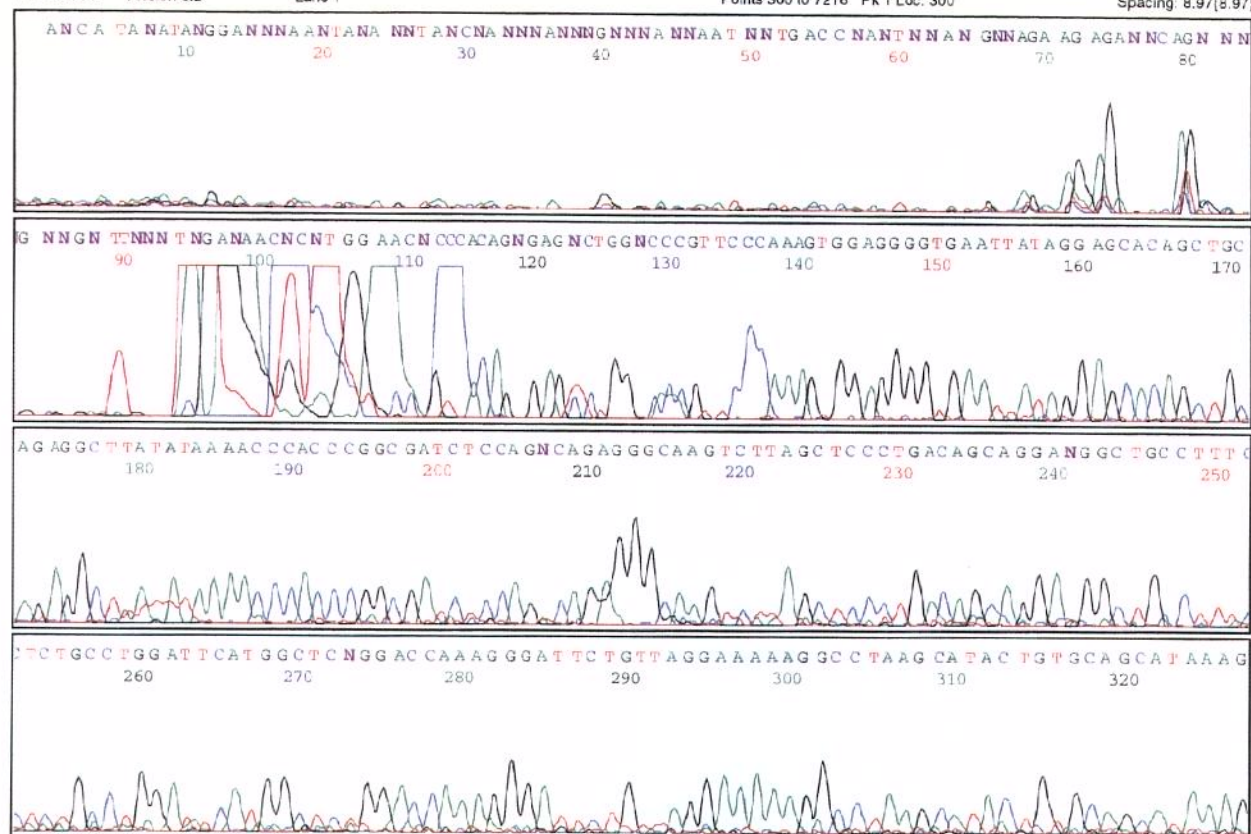


FIGURA 3 – Amplificação por “Nested” PCR do fragmento TCR V_gJ_b. Southern-Blot.

3.4.6. Seqüenciamento automático

Após a obtenção das amostras descritas no item anterior, os produtos amplificados nos experimentos foram seqüenciados no seqüenciador automático a laser, do tipo ABI 377, disponível no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig. A seqüência obtida foi comparada com outras depositadas no “GenBank”, utilizando-se o programa BlastN. Os resultados obtidos confirmaram tratar-se da banda de interesse do estudo: “Human T cell receptor beta chain, V-D-J junction”. A seqüência gerada no experimento ilustrado, contendo os primeiros 327 nucleotídeos, pode ser vista na Figura 4.



“Cromatograma representando a sequência dos primeiros 327 nucleotídeos provenientes do fragmento do rearranjo obtido por “Nested PCR”. A amostra do paciente AT1 foi sequenciada no sequenciador automático ABI 377 (Perkin-Elmer) utilizando o kit big dye terminator (Perkin-Elmer), segundo instruções do fornecedor. A figura acima representa uma terça parte da sequência gerada, analisada e submetida ao “gen bank” correspondendo a “Human T cell receptor beta chain V-D-J junction”.”

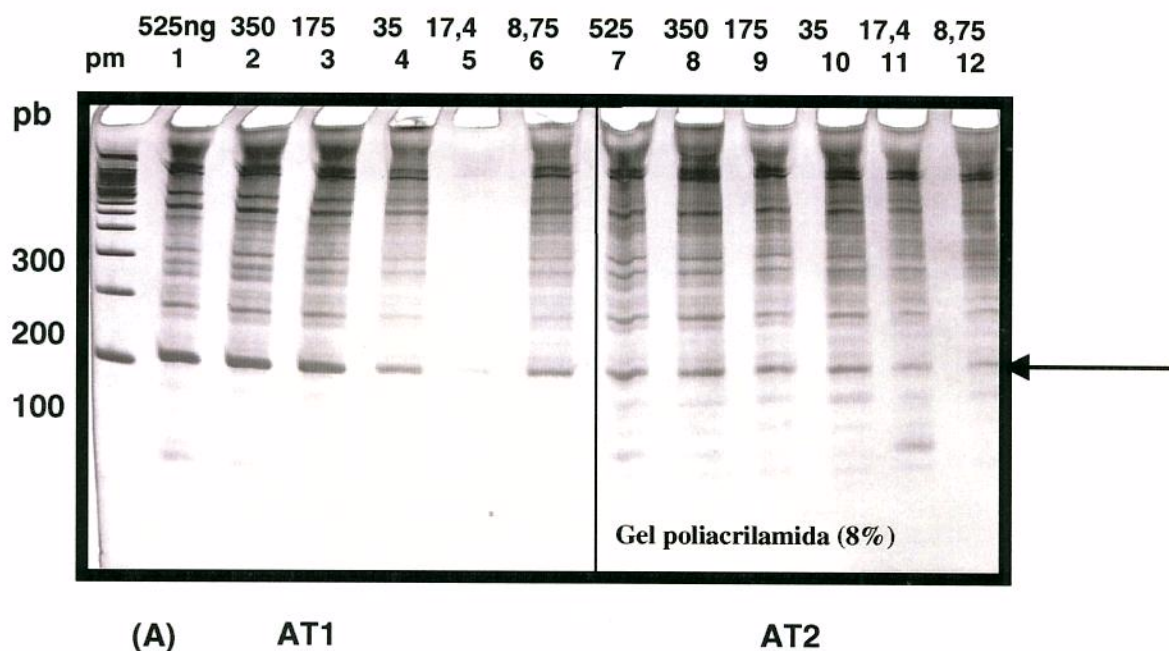
FIGURA 4 – Sequenciamento automático do fragmento TCR V γ -J β de um paciente com Ataxia Teleangiectasia.

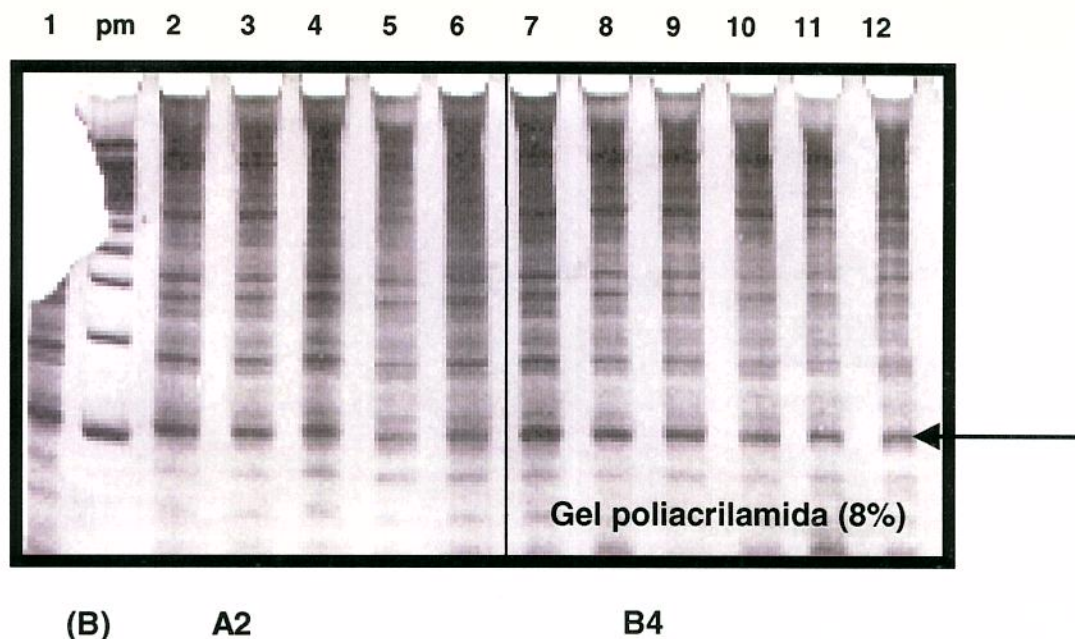
3.4.7. Controle da reação de PCR utilizando diferentes quantidades de DNA dos pacientes

Como controle de funcionamento da PCR, principalmente visando a um controle da ausência de inibição da reação devido às altas concentrações de DNA utilizadas, as amostras também foram amplificadas com iniciadores dirigidos para o gene

codificador da Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase, presente em todas as amostras (Figura 5). Utilizando este controle, permitiu-se, desta forma, determinar as concentrações máximas e mínimas de DNA que poderiam ser utilizadas neste estudo sem que houvesse inibição da PCR. Neste experimento utilizaram-se concentrações de 525 ng, 350ng, 175ng, 35ng, 17.4 ng e 8.75ng para um produto final de 25µl de mix/tubo com os mesmos volumes de dNTP, tampão, polimerase e $MgCl^2$ além de 5 pmols de cada iniciador chamados de GAPDHS e GAPDHA, descritos na tabela III.

A mistura foi submetida a uma ciclagem térmica a 95°C por 3min, 58°C por 1min, 72°C por 2min. Após esta etapa, 30 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 58°C e 30seg a 72°C foram realizados seguidos, de um ciclo final por 1min a 95°C, 1min a 58°C e 5min a 72°C.





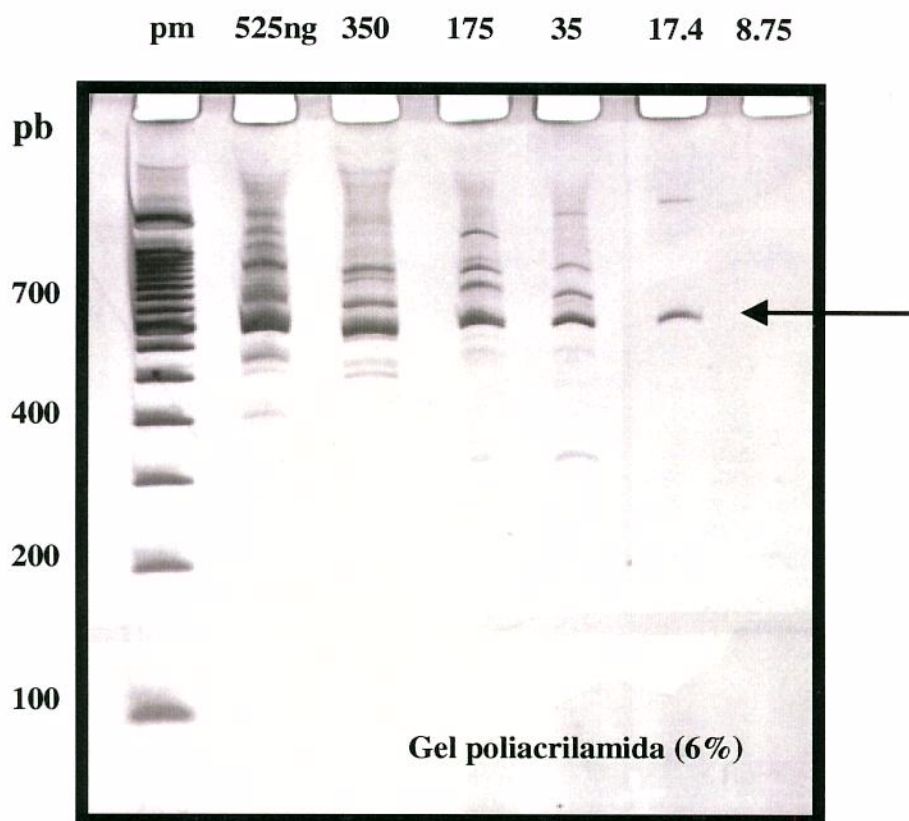
a) Os fragmentos de PCR obtidos a partir do paciente com AT (AT1 e AT2) foram fracionados em gel de poliacrilamida 8% e posteriormente corados pela prata. As reações de PCR foram feitas com diferentes concentrações de DNA (525, 350, 175, 35, 17,4 e 8.75 nanogramas de DNA) utilizando-se na PCR iniciadores para GAPDH. Nas canaletas de 1 a 6 estão aplicados 3 ul/canaleta dos produtos obtidos do paciente AT1 e nas canaletas 7 a 12 do paciente AT2 com concentrações de DNA iniciando com 525ng (canaletas 1 e 7) até 8.75ng (canaletas 6 e 12) dispostos em ordem decrescente de concentração.

b) Os fragmentos de PCR obtidos a partir do paciente sem neoplasia (controle negativo A2) e paciente com leucemia linfocítica aguda (B4). Os produtos da PCR foram fracionados em gel de poliacrilamida 8% e posteriormente corados pela prata. As reações de PCR foram feitas com diferentes concentrações de DNA (525, 350, 175, 35, 17,4 e 8.75 nanogramas de DNA) utilizando-se na PCR iniciadores para GAPDH. Nas canaletas de 1 a 6 estão aplicados 3 ul/canaleta dos produtos obtidos do paciente A2 e nas canaletas 7 a 12 do paciente B4 com concentrações de DNA iniciando com 525ng (canaletas 1 e 6) até 8.75ng (canaletas 6 e 12) dispostos em ordem decrescente de concentração.

FIGURA 5 – Padronização das condições de PCR para amplificação do DNA dos pacientes com ataxia teleangiectasia (AT1 e AT2), paciente sem neoplasia (A2) e paciente com leucemia linfocítica aguda antes do início da quimioterapia (B4)

3.4.8. Investigação da presença do gene híbrido $\nu\gamma/\beta$ para os 210 pacientes do estudo, utilizando as 6 diferentes concentrações de DNA.

Após a verificação feita no experimento anterior, item 3.4.7, e após a confirmação de que era possível utilizar as 6 diferentes concentrações de DNA sem que houvesse inibição da reação, mesmo com altas concentrações de DNA, foram utilizados iniciadores externos e internos para o gene híbrido $V\gamma/J\beta$, amplificando com “Nested PCR” a região de interesse do estudo. Na Figura 6, a seguir, está ilustrado o caso de um paciente com tumor sólido exposto à quimioterapia entre 9 e 12 meses do início do tratamento.

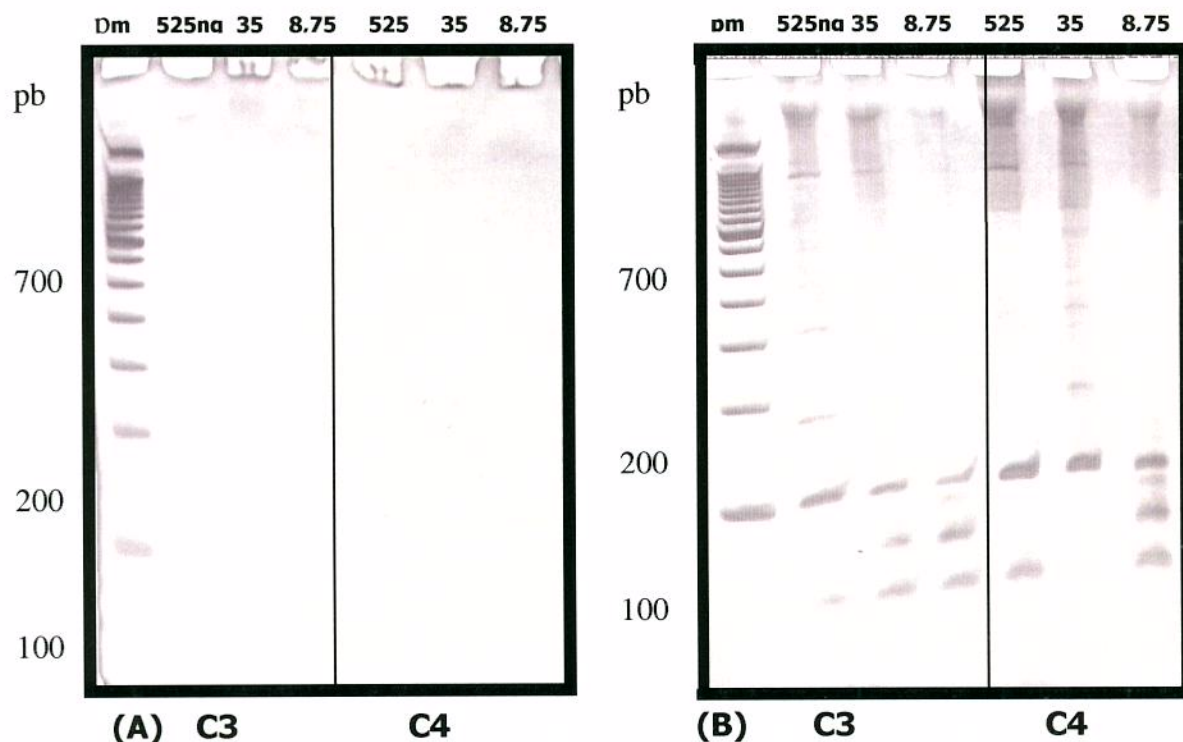


Paciente G5 (sólido 9 a 12 m com QT)

FIGURA 6 – Gel de polyacrilamida (6%) corado pela prata onde se pode visualizar o rearranjo $V\gamma/J\beta$ após DNA amplificado pela técnica de “nested” PCR. Paciente com tumor sólido exposto a quimioterapia entre 9-12 meses do início do tratamento. Os resultados positivos obtidos encontram-se visualizados com as diluições de 525ng, 350, 175, 35 e 17.4ng de DNA. Para este paciente, nenhuma amplificação foi obtida utilizando 8.75ng de DNA.

3.4.9. Controle interno das amostras que não apresentaram a banda de interesse

As amostras que não apresentaram as bandas de interesse chamadas de fragmento TCR V γ /J β , mesmo nas concentrações mais altas de DNA, foram submetidas à PCR com os iniciadores do gene GAPDH, como controle interno da reação e extração do DNA. Desta forma, havendo o aparecimento da banda do gene de GAPDH e não havendo a banda do fragmento TCR V γ /J β confirmávamos não ter havido inibição da PCR ou algum problema com a extração de DNA a partir do sangue do referido paciente. Na figura 7 exemplificamos o controle interno com o produto da PCR do paciente com Tumor Sólido.



(A) Amplificação por "Nested" PCR do fragmento TCR V γ /J β utilizando 3 diferentes quantidades de DNA (maior, menor e intermediária) sem visualização da banda de interesse

(B) Amplificação por PCR do gene GAPDH para confirmação da presença do DNA, utilizando-se as mesmas quantidades de DNA dos mesmos pacientes utilizados na figura A

FIGURA 7 - Controle interno quando o gene híbrido V γ /J β não é visualizado, exemplificado pelos pacientes com LLA ao diagnóstico, sem quimioterapia, designados de B1 e B2.

3.5. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS BANDAS GERADAS COM PRODUTO DE PCR DOS DNAs DOS 210 PACIENTES DO ESTUDO

Cada diluição utilizada foi considerada positiva ou negativa de acordo com a presença ou ausência da banda após a amplificação da segunda PCR. Para cada paciente foram estudadas e analisadas 6 diferentes quantidades de DNA (de 525 ng, 350ng, 175ng, 35ng, 17.4 ng e 8.75ng).

Supondo que a presença de uma banda de produto amplificado representa a existência de um único rearranjo Vy/J β na amostra inicial, foi utilizada para o cálculo da frequência do rearranjo a menor quantidade de DNA que se mostrava positiva, considerando que cada célula contém 6pg de DNA. Obteve-se a quantidade de leucócitos com rearranjo a partir da observação da menor quantidade de DNA em que o rearranjo foi positivo utilizando a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ rearranjo} = \frac{1 \times 100}{\frac{\text{diluição}}{6}}$$

Por exemplo, se a menor quantidade positiva foi de 17,4ng, isto indica uma frequência do rearranjo de $34,48/10^5$ leucócitos do sangue periférico

$$\rightarrow \frac{(6 \times 10^{-3} \times 10^5)}{17,4}$$

$$17,4$$

3.5.1. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram obtidos para os pacientes chamados de controle (sem neoplasia), para os pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) e pacientes com tumor sólido (TS). O grupo de pacientes com LLA foi analisado separadamente em relação ao grupo de TS e o grupo controle foi comparado com ambos os grupos.

Utilizando estatística descritiva, obteve-se a frequência do rearranjo $V\gamma/J\beta$ para cada grupo de pacientes do estudo, a média, a mediana, o intervalo de confiança, os valores mínimos e máximos de leucócitos com rearranjos dentro de cada grupo estudado.

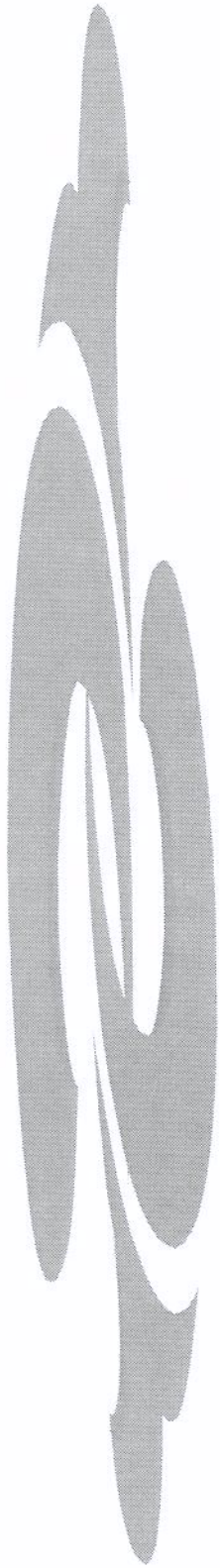
O grupo de pacientes durante a quimioterapia foi comparado com a frequência dos rearranjos pré e pós-quimioterapia separadamente para o grupo de LLA e TS. Esta comparação foi feita utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram feitas através do método Tukey-HSD.

Foram elaborados gráficos que mostram os valores das médias e seus respectivos intervalos de confiança (95%), de acordo com a fórmula a seguir:

$$IC(\bar{X}) = \bar{X} \pm t_{n-1} \cdot \frac{S_x}{\sqrt{n}} = \bar{X} \pm t_{n-1} \cdot SE, \text{ onde } S_x = \text{desvio padrão da}$$

variável, SE é o erro padrão da média e t_{n-1} é o valor crítico de uma distribuição t-studente, com n-1 graus de liberdade e 95% de probabilidade de ocorrência.

Em todas as análises foi utilizado o nível de significância $\alpha=5\%$



4. RESULTADOS

4.1. IDADE DOS PACIENTES NO MOMENTO DA COLETA DE DNA

A média das idades, para os diferentes grupos, considerando-se a data da coleta da amostra para extração de DNA, pode ser observada na Tabela IV.

TABELA IV – Média das idades dos pacientes no momento da coleta de sangue para extração de DNA de acordo com os diferentes grupos.

Grupo	Nº pacientes	Média idade	IC 95%	Idade Mín.	Idade Máx.
Controle	20	8,5	5,47 - 11,67	0,39	18,43
LLA diagnóstico	15	7,0	4,92 – 9,15	2,37	13,59
LLA 3-6 meses de QT	15	5,8	2,67 – 8,97	0,72	16,57
LLA 9-12 meses de QT	15	7,8	4,65 – 11,00	1,07	16,92
LLA 6-12 meses pós Tto	15	8,6	6,64 – 10,55	3,02	13,91
LLA 2-4 anos pós Tto	15	12,2	10,02 – 14,54	7,16	20,42
LLA ≥ 5 anos pós Tto	15	17,8	15,14 – 20,48	9,71	26,45
TS diagnóstico	15	13,0	9,46 – 16,62	0,2800	17,04
TS 3-6 meses de QT	15	14,1	12,09 – 16,11	5,2900	17,17
TS 9-12 meses de QT	15	12,9	10,60 – 15,30	4,7600	19,43
TS 6-12 meses pós Tto	15	14,1	11,57 – 16,68	5,1900	20,90
TS 2-4 anos pós Tto	15	15,8	13,61 – 18,02	7,9100	21,49
TS ≥ 5 anos pós Tto	15	20,0	17,79- 22,34	10,0500	25,27

Para as 20 amostras de crianças, consideradas controle negativo, entre 0 a 20 anos, a média da idade foi de 8,5 anos, sendo que os 10 voluntários foram maiores de 20 anos de idade. Pelo fato de o DNA ter sido retirado do banco, a escolha destas 10 amostras foi aleatória, não sendo possível identificar a idade exata dos doadores. Para os demais grupos, o número de pacientes em cada grupo era igual a 15. Para os pacientes com LLA ao diagnóstico, sem tratamento prévio, a média de idade foi de 7,0 anos. Naqueles com LLA expostos ao tratamento no intervalo entre 3 e 6 meses, a média da idade à época da coleta foi de 5,8 anos. Para aqueles expostos aos quimioterápicos entre 9 e 12 meses, a média foi de 7,8 anos. Os que estavam fora de terapia entre 6 e 12 meses tiveram idade média de 8,6 anos. Aqueles com término do tratamento entre 2 e 4 anos tiveram idade média de 12,2 anos e no grupo com término maior ou igual a 5 anos a média foi de 17,8.

Os pacientes com tumor sólido, em geral, foram mais velhos, devido à diferente faixa de idade de aparecimento destas neoplasias. Ao diagnóstico, os 15 pacientes com TS apresentaram média de idade de 13,0 anos. Para os dois grupos de pacientes com TS expostos aos quimioterápicos, as médias foram 14,1 e 12,9 anos para os períodos de 3 a 6 meses e 9 a 12 meses respectivamente. Para os três grupos pós-término de terapia, as médias foram respectivamente de 14,1, 15,8 e 20,0.

4.2. FREQUÊNCIA DE REARRANJOS DO GENE $V\gamma/J\beta$

Na Tabela V, pode-se observar a frequência de rearranjos para cada grupo de pacientes do estudo. Quando comparados aos controles, os pacientes com tumor sólido sem tratamento apresentaram frequências semelhantes de rearranjo. Embora os pacientes com LLA tivessem uma frequência maior, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A média diferente se deveu a 1 paciente com alta frequência de rearranjo. Nos grupos analisados durante a quimioterapia, a frequência do rearranjo foi maior, tanto para os pacientes com LLA como para os portadores de TS (Figura 8). Nos grupos analisados após o final da quimioterapia, a frequência do rearranjo foi semelhante ao do grupo controle.

Nos grupos de LLA pós-quimioterapia, observou-se, porém, que a frequência foi um pouco maior nos 2 primeiros grupos, retornando a níveis semelhantes aos controles apenas no grupo com 5 ou mais anos do término do tratamento. Embora a diferença para o grupo como um todo não tenha sido significativamente diferente do grupo controle, observou-se, porém, que há entre eles alguns pacientes com frequência alta de rearranjo, semelhantemente ao observado no grupo de pacientes estudados durante a exposição aos quimioterápicos.

TABELA V – Frequência do rearranjo V γ /J β por 10⁵ leucócitos de sangue periférico de acordo com os grupos de pacientes e o período da quimioterapia.

(A) Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e grupo controle (sem neoplasia).

(B) Tumor Sólido (TS) e grupo controle sem neoplasia.

(A)

Grupo	Nº pcts	Média	p*	IC 95% (média)		Mínimo	Máximo	Mediana
				Limite inferior	Limite superior			
Controle	30	1.35		0.88	1.81	0.00	3.43	1,14
LLA pré QT	15	3.08	>0.05	0.80	5.35	0.00	17.14	1,71
LLA QT (3-6m)	15	10.21	<0.05	2.95	17.46	1.71	34.48	3,43
LLA QT (9-12m)	15	13.84	<0.05	5.97	21.70	0.00	34.48	3,43
LLA pós (6-2m)	15	2.20	>0.05	- 0.16	4.57	0.00	17.14	1,14
LLA pós (2-4 anos)	15	3.44	>0.05	-1.38	8.26	0.00	34.48	0,00
LLA pós (>5anos)	15	0.38	>0.05	0,0091	0.75	0.00	1.71	0,00

p* : comparado com grupo controle

(B)

Grupo	Nº pcts	Média	p*	IC 95% (média)		Mínimo	Máximo	Mediana
				Limite inferior	Limite superior			
Controle	30	1.35		0.88	1.81	0.00	3.43	1,14
TS pré QT	15	0.64	>0.05	0.10	1.19	0.00	3.43	0,00
TS- QT (3-6m)	15	9.18	<0.05	-0.60	18.96	0.00	68.57	3,43
TS-QT (9-12m)	15	9.06	<0.05	1.42	16.70	0.00	34.48	1,71
TS pós (6-12mo)	15	1.10	>0.05	0.36	1.84	0.00	3.43	1,14
TS pós (2-4anos)	15	1.06	>0.05	0.42	1.70	0.00	3.43	1,14
TS pós (> 5anos)	15	1.06	>0.05	0.42	1.70	0.00	3.43	1,14

P* : comparado com grupo controle

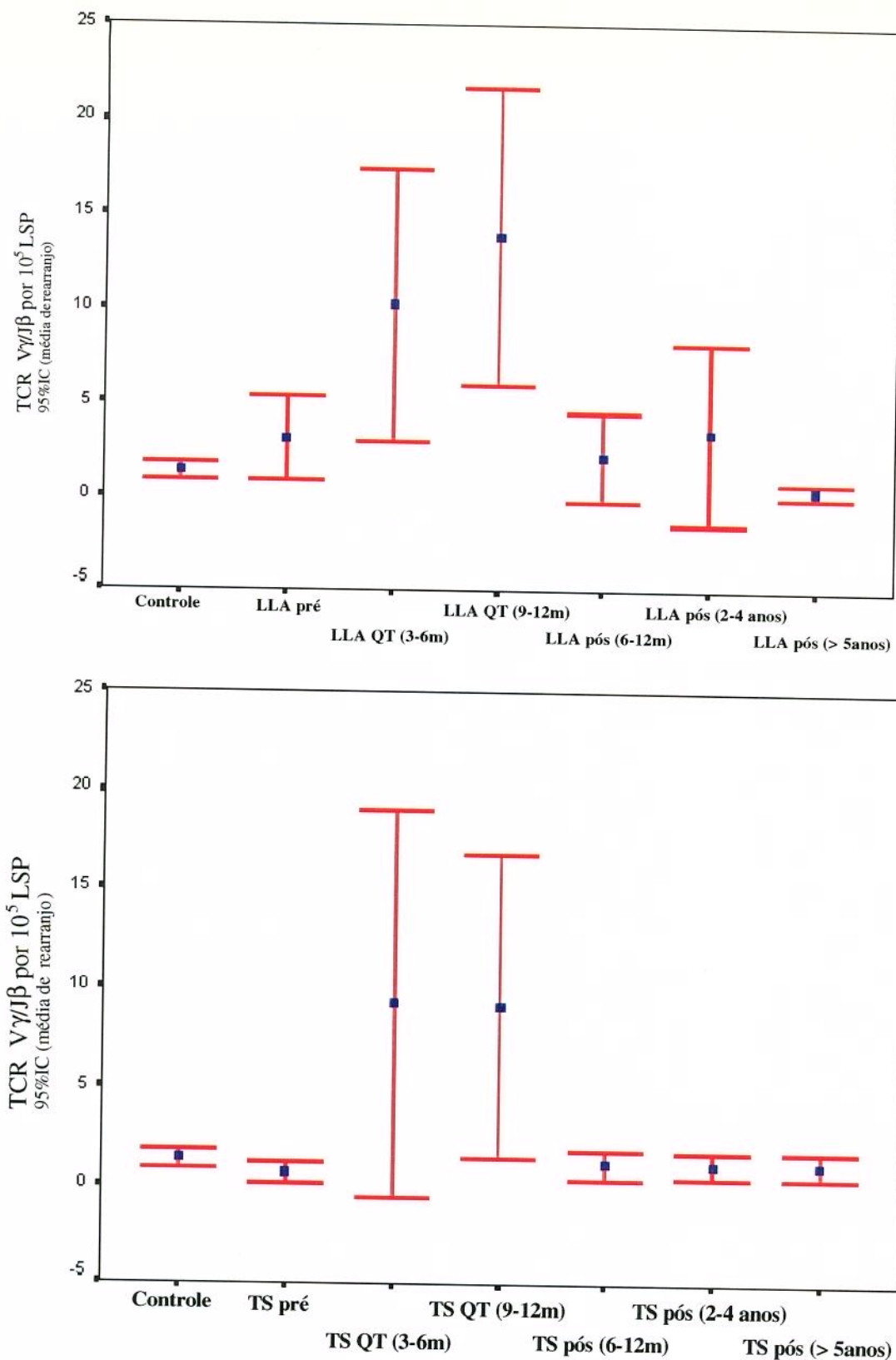
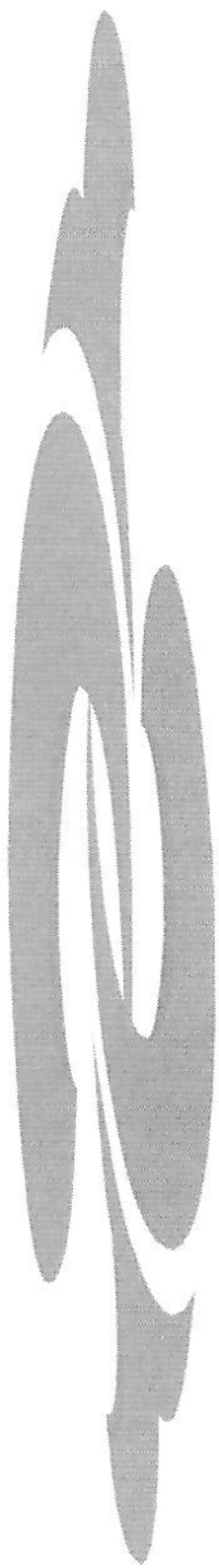


FIGURA 8 – Frequência do rearranjo do gene híbrido VγJβ em linfócitos de sangue periférico dos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) e Tumor Sólido (TS)

4.3. EXPOSIÇÃO AOS ANTRACÍCLICOS E/OU AOS INIBIDORES DA TOPO II E SEGUIMENTO CLÍNICO

Todos os pacientes estudados (dos grupos durante-QT e dos grupos pós-QT) receberam antracíclicos; entretanto, somente 52 pacientes receberam epipodofilotoxinas, sendo 23 com LLA (nenhum deles nos grupos de pacientes durante a quimioterapia), 2 deles do grupo de pacientes pós-término entre 6-12 meses, 9 no grupo de 2 a 4 anos e 12 no grupo após 5 anos ou mais pós-término do tratamento. Para o grupo de TS que recebeu epipodofilotoxinas (29 pacientes), 11 deles estavam no grupo de pacientes durante o tratamento e 7, 8 e 3 respectivamente, após o término do tratamento, de acordo com os grupos.

Dos 45 pacientes estudados com LLA nos grupos pós-término de tratamento (com os DNAs coletados no ano de 1998), todos têm um período de observação de 2 a 3 anos (da data da coleta de DNA até novembro de 2000). Apenas um destes pacientes teve recaída e morreu. Todos os outros encontram-se vivos, com contagem sangüínea normal e sem evidências de neoplasia secundária.



5. DISCUSSÃO

5.1. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DA REVELAÇÃO PELA PRATA EM SUBSTITUIÇÃO À TÉCNICA DE SOUTHERN-BLOT.

A análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) é realizada rotineiramente em gel de agarose. Uma alternativa, entretanto, é a revelação pela prata em gel de poliacrilamida, que é cerca de 100 vezes mais sensível e pode detectar maior número de cópias. Submetemos as amostras dos pacientes com ataxia teleangiectasia à eletroforese em gel de poliacrilamida, posteriormente corado pela prata. Nosso objetivo nesta etapa da padronização era comparar ambas as técnicas. A conclusão obtida com este experimento foi que, para os pacientes com AT, foi possível visualizar o rearranjo de interesse com o método de gel de poliacrilamida revelado pela prata, como foi desenvolvido por SANGUINETTI et al(1994), sem prejuízo em relação ao experimento feito com gel de agarose corado com brometo de etídio e hibridizado pela técnica de Southern-Blot, amplamente divulgado na literatura e proposta para a visualização do gene híbrido $V\gamma/J\beta$. Deste passo em diante, todos os DNAs dos pacientes pediátricos de todos os grupos do estudo foram amplificados e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e corados pela prata, reduzindo o tempo de experimento, evitando o manuseio de material radioativo e maior rapidez de resultados. De acordo com o que se conhece, este é o primeiro trabalho que utiliza tal técnica para o estudo da frequência do gene híbrido $V\gamma/J\beta$.

5.2. ESTUDO DO GENE HÍBRIDO $V\gamma/J\beta$ E QUIMIOTERAPIA

Lesões genéticas que ocorrem em indivíduos expostos a agentes químicos ou físicos foram descritas, entre outros, por LEVINE & BLOOMFIELD (1992) e por TATES et al (1994). Pacientes com câncer, recebendo tratamento quimioterápico, estão expostos a altas doses de drogas citotóxicas que muitas vezes são também genotóxicas. Estes pacientes tratados com quimioterapia têm um risco maior de desenvolver câncer secundário alguns anos depois da exposição às drogas quimioterápicas (SMITH et al, 1994; van LEEUWEN et al, 1994 ; WOLDEN et al, 1998).

Adriamicina (ADRIA) é uma potente droga anti-tumoral, bastante utilizada no tratamento oncológico. Ela interage com os ácidos nucleicos e as membranas celulares. O mecanismo molecular envolvido, entretanto, é ainda desconhecido mas, freqüentemente é descrita como sendo responsável por induzir a quebra na dupla hélice de DNA. As epipodofilotoxinas, representadas mais freqüentemente pelos quimioterápicos VP-16 e VM-26, têm um modo de ação semelhante. As epipodofilotoxinas são descritas e conhecidas por provocar, por si sós, danos extensos ao DNA, levando a deleções e/ou rearranjos (BERGER et al, 1991 ; HAN et al., 1993 ; RELLING et al, 1998). CHEN et al (1996) descreveram deleções específicas que ocorrem após o uso de drogas da família dos inibidores de Topo II, tais como do gene *hprt*, que é mediado pela ação da V(D)J recombinase. Segundo estes autores, estas deleções ocorrem em sítios conhecidos e bastante específicos do DNA. Estudos clínicos com pacientes adultos e pediátricos tratados com epipodofilotoxinas e observados por longo período de tempo sugerem que estas drogas são responsáveis pelo aparecimento de leucemias secundárias, freqüentemente mielóides, chamadas de t-AML (PUI et al, 1991 ; SMITH et al, 1994). Níveis de lesões ocorridas em células do sangue (linfócitos ou não), mediadas pela ação da V(D)J recombinase, foram estudadas em pacientes pediátricos com LLA tratados no Hospital St Judas e descritas por FUSCOE et al (1998). Este estudo mostrou (através de linfócitos do sangue periférico) que a freqüência de translocação t (14;18) encontrada antes do tratamento era pequena. Durante o tratamento não houve aumento desta alteração cromossômica, sugerindo que a droga quimioterápica etoposide (VP16) não foi responsável por produzir rearranjos genômicos nestes pacientes. Contrariando estes dados, outros autores estudaram a mutagênese em pacientes tratados com etoposide e alguns resultados alertaram para o fato de que esta droga levava a mutações, alterações em micronúcleos ou até recombinações anormais mediadas pela V(D)J recombinase (ABDALLAH et al, 1995).

Pacientes adultos portadores de tumor de pulmão que receberam etoposide foram estudados por KARNAOUKHOVA et al (1997) para a investigação da freqüência de mutações do gene *hprt*. Foram colhidas amostras de sangue antes, durante e após a exposição ao quimioterápico e os resultados mostraram que não houve aumento significativo da freqüência de mutações do gene estudado. Em nossos pacientes, entretanto, ao analisar a freqüência de rearranjos do gene $V\gamma/J\beta$, verificamos que os pacientes apresentavam aumento

da frequência deste gene enquanto expostos ao tratamento quimioterápico. Todos os pacientes com LLA ou TS, em que o DNA foi colhido na fase de tratamento, receberam doses maiores ou menores de ADRIA e/ou DAUNO, enquanto somente os pacientes com TS nesta fase receberam epipodofilotoxinas VM-26 e/ou VP-16.

Leucemias secundárias mielóides (t-LMA) que ocorreram após tratamento com Cisplatina-CDDP (Cis-Diamminedichloroplatinum-II) têm sido mais frequentemente descritas na literatura em pacientes pediátricos com osteossarcoma. JEHA et al (1992) descreveram 66 pacientes tratados no “M.D.Anderson Cancer Center” com CDDP/ADRIA ou CDDP/CICLO. Dois pacientes apresentaram leucemia secundária tipo mielóide. Entre estes 66 pacientes, a dose acumulada de CDDP variou de 150 a 3.000 mg/m². A dose dos dois pacientes que desenvolveram leucemia foi de 900 mg/m² e 1.500 mg/m². De acordo com estes autores, a CDDP é considerada como tendo atividade alquilante, muito embora se conheça pouco o mecanismo que provocaria estas leucemias. Também utilizando a CDDP, REED et al (1996) descreveram que o aumento de “adducts” no DNA é proporcional ao aumento da dose de CDDP recebida.

Pacientes com tumores de células germinativas, câncer de pulmão ou ovariano, tratados com esquemas quimioterápicos que contêm CDDP e estudados após vários anos do término do tratamento e que desenvolveram t-LMA, foram descritos por RATAIN et al (1987) e por CHAMBERS et al (1989).

Leucemias secundárias após a utilização de Ciclofosfâmida (CICLO) também têm sido relatadas, porém, o risco é descrito como menor, em comparação com outros alquilantes. O efeito leucemogênico da CICLO é descrito como dependente das doses acumuladas da droga. SMITH et al (1999) descrevem que pacientes com câncer de mama que receberam doses regulares de CICLO como tratamento coadjuvante não mostraram maior risco de leucemia e/ou mielodisplasia quando comparados com a população controle. Já CURTIS et al (1992) haviam descrito anteriormente que quando a dose acumulada era maior que 20gr, o risco de leucemia secundária era 5,7 vezes maior. CUTULI et al (2000), estudando 121 pacientes francesas com câncer de mama, descrevem vários protocolos em que a CICLO era droga integrante da maioria dos esquemas utilizados, sempre em doses regulares. Estes autores descrevem pacientes que desenvolveram mielodisplasia e leucemias

(linfocíticas e não linfocíticas) mostrando que o tempo médio para o aparecimento destas alterações hematológicas secundárias foi de 37 meses, enquanto as pacientes que não receberam quimioterapia, também portadoras de câncer de mama mas que receberam outra modalidade de tratamento diferente da quimioterapia, tal como radioterapia, também as desenvolveram e o tempo médio de aparecimento foi de 65 meses. Pacientes pediátricos portadores de rabdomiossarcoma foram estudados por SCARADAVOU et al (1995). Três casos de leucemia secundária foram descritos entre 68 pacientes que receberam dose de CICLO maior que $16,8\text{g/m}^2$ enquanto nenhum caso foi observado entre 62 pacientes tratados com dose menor. MISER et al (1997) descreveram 5 crianças com leucemia secundária, observando 60 pacientes pediátricos que receberam altas doses de Ifosfamida e Ciclofosfamida associadas a etoposide e doxorubicina. O Intergroup Rhabdomyosarcoma Study III, descrito por Smith e cols. utilizaram doses cumulativas de Ciclofosfamida entre 25 a 35g/m^2 (com doses equivalentes de Ifosfamida).

Em nosso estudo, pacientes com tumor sólido eram portadores de linfoma de Hodgkin, osteossarcoma, sarcoma de Ewing ou rabdomiossarcoma. Todos os pacientes com sarcoma de Ewing receberam altas doses de ciclofosfamida, assim como vincristina e adriamicina. Pacientes com osteossarcoma foram tratados com altas doses de MTX/CDDP/ADRIA (methotrexate / cisplatina / adriamicina) entre 1985-1989. A dose cumulativa de MTX foi de 144g/m^2 , CDDP 840mg/m^2 e ADRIA 210mg/m^2 . No período de 1994-1995 os pacientes foram tratados com IFO/ADRIA/CDDP/VP-16. A dose cumulativa foi de 54g/m^2 para IFO (ifosfamida), 375mg/m^2 para ADRIA, 720mg/m^2 para CDDP e 2.7g/m^2 para VP16. Durante o período de 1997-1999 o tratamento utilizado foi IFO / ADRIA / CARBO / CDDP com doses cumulativas de 45g/m^2 para IFO, 360mg/m^2 para ADRIA, 2.5g/m^2 para CARBO (carboplatina) e 500mg/m^2 para CDDP. Pacientes com rabdomiossarcoma foram tratados por 50 semanas utilizando-se VAC quando eram não metastáticos ou VAC + IFO / ADRIA / VP16 se metastáticos ou com doença parameningea. A dose cumulativa de ADRIA foi de 360mg/m^2 , IFO 81g/m^2 e VP-16, 2g/m^2 . Para a maioria dos protocolos acima descritos, a dose acumulada dos diferentes tipos de quimioterápicos estava dentro da dose habitual. Para o quimioterápico Ifosfamida, os esquemas foram de altas dosagens porque as doses chegaram até a 81g/m^2 , como por exemplo no protocolo de osteossarcoma no período de 1997-1999 em que a dose foi de 45g/m^2 ou nos

rabdomiossarcomas, cuja dose acumulada foi de 81 gr/m². A dose elevada de CDDP foi feita para os pacientes com osteossarcoma tratados no período de 1985 a 1989, cuja dose máxima chegou a 840mg/m².

Trabalhadores rurais que viviam no cinturão “leucemia-linfoma” e que trabalhavam no sudoeste de Minnesota ou no noroeste de Iowa, nos Estados Unidos, foram estudados por LIPKOWITZ et al (1992). Estes autores encontraram um aumento transitório de um gene recombinante nestes pacientes expostos a herbicidas e pesticidas. O aumento observado foi correlacionado ao grau de exposição a estes agentes. Quando comparados estes agricultores com grupo controle, os autores observaram aumento da frequência do rearranjo 15 a 30 vezes maior entre o grupo exposto aos agentes tóxicos. Estes mesmos agricultores mostraram uma frequência 3 a 7 vezes maior de desenvolver doença maligna de linhagem linfóide. Recentemente BUCKLEY et al (2000) publicaram estudo mostrando correlação entre exposição materna a pesticidas e filhos com Linfoma Não-Hodgkin de células T e células B. Os autores mostraram que, quando as mães foram expostas a pesticidas para uso doméstico diariamente, houve um risco de 7,3. Quando expostas durante dedetização doméstica, de forma esporádica, o risco foi de 3,0.

ABDALLAH et al (1995) estudaram a frequência do gene *V γ /J β* encontrado no receptor de células T dos pacientes portadores de Doença de Hodgkin. O gene foi procurado no sangue periférico dos pacientes antes, durante e após o tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia. O gene *V γ /J β* encontrado foi chamado pelos autores de rearranjo-trans uma vez que o que se observou no estudo foi uma incidência aumentada deste rearranjo de forma transitória, sendo observado mais frequentemente durante o tratamento. Após 1 a 5 meses do final do tratamento, a frequência do gene *V γ /J β* voltava a índices normais.

Em nosso estudo observamos um aumento transitório da frequência do gene *TCR β / γ* para os pacientes portadores de LLA e TS quando o DNA foi colhido durante o período em que estavam recebendo quimioterapia. Os pacientes foram subdivididos entre um período de exposição às drogas entre 3 a 6 meses e um grupo entre 9 a 12 meses de exposição. Encontramos uma frequência de rearranjo semelhante entre estes subgrupos tanto para pacientes com LLA quanto com TS. Nestes pacientes acima descritos, todos receberam

antraciclina. Entretanto, em nosso estudo, não temos como correlacionar seu uso aos achados de rearranjos. Os inibidores da Topo II não foram utilizados para os pacientes com LLA em que o DNA foi colhido no período durante a QT (3 a 6 meses ou 9 a 12 meses) mas assim o foram para os pacientes com TS. Apesar do grupo de LLA não ter recebido inibidores da Topo II e o grupo de TS sim, encontramos frequência de rearranjos do gene $V\gamma/J\beta$ semelhante em ambos os grupos. Para os grupos analisados depois do término do tratamento, desde 6 meses do término até 4 anos, a frequência do gene $V\gamma/J\beta$ dos pacientes que receberam inibidores da Topo II também foi similar entre o grupo de LLA e TS. Deste modo, tanto alquilantes quanto inibidores da Topo II foram capazes de aumentar a frequência do gene híbrido $V\gamma/J\beta$.

Nos pacientes estudados pós-término de tratamento há 5 anos ou mais, os inibidores da Topo II foram utilizados para a maioria dos pacientes com LLA e somente para 3 dos 15 pacientes do grupo de TS. A frequência do gene $V\gamma/J\beta$ encontrada nos grupos acima descritos não pode ser diretamente atribuída ao fato de haver maior ou menor número de pacientes que utilizaram os inibidores de Topo II. No entanto, os nossos achados são semelhantes aos de Lipkowitz, de Buckley e de Abdallah onde, durante a exposição, há aumento da frequência do gene $V\gamma/J\beta$, o que parece ser transitório, mas, no entanto, mesmo cessada a exposição, há mais tarde um aumento ocorrência de leucemias agudas e linfomas. É de se esperar que no nosso grupo estudado também venha a ocorrer uma frequência maior de neoplasias secundárias. Por isso pretendemos observar nossos pacientes por um período de 5 a 10 anos.

A ocorrência de leucemias secundárias em pacientes pediátricos estudados após o tratamento utilizando agentes alquilantes foi descrita na literatura pelo "Late Effects Study Group" por TUCKER et al (1987). Estes estudiosos publicaram uma casuística de 22 crianças com leucemia após 2 ou mais anos do término do tratamento entre 9.170 crianças com câncer. O tratamento com alquilantes foi associado a um risco de aparecimento de leucemias de 4.8 com intervalo de confiança de 95% de 1.2-18.9. A radioterapia, neste grupo estudado, não mostrou aumento no risco de leucemias secundárias. Neste estudo de coorte, os autores mostraram maior risco de leucemias secundárias para pacientes mais velhos, o que poderia ser explicado pelo aumento das doses de antracíclicos proporcionalmente utilizados. De forma semelhante, neste mesmo grupo, os antracíclicos

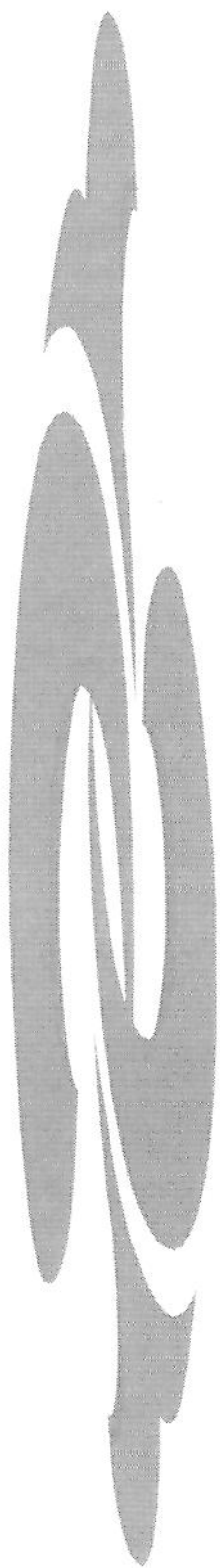
podem ser os responsáveis pelo aparecimento de leucemias secundárias entre os pacientes portadores de doença de Hodgkin e Sarcoma de Ewing.

MEYDAN et al (1999) estudaram a presença do gene *V γ /J β* , chamado por estes autores de gene “*TCR β / γ ilegítimo*”. Os autores correlacionaram a frequência deste gene com idade, exposição ocupacional, tratamento citostático, presença da translocação t(14;18) e com a mutação do gene *hprt*. Em nosso estudo, a idade da coleta de DNA, na maioria dos pacientes estudados, se situou abaixo da idade citada nesse trabalho.

Van LEEUWEN et al (2000) estudaram 1.253 pacientes abaixo de 40 anos tratados entre 1966 e 1986 na Holanda. Abaixo de 20 anos, foram estudados 326 pacientes e entre eles o número de pacientes com leucemia secundária foi de 18, sendo 15 delas t-LMA. O risco relativo foi de 37.5 (95% IC: 22.2-59.2) e 66.7 (95% IC: 37.4-110) respectivamente.

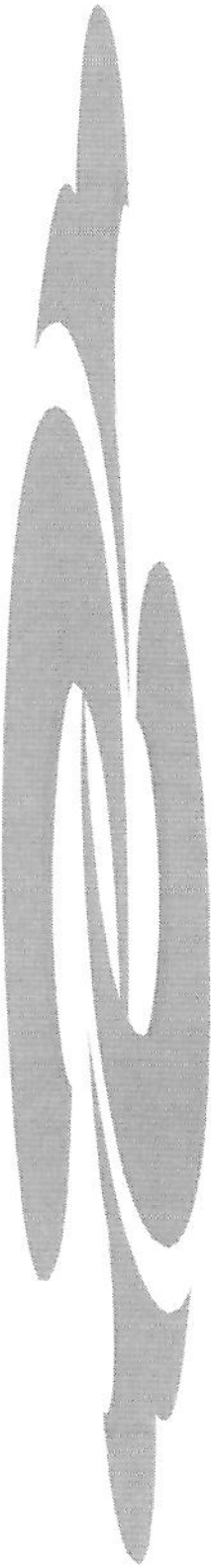
Leucemias secundárias associadas à exposição de VP16 foi associada à intensidade da dose utilizada (PUI et al, 1991; PEDERSEN-BJERGAARD et al., 1991) assim como à utilização em dose “standard” (NICHOLS et al, 1993). Nichols e cols. trataram pacientes com tumores de células germinativas e observaram 2 pacientes que desenvolveram leucemia secundária entre 315 pacientes tratados. A dose cumulativa de VP16 variou entre 1500-2000 mg/m² e foram associadas ao uso de CDDP e Ifosfâmina ou Bleomicina.

Em nossos pacientes, em todos os grupos estudados, desde a coleta de DNA até a presente data, passaram-se 2 anos. Nenhum deles desenvolveu mielodisplasia ou leucemia aguda neste período, que é ainda bastante curto. Nosso planejamento para estes pacientes é prolongar o período de observação, com estudo longitudinal destes casos, principalmente para aqueles pacientes em que a frequência de rearranjo foi elevada.



6. CONCLUSÕES

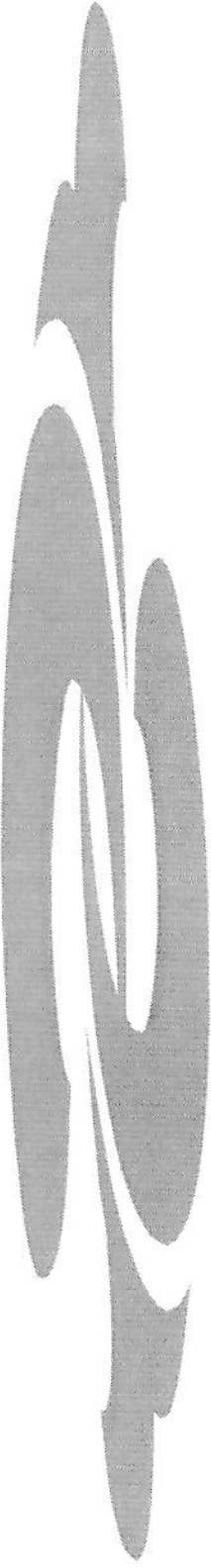
1. O método que utiliza gel de poliacrilamida corado pela prata pode substituir plenamente o método clássico do gel de agarose corado com brometo de etídio e hibridizado pela técnica de Southern-Blot, sem prejuízo dos resultados e com a vantagem de ser mais rápido, de menor custo e da não-necessidade de utilização de material radioativo.
2. Os resultados de nosso estudo indicam que os pacientes apresentaram instabilidade gênica onde a presença de gene híbrido $V\gamma/J\beta$ pôde ser observada, em frequência mais elevada durante a fase de tratamento com quimioterapia.



7. SUMMARY

LOPES LF GENETIC INSTABILITY: ILLEGITIMATE *GAMA/BETA* (γ/β) GENE IN PATIENTS EXPOSED TO CHEMOTHERAPY.

The frequency of the hybrid $V\gamma/J\beta$ trans-rearrangement in peripheral blood lymphocytes (PBL) was analysed in a transversal study of pediatric patients (n=210) with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and solid tumours (ST). Different amounts of DNA were used as template for a nested PCR in order to evaluate the frequency of hybrid $V\gamma/J\beta$ genes, using silver-stained gels. The frequency of the rearrangement was evaluated in groups before, during and after therapy. A greatly increased frequency of $V\gamma/J\beta$ trans-rearrangement was found in PBL of both groups of patients during exposure to chemotherapeutic agents as compared to patients before chemotherapy. In patients that had finished treatment, the frequency of the rearrangement fell promptly to the baseline levels in ST but showed a slow decrease in ALL, where increased levels could be found until 4 years after the end of treatment. We hypothesize that the chemotherapeutic agents are able to induce the $V\gamma/J\beta$ trans-rearrangement, but this is transient in most cases. It remains to be determined the exact relation between the persistence of the rearrangement and the occurrence of secondary leukemia.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDALLAH JM, LOMBARDI DP, KIRSCH IR. Genetic instability in patients with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *J Clin Invest* 1995; 96:2744-2747.
2. ADAMS JM, GERONDAKIS S, WEBB E, CORCORAN LM, CORY S. Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:1982-1986.
3. ALAVANJA, MC, BLAIR A, MASTERS MN. Cancer mortality in the U.S. flour industry. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:840-848.
4. ANDRIEU JM, IFRAH N, PAYEN C, FERMANNIAN J, COSCAS Y, FLANDRIN G. Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1990; 8:1148-1154.
5. AURIAS A, COUTURIER J, DUTRILLAUX AM, DUTRILLAUS B, HERPIN F, LAMOLIATTE E, LOMBARD M, MULERIS M, PARAVOTOU M, PRIEUR M. Inversion (14)(q12qter) or (q11.2q32.3): the most frequently acquired rearrangement in lymphocytes. *Hum Genet* 1985; 71:19-21.
6. BAER R, CHEN KC, SMITH SD, RABBITTS TH. Fusion of an immunoglobulin variable gene and a T cell receptor constant gene in the chromosome 14 inversion associated with T cell tumors. *Cell* 1985; 43:705-713.
7. BAER R, FORSTER A, RABBITTS TH. The mechanism of chromosome 14 inversion in a human T cell lymphoma *Cell* 1987; 50:97-105.
8. BEGLEY CG, APLAN PD, DAVEY MP, NAKAHARA K, TCHORZ K, KURTZBERG J, HERSHFIELD MS, HAYNES BF, COHEN DI, WALDMANN TA, KIRSCH IR.. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2031-2035.

9. BERGER NA, CHATTERJEE S, SCHMOTZER JA, HELMS SR. Etoposide (VP-16-213)-induced gene alterations: potential contribution to cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 33:8740-8743.
10. BLAIR A, MALKER H, CANTOR KP, BURMEISTER L, WIKLUND K Cancer among farmers. A review. *Scand J Work Environ Health* 1985; 11:397-407.
11. BLAYNEY DW, LONGO DL, YOUNG RC, GREENE MH, HUBBARD SM, POSTAL MG, DUFFEY PL, DEVITA VT. Decreasing risk of leukemia with prolonged follow-up after chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1987; 316:710-714.
12. BLIN N, STAFFORD DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3:2303-2308.
13. BODER E. Ataxia-teleangiectasia: an overview. In: Gatti RA, Swift M, editors. *Ataxia teleangiectasia: genetics, neuropathology and immunology of a degenerative disease of childhood*. New York: Alan Liss; 1985. p.1-63.
14. BOEHM T, RABBITTS TH. The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *FASEB J* 1989; 3:2344-2359.
15. BOIVIN JF, HUTCHISON GB, LYDEN M, GODBOLD, CHOROSH J, SCHOTTENFELD D. Secondary primary cancers following treatment of Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:233-241.
16. BOYUM A. Isolation of molecular cells and granulocytes from human blood: isolation of molecular cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; Suppl 97:77-89.
17. BRANDALISE S, ODONE V, PEREIRA W, ANDREA M, ZANICHELLI M, ARENEGA V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. *Leukemia* 1993; 7 suppl 2:S142-S145.

18. BROWN LM, BLAIR A, GIBSON R, EVERETT GD, CANTOR KP, SCHUMAN LM, BURMEISTER LF, VAN LIER SF, DICK F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 1990; 50:6585-6591.
19. BUCKLEY JD, MEADOWS AT, KADIN ME, LE BEAU MM, SIEGEL S, ROBISON LL. Pesticide Exposures in Children with Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer* 2000; 89:2315-2321.
20. CANELLOS GP, ANDERSON JR, PROPERT KJ, NISSEN N, COOPER MR, HENDERSON ES, GREEN MR, GOTTLIEB A, PETERSON BA. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med* 1992; 327:1478-1484.
21. CARRIER F, FORNACE JR AJ. IN: BERTINO JR, editor. *Encyclopedia of cancer*. San Diego: Academic Press; 1997. p.100-111.
22. CHAMBERS SK, CHOPYK RL, CHAMBERS JT, SCHWARTZ PE, DUFFY TP. Development of leukemia after Doxorubicin and Cisplatin treatment of ovarian cancer. *Cancer* 1989; 64:2459-2461.
23. CHEN CL, FUSCOE JC, LIU Q, PUI CH, MAHMOUD HH, RELLING MV. Relationship between cytotoxicity and site-specific DNA recombination after in vitro exposure of leukemia cells to etoposide. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1840-1847.
24. CHEN CL, FUSCOE JC, LIU Q, RELLING MV. Etoposide causes illegitimate V(D)J recombination in human lymphoid leukemic cells. *Blood* 1996; 88:2210-2218.
25. CHEN CS, SORENSEN PH, DOMER PH, REAMAN GH, KORSMEYER SJ, HEEREMA NA, HAMMOUND GD, KERSEY JH. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993; 81:2386-2393.

26. CIMINO G, LO COCO, BIONDI A, ELIA L, LUCIANO A, CROCE CM, MASERA G, MANDELLI F, CANAANI E. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993; 82:544-546.
27. CURTIS RE, BOICE JD JR, STOVALL M, BERNSTEIN L, GREENBERG RS, FLANNERY JT, SCHWARTZ AG, WEYER P, MOLONEY WC, HOOVER RN. Risk of leukemia after chemotherapy and radiation treatment for breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1745-1751.
28. CUTULI B, JANVIER M, DE LA ROCHEFORDIERE A, JULIEN JP, ISAMBERT N, ALZIEU C, KERBRAT P, DE LAFONTAN B, VAN LEMMENS L, CURÉ H, GANEM G, BAUME D, LE MEVEL A, LORTHORALY A, DE GISLAIN C, MARCHAL C, CHEVELLE C, LAUCHE H, SERIN D. Leucémies et états préleucémiques survenus après traitement d'un cancer du sein. *Presse Medicale* 2000; 29:135-138.
29. DAVIES SM. Function of Topoisomerase II and the consequences of Inhibition. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27 Suppl 1:12-19.
30. DAVODEAU F, PEYRAT MA, GASCHET J, HALLET MM, TRIEBEL F, VIE H, KABELITZ D, BONNEVILLE M. Surface expression of functional T-cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T-lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 180:1685-1691.
31. DE BENEDETTI V, BENNETT WP, GREENBLATT MS, HARRIS CC. p53 Tumor suppressor gene: implications for iatrogenic cancer and cancer therapy. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27 Suppl 1:2-11.
32. DENNY CT, HOLLIS GF, HECHT F, MORGAN R, LINK MP, SMITH SD, KIRSCH IR. Common mechanism of chromosome inversion in B-and-T-cell tumors: relevance to lymphoid development. *Science* 1986; 234:197-200.

33. DENNY CT, YOSHIKAI Y, MAK TW, SMITH SD, HOLLIS GF, KIRSCH IR. A chromosome 14 inversion in a T-cell lymphoma is caused by site-specific recombination between immunoglobulin and T-cell receptor loci. *Nature* 1986; 320:549-551.
34. DEVEREUX S, SELASSIE G, VAUGHAN HUDSON G, LINCH DC. Leukaemia complicating treatment for Hodgkin's disease: the experience of the British National Lymphoma Investigation. *Br Med J* 1990; 301: 1077-1080.
35. FUSCOE JC, KNAPP GW, HANLEY NM, SETZER RW, SANDLUND JT, PUI CH, RELING MV. The frequency of illegitimate V(D)J recombinase-mediated mutations in children treated with etoposide-containing antileukemic therapy. *Mutat Res* 1998; 419:107-121.
36. FUSCOE JC, SETZER RW, COLLARD DD, MOORE MM. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis* 1996; 17:1013-1020.
37. FUSCOE JC, VIRA LK, COLLARD DD, MOORE MM. Quantification of *hprt* gene deletions mediated by illegitimate V(D)J recombination in peripheral blood cells of humans. *Environ Mol Mutagen* 1997; 29:28-35.
38. FUSCOE JC, ZIMMERMAN LJ, HARRINGTON-BROCK K, BURNETTE L, MOORE MM, NICKLAS JÁ, O'NEILL P, ALBERTINI RJ. V(D)J recombinase-mediated deletion of the *hprt* gene in T-lymphocytes from adult humans. *Mutat Res* 1992; 283:13-20.
39. GARRY VF, GRIFFITH J, DANZL TJ, NELSON RL, WHORTON EB, KRUEGER LA, CERVENKA J. Human genotoxicity: pesticide applicators and phosphine. *Science* 1989; 246:251-255.
40. GATTI RA, GOOD RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971; 28: 89-98.

41. GLICKSMAN AS, PAJAK TF, GOTTLIEB A, NISSEN N, STUTZMAN L, COOPER MR. Second malignant neoplasms in patients successfully treated for Hodgkin's disease: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Treat Rep* 1982; 66:1035-1044.
42. GREENE MH, BOICE JD, GREER BE, BLESSING JA, DEMBO AJ. Acute non-lymphocytic leukemia after therapy with alkylating agents for ovarian cancer: a study of five randomized clinical trials. *N Engl J Med* 1982; 307:1416-1421.
43. GRIESSER H, TKACHUK D, REIS MD, MAK TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood* 1989; 73:1402-1415.
44. GU Y, NAKAMURA T, ALDER H, PRASAD R, CANAANI O, CIMINO G, CROCE CM, CANNANI E. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax* to the AF-4 gene. *Cell* 1992; 71:701-708.
45. HAN YH, AUSTIN MJ, POMMIER Y, POVIRK LF. Small deletion and insertion mutations induced by the topoisomerase II inhibitor teniposide in CHO cells and comparison with sites of drug-stimulated DNA cleavage in vitro. *J Mol Biol* 1993; 220:52-66.
46. HECHT, F. HECHT BK, KIRSCH IR. Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 26:95-104.
47. HENRY-AMAR M, DIETRICH PY. Acute leukemia after the treatment of Hodgkin's disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7:369-387.
48. HOAR S, BLAIR A, HOLMES FF, BOYSEN CD, ROBEL RJ, HOOVER R, FRAUMENI JF JR. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. *J Am Med Assoc* 1986; 256:1141-1147.
49. HSIEH CL, ARLETT CF, LIEBER MR. V(D)J recombination in ataxia-telangiectasia, Bloom's syndrome, and a DNA ligase I-associated immunodeficiency disorder. *J Biol Chem* 1993; 268: 20105-9.

50. HUDSON MM, DONALDSON SS. Treatment of pediatric Hodgkin's Lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36:313-323.
51. JEHA S, JAFFE N, ROBERTSON R. Secondary acute non-lymphoblastic leukemia in two children following treatment with a Cis-Diamminedichloroplatinum-II-based regimen for osteosarcoma. *Med Pediatr Oncol* 1992; 20:71-74.
52. KALDOR JM, DAY NE, BAND P, CHOI NW, CLARKE EA, COLEMAN MP, HAKAMA M, KOCH M, LANGMARK F, NEAL FE, PETTERSSON F, POMPE-KIRN V, PRIOR P, STORM HH. Second malignancies following testicular cancer, ovarian cancer and Hodgkin's disease: an international collaborative study among cancer registries. *Int J Cancer* 1987; 39:571-585.
53. KALDOR JM, DAY NE, CLARKE EA, VAN LEEUWEN FE, HENRY-AMAR M, FIORENTINO MV, BELL J, PEDERSEN D, BAND P, ASSOULINE D, KOCK M, CHOI W, PRIOR P, BLAIR V, LANGMARK F, KIRN VP, NEAL F, PETERS D, PFEIFFER R, KARJALAINEN S, CUZICK J, SUTCLIFFE SB, SOMERS R, PELLAE-COSSET B, PAPPAGALLO GL, FRASER P, STORM H, STOVALL M. Leukemia following Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1990; 322: 7-13.
54. KARNAOUKHOVA L, MOFFAT J, MARTINS H, GLICKMAN B. Mutation frequency and spectrum in lymphocytes of small cell lung cancer patients receiving etoposide chemotherapy. *Cancer Res* 1997; 57:4393-4407.
55. KIRSCH IR, LIPKOWITZ SA. A measure of genomic instability and its relevance to lymphomagenesis. *Cancer Res* 1992; 52:5545s-5546s.
56. KOEFLER HP, JD. THERAPY-RELATED ACUTE NONLYMPHOCYTIC LEUKEMIA. IN: WIERNICK PH, CANELOS GP, KYLE RA, SCHIFFER CA, editors. *Neoplastic diseases of the Blood*. New York: Churchill Livingstone; 1984. p.357-381.

57. LEVINE EG, BLOOMFIELD CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation and environmental exposure. *Semin Oncol* 1992; 19:47-84.
58. LINASSIER C, BARIN C, CALAIS G, LETORTOREC S, BREMOND JL, DELAIN M, PETIT A, GEORGET MT, CARTRON G, RABAN N, BENBOUBKER L, LELOUP R, BINET C, LAMAGNERE JP, COLOMBAT P. Early secondary acute myelogenous leukemia in breast cancer patients after treatment with mitoxantrone, cyclophosphamide, fluorouracil and radiation therapy. *Annals of Oncology* 2000; 11: 1289-1294.
59. LIPKOWITZ S, GARRY VF, KIRSCH IR. Interlocus V-J. Recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5301-5305.
60. LIPKOWITZ S, STERN MH, KIRSCH IR. Hybrid T-cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-teleangiectasia lymphocytes. *J Exp Med* 1990; 172:409-418.
61. LOEB DM, LEDERMAN HM, WINKELSTEIN JA. Lymphoid malignancy as a presenting sign of Ataxia-Teleangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 464-467.
62. MEADOWS AT, OBRINGER AC, MARRERO O, OBERLIN O, ROBISON L, FOSSATI-BELLANI F, GREEN D, VOUTE PA, MORRIS-JONES P, GREENBERG M, BAUM E, RUYMANN F. Second malignant neoplasms following childhood Hodgkin's disease: treatment and splenectomy as risk factors. *Med Pediatr Oncol* 1989; 17:477-484.
63. MENETSKI JP, GELLERT M. V(D)J recombination activity in lymphoid cell lines is increased by agents that elevate cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9324-9328.

64. MEYDAN D, NILSSON T, TÖRNBLOM M, HAGMAR L, HELLGREN D, FUSCOE JC, LAMBERT B. The frequency of illegitimate TCR β / γ gene recombination in human lymphocytes: influence of age, environmental exposure and cytostatic treatment, and correlation with frequencies of t(14;18) and *hprt* mutation. *Mutat Res* 1999; 444:393-403.
65. MISER J, KRAILO M, SMITH M, ET AL. Secondary leukemia or myelodysplastic syndrome following therapy for Ewing's sarcoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997; 16:1867 (abstr).
66. MITANI K, KANDA Y, OGAWA S, TANAKA T, INAZAWA J, YAZAKI Y, HIRAI H. Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood* 1995; 85:2017-2024.
67. MORRISSEY J, TKACHUK DC, MILATOVICH A, FRANCKE U, LINK M, CLEARY ML. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemia. *Blood* 1993; 81:1124-1131.
68. NAKAMURA T, ALDER H, GU Y, PRASAD R, CANAANI O, KAMADA N, GALE RP, LANGE B, CIRST WM, NOWELL PC, CROCE CM, CANAANI E. Genes on chromosomes 4,9 and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4631-4635.
69. NICHOLS CR, BREEDEN ES, LOEHERER PJ, WILLIAMS SD, EINHORN LH. Secondary leukemia associated with a conventional dose of etoposide: review of serial germ cell tumor protocols. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:36-40.
70. PEDERSEN-BJERGAARD J, DAUGAARD G, HANSEN SW, PHILIP P, LARSEN SO, RORTH M. Increased risk of myelodysplasia and leukemia after Etoposide, Cisplatin and Bleomycin for germ-cell tumors. *Lancet* 1991; 338:359-363.

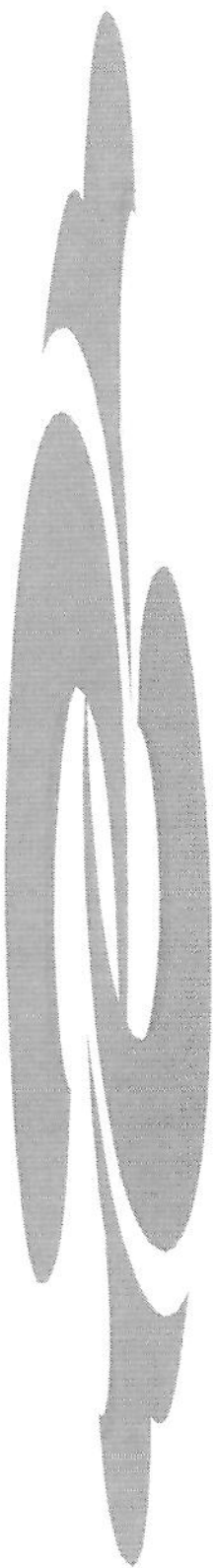
71. PEDERSEN-BJERGAARD J, ERSBOLL J, SORENSEN HM, KEIDING N, LARESEN SO, PHILIP P, LARSEN MS, SCHULTZ H, NISSEN NI. Risk of acute nonlymphocytic leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. Comparison with results obtained in patients treated for Hodgkin's disease and ovarian carcinoma with other alkylating agents. *Ann Intern Med* 1985; 103:195-200.
72. PEDERSEN-BJERGAARD J, LARSEN SO. Incidence of acute nonlymphocytic leukemia, pre-leukemia, and acute myeloproliferative syndrome upto 10 years after treatment of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1982; 307:965-971.
73. PUI CH, BEHM FG, DOWNING JR, HANCOCK ML, SHURTLEFF SA, RIBEIRO RC, HEAD DR, MAHMOUD HH, SANDLUND JT, FURMAN WL, ROBERTS WM, CRIST WM, RAIMONDI SC. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; 12:909-915.
74. PUI CH, RIBEIRO RC, HANCOCK ML, RIVERA GK, EVANS WE, RAIMONDI SC, HEAD DR, BEHM FG, MAHMOUD HH, SANDLUND JT, CRIST WM. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1991; 325:1682-1687.
75. RABBITS TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.
76. RATAIN MJ, KAMINER LS, BITRAN JD, LARSON RA, LE BEAU MM, SKOSEY C, PURL S, HOFFMAN PC, WADE J, VARDIMAN JW, DALY K, ROWLEY JD, GOLOMB HM.. Acute nonlymphocytic leukemia following etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non-small-cell carcinoma of the lung. *Blood* 1987; 70:1412-1417.
77. REED E, YUSPA SH, ZWELLING LA, OZOLS RF, POIRIER MC. Quantification of cis-Diamminedichloroplatinum II (Cisplatin)-DNA-intrastand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy. *J Clin Invest* 1996; 77:545-550.

78. REIMER RR, HOOVER R, FRAUMENI JF, YOUNG RC. Acute leukemia after alkylating-agent therapy of ovarian cancer. *N Engl J Med* 1977; 297:177-181.
79. REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG W, HIDDEMAN W, SAUTER S, HENZE G, ZIMMERMANN M, LAMPERT F, HAVERS W, NIETHAMMER D, ODENWALD E, RITTER J, MANN G, WELTE K, GARDNER H, RIEHM H. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients: results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM'86. *Blood* 1994; 84:3122-3133.
80. RELLING MV, YANESHEVSKI Y, NEMEC J, EVANS WE, BOYETT JM, BEHM FG, PUI CH. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 346-352.
81. RUBNITZ JE, BEHM FG, DOWNING JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10:74-82.
82. RUBNITZ JE, LINK MP, SHUSTER JJ, CARROLL AJ, HAKAMI N, FRANKEL LS, PULLEN DJ, CLEARY ML. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1994; 84:570-573.
83. SANGUINETTI CJ, DIAS NETO E, SIMPSON AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 1994; 17:915-918.
84. SCARADAVOU A, HELLER G, SKLAR CA, REN L, GHAVIMI F.. Second malignant neoplasms in long-term survivors of childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1995; 76: 1860-1867.
85. SHOWE LC, CROCE CM. The role of chromosomal translocations in B- and T- cell neoplasia. *Annu Rev Immunol* 1987; 5:253-277.

86. SMITH J, ANDRAU JC, KALLENBACH S, LAQUERBE A, DOYEN N, PAPADOPOULOU D. Abnormal rearrangements associated with V(D)J recombination in Fanconi anemia. *J.Mol.Biol.* 1998; 281: 815-825.
87. SMITH MA, RUBINSTEIN L, ANDERSON JR, ARTHUR D, CATALANO PJ, FREIDLIN B, HEYN R, KHAYAT A, KRAILO M, LAND VJ, MISER J, SHUSTER J, VENA D. Secondary leukemia or myelodysplastic syndrome after treatment with epipodophyllotoxins. *J Clin Oncol* 1999;. 17:569-577.
88. SMITH MA, RUBINSTEIN L, UNGERLEIDER RS. Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risks. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23:86-98.
89. STERN MH, LIPKOWITZ S, AURIAS A, GRISCELLI C, THOMAS G, KIRSCH IR. *Blood* 1989; 74:2076-2080.
90. TATES AD, VAN DAM FJ, NATARAJAN AT, ZWINDERMAN AH, OSANTO S. Frequencies of HPRT mutants and micronuclei in lymphocytes of cancer patients under chemotherapy: a prospective study. *Mutat Res* 1994; 307:293-307.
91. TAYLOR AMR, METCALFE JÁ, THICK J, MAK YF. Leukemia and lymphoma in Ataxia-Teleangiectasia. *Blood* 1996; 87: 423-438.
92. TEWEY KM, ROWE TC, YANG L, HALLIGAN BD, LIU LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984; 226:466-468.
93. THEIRMAN MJ, LARSON RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10:293-320.
94. TKACHUK DC, KOHLER S, CLEARY ML. Involvement of a homolog of *Drosophila* Trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71:691-700.

95. TONEGAWA S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302:575-581.
96. TUCKER MA, COLEMAN CN, COX RS, VARGHESE A, ROSEMBERG AS. Risk of second cancers after treatment for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1988; 318:76-81.
97. TUCKER MA, MEADOWS AT, BOICE JD, STOVALL M, OBERLIN O, STONE BJ, BIRCH J, VOUTE PA, HOOVER RN, FRAUMENI JF. Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78:459-464.
98. TYCKO B, PALMER JD, SKLAR J. T cell receptor gene trans-rearrangements: chimeric gamma-delta genes in normal lymphoid tissues. *Science* 1989; 245:1242-1246.
99. VALAGUSSA P, TANCINI G, BONADONNAG. Second malignancies after CMF for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 1987; 5:1138-1142.
100. van LEEUWEN FE, KLOKMAN WJ, HAGENBEEK A, NOYON R, van den BELT-DUSEBOUT AW, van KERKHOFF WHM, van HEERDE P, SOMERS R.. Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* 1994; 12:312-325.
101. van LEEUWEN FE, KLOKMAN WJ, VEER MB, HAGENBEEK A, KROL AD, VETTER UA, SCHAAPVELD M, van HEERDE P, BURGERS JM, SOMERS R, ALEMAN BM. Long-term risk of second malignancy in survivors of Hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. *J Clin Oncol* 2000; 18:487-497.
102. WALDMANN TA. The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987; 40:247-231.
103. WELCH JP, LEE CL, BEATTY-DESANA JW, HOGGARD MJ, COOLEDGE JW, HECHT F, MCCAWE BK, PEAKMAN D, ROBISON A. *Nature* 1975; 255:241-245.

104. WINICK NJ, MCKENNA RW, SHUSTER JJ, SCHNEIDER NR, BOROWITZ MJ, BOWMAN WP, JACARUSO D, KAMEN BA, BUCHANAN GR. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphocytic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 1993; 11:209-217.
105. WOLDEN SL, LAMBRON KR, CLEARY SF, TATE DJ, DONALDSON SS. Second cancers following pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1998; 16:536-544.
106. ZAHM SH, WEISENBURGER DD, BABBITT PA, SAAL RC, VAUGHT JB, CANTOR KP, BLAIR A. A case-control study on non-Hodgkin's lymphoma and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in eastern Nebraska. *Epidemiology* 1990; 1:349-356.



9. PUBLICAÇÃO

**ANALYSIS OF V_{γ} /J β TRANS-REARRANGEMENTS IN PAEDIATRIC PATIENTS
UNDERGOING CHEMOTHERAPY**

British Journal of Haematology 2001, 113 (4): 1001-8

Analysis of V γ /J β *trans*-rearrangements in paediatric patients undergoing chemotherapy

LUIZ FERNANDO LOPES,¹ EMMANUEL DIAS NETO,² IRENE LORAND-METZE,³ MARIA DO ROSARIO D. O. LATORRE⁴ AND ANDREW J. G. SIMPSON² ¹Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Cancer, ²Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, ³State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, and ⁴University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 16 October 2000; accepted for publication 14 February 2001

Summary. The frequency of the hybrid V γ /J β *trans*-rearrangement in peripheral blood lymphocytes (PBLs) was analysed in a transversal study of paediatric patients ($n = 210$) with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and solid tumours (ST). Different amounts of DNA were used as the template for a nested polymerase chain reaction to evaluate the frequency of hybrid V γ /J β genes, using silver-stained gels. The frequency of the rearrangement was evaluated in groups before, during and after therapy. A greatly increased frequency of V γ /J β *trans*-rearrangement was found in PBLs of both groups of patients during exposure to chemotherapeutic agents compared with patients before chemotherapy. In patients who had finished

treatment, the frequency of the rearrangement fell promptly to the baseline levels in ST but showed a slow decrease in ALL in those in whom increased levels could be found until 4 years after the end of treatment. We hypothesize that the chemotherapeutic agents are able to induce the V γ /J β *trans*-rearrangement, but this is transient in most cases. The exact relationship between the persistence of the rearrangement and the occurrence of secondary leukaemia remains to be determined.

Keywords: V γ /J β gene, paediatric cancer, childhood secondary leukaemia, V γ /J β gene chemotherapy, V γ /J β *trans*-rearrangement.

Advances in cancer therapy, particularly in the treatment of paediatric cancers, have produced long-term survivors. These survivors have an increased risk of developing a second (iatrogenic) or treatment-related cancer, which may be linked to the genotoxic effects of the initial chemotherapeutic agents (De Benedetti *et al.* 1996). Tumour-specific chromosomal translocations in human lymphoid malignancies often involve aberrant T-cell receptor (TCR) and immunoglobulin gene rearrangements, which probably arise during maturation of B and T lymphocytes (Meydan *et al.* 1999). It has been suggested that these events may be used as markers of genomic instability, genotoxic exposure and cancer risk (Kirsch & Lipkowitz, 1992; Fuscoe *et al.* 1996, 1997). TCR genes are rearranged in developing T cells by site-specific recombination between clusters of variable V(D)J segments. This process is catalysed by the V(D)J recombinase that makes use of specific recombination signal sequences, heptamers and nonamers flanking the segments to be recombined. Occasionally, illegitimate V(D)J recombinase-mediated events occur between regions similar

to recombination signal sequences in other parts of the genome and may give rise to translocations or deletions, resulting in oncogene activation (Rabbits, 1994). Thus, a specific form of instability can be defined by the frequency of the occurrence of variable (V), diversity (D), joining (J) recombinase-mediated *trans*-rearrangements between a V segment from the TCR gamma locus and a J segment from the TCR beta locus. Interlocus recombination involving immunoglobulin or TCR loci can occur at low frequency in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of normal individuals: i.e. t(14;18) in B-cells (Rabbits, 1994; Fuscoe *et al.* 1996) and inversion of chromosome 7 in T cells (Lipkowitz *et al.* 1990). Inv (7) is caused by illegitimate recombination between the TCR β gene located at 7q35 and the TCR γ gene at 7p14–15. This inversion results in a functional hybrid TCR β / γ gene (Davodeau *et al.* 1994), which is present at low frequency in normal T cells (Lipkowitz *et al.* 1990).

In malignant lymphocytes it has been suggested that V(D)J recombinase can play a central role in the generation of genetic changes that dysregulate certain growth-affecting genes, such as c-MYC, B β / γ CL-2 or SCL (Waldmann, 1987; Begley *et al.* 1989; Griesser *et al.* 1989). In patients with the inherited disease ataxia telangiectasia (AT), a genomic instability syndrome associated with a high frequency of

Correspondence: Luiz Fernando Lopes, Centro de Tratamento e Pesquisa, Hospital do Câncer, Pediatric Department, Rua Prof. Antonio Prudente 211, BR – 01509–900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: lf.lopes@sti.com.br

lymphoid malignancies (Boder, 1985), the recombination of TCR γ segment V and TCR β segment J occurs in PBLs at a frequency 50–100-fold higher than normal (Lipkowitz *et al.*, 1990). Patients with Hodgkin's disease have also been studied for this particular type of genetic instability (Abdallah *et al.*, 1995). An increased level of V γ /J β *trans*-rearrangements in PBLs of patients with Hodgkin's disease was observed during exposure to chemotherapeutic agents. These *trans*-rearrangements were transient, returning to baseline levels 1–5 months after completion of treatment. In the present study, paediatric patients with acute leukaemias and solid tumours were examined at diagnosis, during and after chemotherapy in order to trace the frequency of the V γ /J β *trans*-rearrangements. Non-neoplastic patients and children with ataxia telangiectasia were used as negative and positive controls respectively. To further evaluate the use of TCR β / γ gene rearrangements, we studied the possible effects of chemotherapy in paediatric patients with ALL and solid tumours on its percentage of positivity.

PATIENTS AND METHODS

Studied population. We analysed 210 patients from the Paediatric Department of the Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Cancer, São Paulo, Brazil, for the frequency of the V γ /J β hybrid genes in peripheral blood lymphocytes (PBLs). For patients with both acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and solid tumour (ST), blood was collected from 15 patients before chemotherapy, from 30 during treatment (15 patients 3–6 months from the beginning of treatment and 15 patients 9–12 months

from the beginning of treatment) and from 45 patients after the completion of therapy (15 cases 6–12 months after therapy, 15 patients after 2–4 years after therapy and 15 children $\geq$ 5 years after therapy). As a negative control group, blood was also collected from 20 children with non-neoplastic diseases seen at the same institution and 10 healthy adults from the laboratory staff. Two patients with ataxia telangiectasia were used as the positive control group for the nested polymerase chain reaction (PCR) assay.

Patients with ALL were treated according to protocols used at the time of admittance, as shown in Table I. The Brazilian protocols for ALL, GBTLI (Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias Na Infancia) 80, 82 and 85 have been previously described (Brandalize *et al.*, 1993). In GBTLI-85, epipodophyllotoxins etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) were used. The ALL patients analysed after therapy (2–4 years) had been submitted to the Brazilian protocol GBTLI-93 or the German protocol Berlin–Frankfurt–Münster (BFM) 86 (Reiter *et al.*, 1994). The GBTLI-93 protocol contains vincristine and daunorubicine.

For ST patients the protocols used depended on tumour type (osteosarcoma, Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma or Hodgkin's lymphoma) and the time of admittance for treatment. The characteristics of the treatments are shown in Table I. Patients with Hodgkin's lymphoma were treated with MOPP (mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone and/or ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastine, decarbazine) and/or OPPA (oncovin, procarbazine, prednisone, adriamycin) using the chemotherapy protocols described previously (Canellos *et al.*, 1992; Hudson & Donaldson, 1999). All patients with Ewing's sarcoma received high doses of cyclophosphamide (CYCLO) as well

Table I. Characteristics of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and solid tumour (ST) treatment.

	Pre-treatment Year of admission	Duration of chemotherapy (months)	Year of treatment/ Protocol used	Time after Chemotherapy	Year of treatment/ protocol used
ALL	1998	3–6 9–12	1997–99/ALL-93 1996–98/ALL-93	6–12 month 2–4 years > 5 years	1995–98/ALL-93 1991–94/ALL-93 or BFM-86 1980–90/ALL-80 or ALL-82 or ALL-85
ST	1998	3–6 9–12	1997–99/* 1997–99/*	6–12 month 2–4 years > 5 years	1997–98/* 1994–95/† 1985–91/‡

*Solid tumour protocols used from 1997 to 1999:

Hodgkin's lymphoma, ABVD/OPPA; Ewing sarcoma, CYCLO, ADRIA, VCR with or without IFO, VP16; Osteosarcoma, IFO/ADRIA/CARBO/CDDP; Rhabdomyosarcoma, VAC or VAC + IFO/ADRIA/VP16.

†Solid tumour protocols used from 1994 to 1995:

Hodgkin's lymphoma, ABVD/OPPA; Ewing sarcoma, CYCLO, ADRIA, VCR with or without IFO, VP16; Osteosarcoma, IFO/ADRIA/CDDP/VP16; Rhabdomyosarcoma, VAC or VAC + IFO/ADRIA/VP16.

‡Solid tumour protocols used from 1985 to 1991:

Hodgkin's lymphoma: 1985–87 ABVD, 1988–91 ABVD/MOPP.
Ewing sarcoma: 1985–89 CYCLO, ADRIA, VCR, MTX; 1990–91 CYCLO, ADRIA, VCR.
Osteosarcoma: HD MTX/CDDP/ADRIA; Rhabdomyosarcoma, VAC or VAC + IFO/ADRIA/VP16.
ALL 93, Brazilian Cooperative Study, GBTLI-93.
ALL –BFM 86, German Cooperative Study, BFM 86.
ALL 80/ ALL 82/ ALL 85, Brazilian Cooperative Study, GBTLI-80, -82 and -85.

as vincristine (VCR) and adriamycin (ADRIA). Osteosarcoma patients were treated with high-dose methotrexate (HD MTX)/CDDP(*cis*-diamminedichloroplatinum-II)/ADRIA from 1985 to 1989. The cumulative dose of MTX was 144 g/m², CDDP 840 mg/m² and ADRIA 210 mg/m². From 1994 to 1995 patients were treated with ifosfamide (IFO)/ADRIA/CDDP/VP16. The cumulative doses were 54 g/m² for IFO, 375 mg/m² for ADRIA, 720 mg/m² for CDDP and 2.7 g/m² for VP16. During the period between 1997 and 1999 the treatment used was IFO/ADRIA/carboplatin(CARBO)/CDDP, with cumulative doses of 45 g/m² for IFO, 360 mg/m² for ADRIA, 2.5 g/m² for CARBO and 500 mg/m² for CDDP. Patients with rhabdomyosarcoma were treated for 50 weeks with VAC (vincristine, adriamycin, cyclophosphamide) if they were non-metastatic. VAC + IFO/ADRIA/VP16 was used if the patients were metastatic or parameningeal. The cumulative dose for ADRIA was 360 mg/m², for IFO 81 g/m² and for VP16 2 g/m².

Blood sampling. Informed consent and ethical approval from the hospital ethical committee was obtained for this study of the 210 individuals from the Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Cancer, São Paulo, Brazil. Blood (10 ml) was collected from each individual in EDTA-Vacutainer blood collection tubes (Becton-Dickinson, Plymouth, UK) according to the manufacturer's instruction and used for PBL extraction within 6 h. PBLs were isolated using Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) density-gradient centrifugation from the heparinized blood (Boyum, 1968). For DNA extraction, pellets of lymphocytes were incubated in TE buffer (Tris 10 mmol/l pH 8.0, EDTA 1 mmol/l) plus proteinase K (20 mg/ml) at 37°C overnight. The lysate was then extracted with phenol/chloroform, and the DNA recovered after ethanol precipitation using standard methods (Blin & Stafford, 1976).

PCR conditions. To assay for recombinations between V γ and J β segments, a two-step nested PCR protocol was performed for each patient using primers V γ a, V γ b, J β 1a and the J β 1b as described in Table II. Briefly, in the first PCR, 525, 350, 175, 35, 17.4, or 8.75 ng of DNA was used as the template in a solution containing 0.125 mmol/l dNTPs (deoxynucleotide triphosphate), 0.25 μ l of polymerase (5 U/ μ l-Gibco/BRL, Rockville, MD, USA), 0.75 μ l of MgCl₂ (50 mmol/l), 13 μ l of Milli-Q water and 5 pmols of the primers V γ a and J β 1a in 10X PCR buffer (20 mmol/l Tris-HCl pH 8.0 and 50 mmol/l KCl). The final amplification volume was 25 μ l. The amplification cycle was: 95°C for 3 min, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min; followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C with a final cycle of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 5 min at 72°C. In the second amplification step, 2 μ l of the first amplification reaction was diluted into 25 μ l of an identical solution containing 5 pmols of each of the nested primers V γ b and J β 1b in an identical amplification cycle. All molecular studies were performed at the Laboratory of Cancer Genetics of the São Paulo branch of the Ludwig Institute for Cancer Research.

Analysis of PCR products using silver-stained polyacrylamide gels. Nested PCR products (2 μ l) resulting from every DNA

Table II. Sequence of oligonucleotides used as PCR primers or probes.

Oligonucleotide	Sequence
V γ a	TACATCCACTGGTACCTACACCAG
V γ b	CTAGAATTCCAGGGTTGTGTTGGAATCAGGA
V γ c	TCTGGGGTCTATTACTGTGCCACCTGG
J β 1a	TTCCCAGCAACTGATCATTG
J β 1b	CCAGGATCCCCGAGTCAAGA
J β 1c	CATACCTGTCACAGTGAGCC
GAPDHS	TTCATCCCTTCTCCCCACACAC
GAPDHA	AGTCCCAGGGCTTTGATTG

The oligonucleotides labelled a were used as primers in the first PCR reaction; those labelled b were used as internal primers in the second nested reaction; and those labelled c were used as hybridization probes. The V γ oligonucleotides correspond to the coding strands. The J β oligonucleotides correspond to the inverted complement of the coding strands. The primers used for the GAPDH gene are those labelled GAPDHS and GAPDHA.

dilution of each individual were analysed using 6% silver-stained polyacrylamide gels (Sanguinetti *et al.*, 1994). This methodology is approximately 100 times more sensitive than ethidium bromide agarose gel staining, has a greater resolving power and provides a permanent copy of the experiment after drying the gel.

Amplification control using the GAPDH gene. To exclude the possibility that absence of an amplification product in the analysis of the hybrid gene was not caused by PCR inhibitors co-extracted together with template DNA, or the absence of the DNA itself, PCR was performed using primers directing GAPDH amplification (Table II) and the same DNA dilutions as used before. The mixture was heated to 95°C for 3 min, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min; it then underwent 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 30 s at 72°C, followed by a final cycle for 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 5 min at 72°C. The PCR products were analysed on silver-stained polyacrylamide gels as described above.

Confirmation of product specificity. Specific PCR products from the second V γ /J β specific amplification reaction were separated in 1.2% agarose gels. PCR products were Southern-blotted to a positively charged nylon membrane and hybridized to [α -³²P]-labelled oligonucleotide internal to the amplification primers.

Two microlites of PCR products were used as the template for sequencing, using standard methodologies and confirmed the amplification of the expected gene.

Analysis of results. All patients were determined as positive or negative for the rearrangement according to the presence or absence of detectable amounts of the specific amplification product after nested PCR. Each patient was studied using six different amounts of DNA (525 ng, 350 ng, 175 ng, 35 ng, 7.4 ng, 8.75 ng). We assumed that positive amplification reflected the presence of a single V γ /J β template in the starting amplification mixture. Thus, we used the lowest quantity of DNA that resulted in positive amplification to estimate the rearrangement frequency for

each patient. For example: for the patient shown in Fig 1, the lowest quantity of DNA that was positive was 17.4 ng. This correlated to a frequency $34.48/10^5$ PBLs with the rearrangement, assuming each cell contains 6 pg of DNA.

Results of samples were obtained for non-neoplastic control patients, ALL and ST patients. The rearrangement frequencies were analysed during therapy and compared with the rearrangement frequencies before and after therapy. The cases with ALL were analysed separately from the ST groups, using the same non-neoplastic patients as the negative control group.

Statistical analysis. The means of V γ /J β rearrangements frequencies for each group of patients were determined. The group of patients during therapy was compared with the means of rearrangement frequencies before and after therapy separately for ALL and ST. Means were compared using the Kruskal–Wallis test and multiple comparisons were performed using the Tukey–HSD test.

RESULTS

The mean age of the control group was 8.5 years (CI 95% 5.4–11.6). The patients with ALL at diagnosis had a mean age of 7.0 years (CI 95% 4.9–9.1); those exposed to 3 and 6 months of chemotherapy were 5.8 years old (CI 95% 2.6–8.9); those exposed between 9 and 12 months were 7.8 years old (CI 95% 4.6–11.0). Patients tested 6–12 months after the end of treatment had a mean age of 8.6 years (CI 95% 6.6–10.5 years); those 2–4 years after therapy were 12.2 years old (CI 95% 10.5–14.5 years) and those more than 5 years after treatment were 17.8 years old (CI 95% 15.1–20.4 years). For the groups of patients with ST those values were respectively: 13.0 years (CI 95% 9.4–16.6 years); 14.1 years (CI 95% 12.0–16.1 years); 12.9 years (CI 95% 10.6–15.3 years); 14.1 years (CI 95% 11.5–16.6 years); 15.8 years (CI 95% 13.6–18.0 years) and 20.0 years (CI 95% 17.7–22.3 years).

The mean frequency of rearrangements for each group of

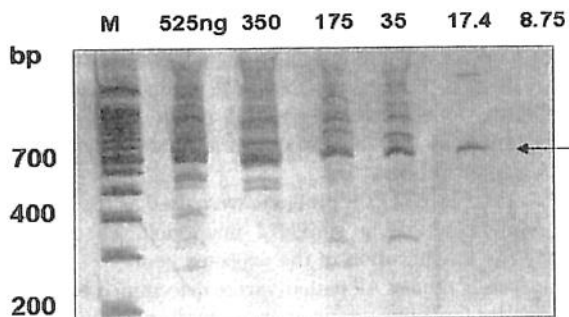


Fig 1. Six percent silver-stained polyacrylamide gel analysis of V γ /J β trans-rearrangement gene fragments produced by nested PCR amplification. The patient had a solid tumour and was tested 9–12 months after initiation of treatment. A positive amplification was obtained with 525 ng, 350 ng, 175 ng, 35 ng and 17.4 ng of DNA. No amplification was obtained using 8.75 ng of DNA. The arrow on the right indicates the position of the specific amplification product. M, molecular size markers

patients revealed an increase in V γ /J β trans-rearrangements in PBLs of patients with ALL and ST during exposure to chemotherapeutic agents compared with patients pre- and post-chemotherapy and the non-neoplastic group (Table - III).

The mean rearrangement frequency was $10.2/10^5$ cells and $13.8/10^5$ cells for patients with ALL receiving chemotherapy for 3–6 months and 9–12 months respectively. For the non-neoplastic group and ALL pre-chemotherapy group the values were $1.3/10^5$ cells and $3.1/10^5$ cells ($P < 0.001$). In the ST group, the respective values for patients receiving chemotherapy were $9.2/10^5$ cells and $9.1/10^5$ cells (3–6 months and 9–12 months) and for the non-neoplastic group and ST pre-chemotherapy group were $1.3/10^5$ cells and $0.6/10^5$ cells respectively ($P < 0.002$). Therefore, as shown in Fig 2, the baseline frequency of rearrangements was higher in ALL than the control group. It increased markedly during chemotherapy and decreased slowly after the end of chemotherapy. However, in ST the baseline frequency of the rearrangement was similar to that of the control group. There was also an increase during chemotherapy but after the end of treatment the levels fell quickly to the baseline values.

All patients studied during or after chemotherapy received anthracyclines (Table I). However, only 52 patients received epipodophyllotoxins, 23 with ALL: none of the patients in chemotherapy, two in the group 6–12 months after treatment, nine in the group 2–4 years after therapy and 12 at least 5 years after treatment. Among ST (29 patients) these agents were given to 11 patients studied during treatment and seven, eight and three patients, respectively, after chemotherapy according to the groups.

The 45 patients with ALL who were studied after the end of chemotherapy (DNA collected in 1998) had a follow-up period of 24–36 months from the date the DNA was collected. Only one had a bone marrow relapse and died. All the others are well, with normal blood counts and no evidence of a secondary neoplasia.

DISCUSSION

Evidence for increased genetic damage in human populations exposed to physical or chemical agents has been widely documented (Levine & Bloomfield, 1992; Tates *et al.*, 1994). Cancer patients receiving chemotherapeutic treatment are exposed to high doses of cytotoxic and often genotoxic drugs. These patients are at risk of developing secondary cancers several years after the initial successful treatment (Smith *et al.*, 1994; Van Leeuwen *et al.*, 1994; Wolden *et al.*, 1998). It is generally accepted that this second malignancy is related to the first chemotherapy.

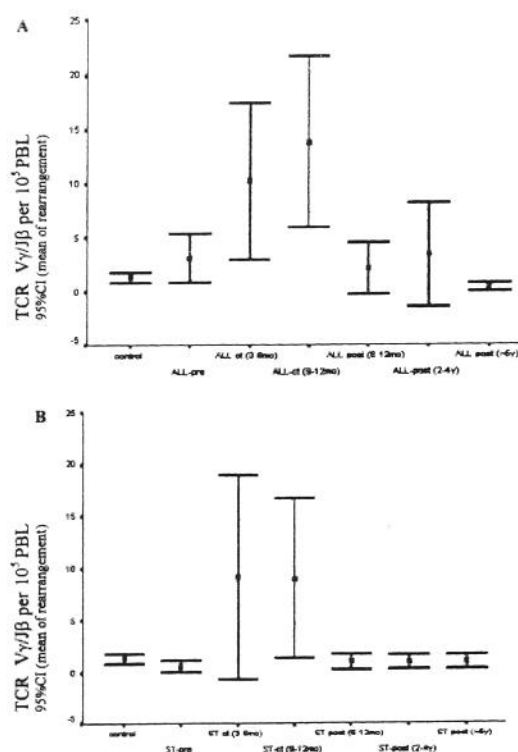
Adriamycin (ADRIA), a potent anti-tumour drug in clinical use, interacts with nucleic acids and cell membranes but the molecular basis of its anti-tumour activity is still unknown. Similar to a number of intercalative anti-tumour drugs and non-intercalative epipodophyllotoxins (VP-16 and VM-26), adriamycin has been shown to induce single- and double-strand breaks in DNA. These strand breaks are unusual because a covalently bound protein appears to be

Table III. Frequency of V γ /J β rearrangement per 10⁵ PBLs according to the group of patients.

Group	Number of patients	Mean	P*	95% Confidence Interval for Mean			
				Lower bound	Upper bound	Minimum	Maximum
(A) ALL and non-neoplastic patients							
Control	30	1.35		0.88	1.81	0.00	3.43
ALL pre-CT	15	3.08	> 0.05	0.80	5.35	0.00	17.14
ALL CT (3-6 months)	15	10.21	< 0.05	2.95	17.46	1.71	34.48
ALL CT (9-12 months)	15	13.84	< 0.05	5.97	21.70	0.00	34.48
ALL post (6-2 months)	15	2.20	> 0.05	- 0.16	4.57	0.00	17.14
ALL post (2-4years)	15	3.44	> 0.05	- 1.38	8.26	0.00	34.48
ALL post (> 5years)	15	0.38	> 0.05	9.1E-03	0.75	0.00	1.71
Total	120						
(B) ST and-non-neoplastic patients							
Control	30	1.35		0.88	1.81	0.00	3.43
ST pre-CT	15	0.64	> 0.05	0.10	1.19	0.00	3.43
ST-CT (3-6 months)	15	9.18	< 0.05	- 0.60	18.96	0.00	68.57
ST-CT (9-12 months)	15	9.06	< 0.05	1.42	16.70	0.00	34.48
ST post (6-12 months)	15	1.10	> 0.05	0.36	1.84	0.00	3.43
ST post (2-4years)	15	1.06	> 0.05	0.42	1.70	0.00	3.43
ST post (> 5years)	15	1.06	> 0.05	0.42	1.70	0.00	3.43
Total	120						

*P compared with control group.

CT, chemotherapy.

**Fig 2.** Frequency of TCR V γ /J β rearrangement in PBL for patients before, during and after chemotherapy. The TCR V γ /J β in group during chemotherapy was significantly higher than in group before (pre-) or after (post-) chemotherapy. (A) Patients with ALL. (B) Patients with ST. m, months; y, years.

associated with each broken phosphodiester bond. In *in vitro* studies, mammalian DNA topoisomerase II mediates DNA damage caused by adriamycin and other related anti-tumour drugs (Tewey *et al.*, 1984). The epipodophyllotoxins are known to cause large DNA deletions and rearrangements (Berger *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1993) but, more recently, increased site-specific V(D)J recombinase-mediated deletions in the HPRT gene have also been shown (Chen *et al.*, 1996). Follow-up studies of cancer patients treated with epipodophyllotoxin therapy, including children with ALL, have suggested that these drugs may contribute to the development of secondary acute myeloid leukaemia (t-AML) (Pui *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994). The level of illegitimate V(D)J recombination changes in lymphocyte and non-lymphocyte blood cell DNA was measured in paediatric patients with ALL who received etoposide (Fusco *et al.*, 1998). In this study, a low level of t(14;18) was found in the lymphocytes before treatment that was not increased during therapy, suggesting that etoposide-based chemotherapy was not able to produce genomic rearrangements mediated by illegitimate V(D)J recombination. Despite the limitations of this and other studies, several investigations have examined mutagenesis in patients treated with etoposide. Little evidence for mutation induction by this agent was found with endpoints measuring gene mutations, micronuclei or inappropriate V(D)J recombination (Abdallah *et al.*, 1995). The frequencies of hprt mutations in the peripheral blood of 12 elderly adult patients receiving etoposide chemotherapy for small cell lung cancer was measured (Karnaoukhova *et al.*, 1997). However, when samples were obtained before, during and after therapy there was no significant increase

in *hprt* mutation frequency. Our results using TCR β / γ gene rearrangements show a transient increase of these mutations during chemotherapy with doxorubicin (ADRIA or DAUNO) and epipodophyllotoxin (VM-26 and/or VP-16).

Secondary acute non-lymphocytic leukaemia (t-ANLL) after treatment with a CDDP-based regimen for osteosarcoma was described in a paediatric osteosarcoma population of the M.D. Anderson Cancer Centre (Jeha *et al.* 1992). These authors described 66 patients treated with CDDP/ADRIA and CYCLO. Two patients presented t-ANLL. Among the 66 patients, the cumulative dosages of CDDP varied from 150 to 3000 mg/m². The dosages related to t-ANLL were 900 mg/m² and 1500 mg/m². According to Jeha *et al.* (1992), CDDP is considered to have alkylating activity and is highly suspect as a causative agent of t-ANLL with an unknown mechanism. A marked difference in the ability of individual patients to form DNA adducts after treatment with CDDP was suggested (Reed *et al.* 1996). The accumulation of DNA adducts increases with increasing cumulative doses of CDDP.

Reports of t-AML in survivors of germ cell tumours, lung cancer and ovarian cancer treated with CDDP-based regimens are also increasing (Ratain *et al.* 1987; Chambers *et al.* 1989). In our study, the patients with osteosarcoma were treated with different protocols. The cumulative dosage of CDDP varied from 500 mg/m² to 840 mg/m² according to the protocol used. In the three periods of treatment (1985–89, 1994–95 and 1997–99) ADRIA was added, and in the period 1994–95 VP16 was also included.

In a group of agricultural workers from the 'leukaemia-lymphoma' belt of Southern Minnesota and Northern Iowa, a transient increase in the frequency of interlocus recombination was found that correlated with the exposure to herbicides, pesticides and fumigants (Lipkowitz *et al.* 1992). The observed increase seemed to be correlated with the degree of exposure to these agents. A seasonal variation in the level of *trans*-rearrangements was also documented. When compared with a matched control group, a 15–30-fold increase in the frequency of interlocus recombination was observed (Lipkowitz *et al.* 1992). These agricultural workers also had a three- to sevenfold increased risk of developing lymphoid malignancies.

In our study we observed a transient increase in the frequency of TCR β / γ gene for the ALL and ST patients receiving chemotherapy. Patients were divided into groups of 3–6 months and 9–12 months of exposure. This approximately relates to the number of cycles of chemotherapy received. We found that the frequency of the rearrangement was similar for both treatment periods for ALL and ST. All patients had received anthracyclines. Therefore, although they participate in the occurrence of the *trans*-rearrangements, they may not be responsible for the differences observed in ALL and ST. Epipodophyllotoxins were not included in the chemotherapy protocols for the ALL patients analysed during treatment, but were part of the polychemotherapy administered for ST. The frequency of the *trans*-rearrangement, however, was similar in both groups. In the groups analysed after the end of treatment, the frequency of patients that received epipodophyllotoxins

was similar for ALL and ST in those observed between 6 months and 4 years. In the groups analysed ≥ 5 years after the end of chemotherapy, these drugs were used in most patients with ALL but only in 3/15 cases of ST. Therefore the differences in the behaviour of the *trans*-rearrangement cannot directly be attributed to them. The increased frequency of the *trans*-rearrangement observed in ALL before and immediately after treatment may be caused by intrinsic factors of the disease (the gene analysed belongs to the lymphoid tissue) and also the longer duration of the treatment for ALL.

The occurrence of leukaemia after treatment with alkylating agents for childhood cancer has been reported in the literature for many years. The Late Effects Study Group described 22 children with leukaemia after following a group of 9170 survivors of childhood cancer for 2 or more years (Tucker *et al.* 1987). Treatment with alkylating agents was associated with a significantly elevated risk of leukaemia (RR = 4.8; 95% CI: 1.2–18.9). Radiation therapy in this study did not increase risk. In this cohort, the authors showed an elevated risk of leukaemia at older ages that could be explained by the higher doses of alkylating agents received. Similarly, the excess leukaemia after Hodgkin's lymphoma (HD) and Ewing's sarcoma could be explained by treatment with alkylating agents. Van Leuwen *et al.* (2000) studied 1253 patients, aged below 40 years and treated at two Dutch cancer centres between 1966 and 1986. Among patients under 20 years of age (326), leukaemia as a secondary malignancy was found in 18 patients with 15 AMLs. The relative risk for these was 37.5 (95% CI: 22.2–59.2) and 66.7 (95% CI: 37.4–110) respectively.

Secondary leukaemia associated with etoposide was not only related to high-dose epipodophyllotoxin protocols (Pedersen-Bjergaard *et al.* 1991; Pui *et al.* 1991) but also with conventional doses (Nichols *et al.* 1993). These authors studied patients treated with germ cell tumour protocols and described two cases among 315 survivors with cumulative etoposide doses of 1500–2000 mg/m² in combination with cisplatin plus either ifosfamide or bleomycin.

Our patients studied after treatment have a follow-up of at least 2 years. However, none of them developed myelodysplastic syndrome (MDS)/AML. This may be as a result of the small number of cases compared with the above-cited studies. A long follow-up is needed to ensure that they will not develop a secondary leukaemia.

The results of our study indicate that the analysis of the TCR β / γ gene rearrangement is a useful biological marker for genotoxicity. The DNA damage observed was transient. However, it would be interesting to re-examine the patients analysed during treatment several years later in a longitudinal study.

ACKNOWLEDGMENTS

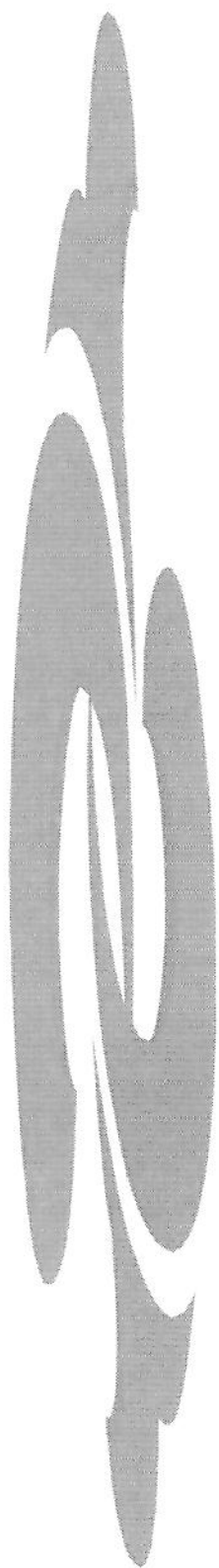
We thank Dr Beatriz T. C. Carvalho and the two patients with ataxia telangiectasia from the Escola Paulista de Medicina, Department of Paediatric Immunology. We also

thank Dr Ricardo R. Brentani who gave us permission to undertake this work at the Ludwig Institute.

REFERENCES

- Abdallah, J.M., Lombardi, D.P. & Kirsch, I.R. (1995) Genetic instability in patients with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *Journal of Clinical Investigations*, **96**, 2744–2747.
- Begley, C.G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Herschfield, M., Haynes, B.P., Cohen, D.I., Waldmann, T.A. & Kirsch, I.R. (1989) Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2031–2035.
- Berger, N.A., Chatterjee, S., Schmotzer, J.A. & Helms, S.R. (1991) Etoposide (VP-16–213)-induced gene alterations: potential contribution to cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **33**, 8740–8743.
- Blin, N. & Stafford, D.W. (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, **3**, 2303–2308.
- Boder, E. (1985) Ataxia-telangiectasia: an overview. In *Genetics, Neuropathology & Immunology of a Degenerative Disease of Childhood* (ed. by R.A. Gatti & M. Swift), pp. 1–63. Alan Liss, New York.
- Boyum, A. (1968) Isolation of molecular cells and granulocytes from human blood. Isolation of molecular cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory and Investigations Supplement*, **97**, 77–89.
- Brandalise, S., Odone, V., Pereira, W., Andrea, M., Zanichelli, M., Aranega, V. & Brazilian ALL Group (1993) Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols. *GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. Leukemia*, **7**, S142–S145.
- Canellos, G.P., Anderson, J.R., Propert, K.J., Nissen, N., Cooper, M.R., Henderson, E.S., Green, M.R., Gottlieb, A. & Peterson, B.A. (1992) Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *New England Journal of Medicine*, **327**, 1478–1484.
- Chambers, S.K., Chopyk, R.L., Chambers, J.T., Schwartz, P.E. & Duffy, T.P. (1989) Development of leukemia after doxorubicin and cisplatin treatment of ovarian cancer. *Cancer*, **64**, 2459–2461.
- Chen, C.L., Fuscoe, J.C., Liu, Q. & Relling, M.V. (1996) Etoposide causes illegitimate V (D) J recombination in human lymphoid leukemic cells. *Blood*, **88**, 2210–2218.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Gaschet, J., Hallet, M.M., Triebel, F., Vie, H., Kabelitz, K. & Bonneville, M. (1994) Surface expression of functional T-cell receptor chains formed by interlocus recombinations on human T-lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **180**, 1685–1691.
- De Benedetti, V., Bennett, W.P., Greenblatt, M.S. & Harris, C.C. (1996) p53 Tumor suppressor gene: implications for iatrogenic cancer and cancer therapy. *Medicine Pediatrics Oncology*, **27**, 2–11.
- Fuscoe, J.C., Setzer, R.W., Collard, D.D. & Moore, M.M. (1996) Quantification of T (14: 18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis*, **17**, 1013–1020.
- Fuscoe, J.C., Vira, L.K., Collard, D.D. & Moore, M.M. (1997) Quantification of *hprt* gene deletions mediated by illegitimate V (D) J recombination in peripheral blood cells of humans. *Environmental Molecular Mutagen*, **29**, 28–35.
- Fuscoe, J.C., Knapp, G.W., Hanley, N.M., Setzer, R.W., Sandlund, J.T., Pui, C.H. & Relling, M.V. (1998) The frequency of illegitimate V (D) J recombination-mediated mutations in children treated with etoposide-containing antileukemic therapy. *Mutation Research*, **419**, 107–121.
- Griesser, H., Tkachuk, D., Reis, M.D. & Mak, T.W. (1989) Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood*, **73**, 1402–1415.
- Han, Y.H., Austin, M.J., Pommier, Y. & Povirk, L.F. (1993) Small deletion and insertion mutations induced by the topoisomerase II inhibitor teniposide in CHO cells and comparison with sites of drug-stimulated DNA cleavage in vitro. *Journal of Molecular Biology*, **220**, 52–66.
- Hudson, M.M. & Donaldson, S.S. (1999) Treatment of pediatric Hodgkin's Lymphoma. *Seminars in Hematology*, **36**, 313–323.
- Jeha, S., Jaffe, N. & Robertson, R. (1992) Secondary acute non-Lymphoblastic Leukemia in two children following treatment with a Cis-Diamminedichloroplatinum-II-based regimen for osteosarcoma. *Medicine Pediatrics Oncology*, **20**, 71–74.
- Karnaoukhova, L., Moffat, J., Martins, H. & Glickman, B. (1997) Mutation frequency and spectrum in lymphocytes of small cell lung cancer patients receiving etoposide chemotherapy. *Cancer Research*, **57**, 4393–4407.
- Kirsch, I.R. & Lipkowitz, S.A. (1992) A measure of genomic instability and its relevance to lymphomagenesis. *Cancer Research*, **52**, 5545s–5546s.
- Levine, E.G. & Bloomfield, C.D. (1992) Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation and environmental exposure. *Seminars in Oncology*, **19**, 47–84.
- Lipkowitz, S., Stern, M.H. & Kirsch, I.R. (1990) Hybrid T-cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasia lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **172**, 409–418.
- Lipkowitz, S., Garry, V.F. & Kirsch, I.R. (1992) Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 5301–5305.
- Meydan, D., Nilsson, T., Törnblom, M., Hagmar, L., Hellgren, D., Fuscoe, J.C. & Lambert, B. (1999) The frequency of illegitimate TCR β /T gene recombination in human lymphocytes: influence of age, environmental exposure and cytostatic treatment, and correlation with frequencies of T (14: 18) and *hprt* mutation. *Mutation Research*, **444**, 393–403.
- Nichols, C.R., Breeden, E.S., Loehrer Pj, Williams, S.D. & Einhorn, L.H. (1993) Secondary leukemia associated with a conventional dose of etoposide. Review of serial germ cell tumor protocols. *Journal of the National Cancer Institute*, **85**, 36–40.
- Pedersen-Bjergaard, J., Daugaard, G., Hansen, S.W., Philip, P., Larsen, S.O. & Rorth, M. (1991) Increased risk of myelodysplasia and leukemia after etoposide, cisplatin and bleomycin for germ-cell tumors. *Lancet*, **338**, 359–363.
- Pui, C.H., Ribeiro, R., Hancock, M.L., Rivera, G.K., Evans, W.E., Raimondi, S., Head, D.R., Behm, F.G., Mahmoud, M.H., Sandlund, J.T. & Crist, W. (1991) Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **325**, 1682–1687.
- Rabbits, T.H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, **372**, 143–149.
- Ratain, M.J., Kaminer, L.S., Bitran, J.D., Larson, R.A., LeBeau, M.M., Skosey, C., Purl, S., Hoffman, P.C., Wade, J., Vardiman, J.W., Daly, K., Rowley, J.D. & Golomb, H.M. (1987) Acute nonlymphocytic leukemia following Etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non small cell carcinoma of the lung. *Blood*, **70**, 1412–1417.

- Reed, E., Yuspa, S.H., Zwelling, L.A., Ozols, R.F. & Poirier, M.C. (1996) Quantification of cis-Diamminedichloroplatinum II (cis-platin)-DNA-intrastand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy. *Journal of Clinical Investigations*, **77**, 545-550.
- Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, E., Havers, W., Niethammer, O.E., Ritter, J., Mann, G., Welte, K., Gardner, H. & Riehm, H. (1994) Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM'86. *Blood*, **84**, 3122-3133.
- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, **17**, 915-918.
- Smith, M.A., Rubinstein, L. & Ungerleider, R.S. (1994) Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risks. *Medicine Pediatrics Oncology*, **23**, 86-98.
- Tates, A.D., Van Dam, F.J., Natarajan, A.T., Zwiderman, A.H. & Osanto, S. (1994) Frequencies of HPRT mutants and micronuclei in lymphocytes of cancer patients under chemotherapy: a prospective study. *Mutation Research*, **307**, 293-307.
- Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D. & Liu, L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, **226**, 466-468.
- Tucker, M.A., Meadows, A.T., Boice, J.D., Stovall, M., Oberlin, O., Stone, B.J., Birch, J., Voûte, P.A., Hoover, R.N. & Fraumeni, J.F. Jr (1987) Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **78**, 459-464.
- Van Leeuwen, F.E., Klokman, W.J., Hagenbeek, Noyon, R., Van Den Belt-Dusebout, A.W., Van Kerkhoff, E.H., Van Heerde, P. & Somers, R. (1994) Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study. *Journal of Clinical Oncology*, **12**, 312-325.
- Van Leeuwen, F.E., Klokman, W.J., Van't Veer, M.B., Hagenbeek, A., Krol, A.D.G., Vetter, U.A.O., Schaapveld, M., Van Heerde, P., Burgers, M.V., Samers, R. & Aleman, B.M.P. (2000) Long-term risk of second malignancy in survivors of Hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. *Journal of Clinical Oncology*, **18**, 487-497.
- Waldmann, T.A. (1987) The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Advances in Immunology*, **40**, 247-231.
- Wolden, S.L., Lambron, K.R., Cleary, S.F., Tate, D.J. & Donaldson, S.S. (1998) Second cancers following pediatric Hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology*, **16**, 536-544.



10. ANEXOS



HOSPITAL DO CÂNCER
HOSPITAL A. C. CAMARGO

DC-060-97-rc1
São Paulo, 03 de outubro de 1997.

Ilmo(a).Dr(a).
Dr. Luiz Fernando Lopes
Titular do Departamento de Pediatria
do Hospital do Câncer

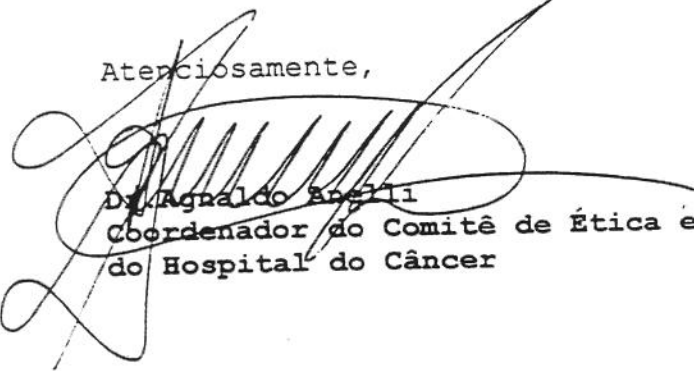
Prezado(a) Doutor(a):

Ref.- Protocolo 078/97
"INSTABILIDADE GÊNICA MEDIADA PELA V(D)J-recombinase EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS ONCOLÓGICOS EXPOSTOS A QUIMIOTERAPIA"

Autor : Dr. Luiz Fernando Lopes
Co-Orientador : Dr. Andrew John George Simpson-Ludwig-
Co-Orientadora: Prof. Dra. Irene Lorand-Metze

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - do Hospital do Câncer, reuniram-se dia 30 de setembro de 1997 e **aprovaram** do projeto conforme titulação acima.

Atenciosamente,



Dr. Agnaldo Angeli

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
do Hospital do Câncer

ANEXO 2 – Lista de identificação dos pacientes do estudo: número no grupo de tratamento, data da coleta do sangue e extração de DNA, iniciais do nome, concentração mínima de DNA (em ng) onde o rearranjo foi visualizado no gel de poliacrilamida, frequência de rearranjo $\times 10^5$ leucócitos de sangue periférico

GRUPO	DATA DA COLETA	INICIAIS	CONC.DNA (ng)	FREQ.REAR. $\times 10^5$ leuc	GRUPO	DATA DA COLETA	INICIAIS	CONC.DNA (ng)	FREQ.REAR. $\times 10^5$ leuc
A - Sem Neoplasia	GRUPO 1				B LLA-Diag	GRUPO 2			
A1	30-06-98	PSG	525	1,14	B1	30-01-98	WET	175	3,43
A2	15-09-98	RDL	175	3,43	B2	20-02-98	MA	175	3,43
A3	21-05-99	SL	350	1,71	B3	24-03-98	RF	350	1,71
A4	28-01-00	FMA	175	3,43	B4	20-03-98	SM	175	3,43
A5	12-02-00	EB	175	3,43	B6	06-05-98	RSM	nv	0,00
A6	15-02-00	GFC	175	3,43	B7	22-05-98	RSM	350	1,71
A7	22-02-00	LDS	525	1,14	B8	30-05-98	DL	175	3,43
A8	10-03-00	WFPS	nv	0,00	B9	01-06-98	SCB	350	1,71
A9	24-03-00	AOR	350	1,71	B10	15-06-98	VXS	350	1,71
A10	29-03-00	ENS	nv	0,00	B11	29-06-98	BMS	175	3,43
					B13	14-07-98	TA	350	1,71
A21	13-11-98	AOJ	nv	0,00	B16	14-08-98	JLF	nv	0,00
A22	12-05-99	VES	nv	0,00	B17	17-09-98	LLT	175	3,43
A23	21-05-99	ICPS	350	1,71	B18	11-10-98	DFG	35	17,4
A24	25-06-99	SFA	175	3,43	B20	20-11-98	ACP	nv	0,00
A25	06-07-99	KQS	350	1,71					
A26	05-12-99	IA	350	1,71					
A27	05-12-99	MCB	525	1,14					
A28	20-01-00	ARR	350	1,71					
A29	12-02-00	AEB	175	3,43					
A30	29-03-00	OCJ	nv	0,00					
N9	*	**	525	1,14					
N10	*	**	350	1,71					
N11	*	**	525	1,14					
N12	*	**	525	1,14					
N13	*	**	525	1,14					
N18	*	**	nv	0,00					
N32	*	**	nv	0,00					
N36	*	**	nv	0,00					
N41	*	**	nv	0,00					
N47	*	**	nv	0,00					

No grupo sem neoplasia N9 a N47 são amostras de DNA normais. Estes DNAs foram estocados como sendo de boa qualidade (testadas em experimentos anteriores). Estas amostras foram colhidas de voluntários maiores de 20 anos de idade, pesquisadores e funcionários do Instituto Ludwig, sem nenhuma doença no momento da coleta. Estas amostras foram utilizadas aleatoriamente não sendo possível identificar a data da coleta (*) ou o nome do voluntário (**).

nv = rearranjo não visualizado no gel

<i>C</i> <i>Sólidos</i> <i>ao</i> <i>diagnóstico</i>	<i>GRUPO 3</i>				<i>D - LLA</i> <i>3-6 m trat</i>	<i>GRUPO 4</i>			
C1	05-02-98	ASS	nv	0,00	D1	09-02-98	HSR	175	3,43
C2	19-02-98	LSS	525	1,14	D2	04-02-98	AHLS	17,4	34,48
C3	04-03-98	LDLL	nv	0,00	D3	05-02-98	DA	17,4	34,48
C4	25-03-98	IL	nv	0,00	D4	04-02-98	RR	175	3,43
C5	15-04-98	JCC	nv	0,00	D5	02-02-98	GF	175	3,43
C6	13-04-98	PP	nv	0,00	D6	17-02-98	AJB	17,4	34,48
C8	21-07-98	FL	525	1,14	D7	25-02-98	PAF	175	3,43
C9	28-07-98	AM	nv	0,00	D8	23-03-98	LPN	175	3,43
C10	20-08-98	WNC	nv	0,00	D13	23-09-98	DML	175	3,43
C11	19-08-98	ASS	nv	0,00	D14	22-09-98	SCB	175	3,43
C12	14-08-98	JN	525	1,14	D15	06-11-98	TFA	35	17,14
C13	01-09-98	JBO	350	1,71	D16	17-12-98	LLT	175	3,43
C14	07-10-98	PSC	525	1,14	D18	19-03-99	KCS	350	1,71
C15	05-11-98	LMS	175	3,43	D19	12-03-99	BRB	350	1,71
C17	20-01-99	TCM	nv	0,00	D20	26-05-99	ROS	350	1,71
<i>E - LLA</i> <i>9m l ano</i> <i>trafo</i>	<i>GRUPO 5</i>				<i>F Tu</i> <i>sólido</i> <i>3-</i> <i>trafo m</i>	<i>GRUPO 6</i>			
E1	12-02-98	MS	17,4	34,48	F1	09-02-98	CF	175	3,43
E2	25-02-98	FBL	35	17,14	F2	04-02-98	MA	35	17,14
E3	02-03-98	WT	17,4	34,48	F3	03-02-98	RPA	175	3,43
E4	12-03-98	TASS	35	17,14	F4	04-02-98	CMP	35	17,14
E5	10-06-98	JG	17,4	34,48	F5	04-02-98	HTOV	350	1,71
E6	16-06-98	DAS	35	17,14	F6	25-02-98	RPM	nv	0,00
E7	16-06-98	GF	17,4	34,48	F7	25-02-98	MCS	175	3,43
E8	09-06-98	RFR	525	1,14	F8	19-02-98	LCCG	nv	0,00
E9	15-06-98	PAF	175	3,43	F9	26-02-98	KMC	175	3,43
E10	17-09-98	LPN	175	3,43	F10	17-03-98	SC	525	1,14
E11	15-10-98	AJB	175	3,43	F11	17-03-98	WM	nv	0,00
E12	30-03-99	GSS	nv	0,00	F12	15-05-98	TDR	8,75	68,57
E13	18-02-99	ASS	175	3,43	F13	26-05-98	RPR	525	1,14
E14	23-02-99	SAM	175	3,43	F14	27-05-98	MMM	35	17,14
E15	24-02-99	EWT	nv	0,00	F15	27-05-98	LSS	nv	0,00

<i>G - Tu Sólido 9 m a 1 ano trat</i>	<i>GRUPO 7</i>				<i>H- LLA -pós 6m a 1 ano trat</i>	<i>GRUPO 8</i>			
G1	27-03-98	IL	350	1,71	H1	10-02-98	LSV	525	1,14
G4	30-04-98	ACS	17,4	34,48	H2	03-03-98	TOP	nv	0,00
G5	16-06-98	KMC	17,4	34,48	H3	11-03-98	RHCR	nv	0,00
G6	08-06-98	AAR	350	1,71	H4	19-03-98	MAS	nv	0,00
G7	22-06-98	RPA	35	17,14	H5	14-08-98	RGA	525	1,14
G11	31-07-98	JESB	350	1,71	H6	14-05-99	LSS	nv	0,00
G12	28-08-98	JTS	350	1,71	H7	27-05-99	TDS	350	1,71
G13	08-09-98	TDR	nv	0,00	H8	15-06-99	FRB	nv	0,00
G14	14-09-98	MMM	175	3,43	H9	08-12-99	PCS	175	3,43
G15	17-09-98	ASS	nv	0,00	H10	09-12-99	SFS	35	17,14
G16	17-09-98	CEE	nv	0,00	H11	05-01-00	FBL	525	1,14
G17	29-09-98	RPR	17,4	34,48	H12	07-01-00	DSV	350	1,71
G18	24-03-99	LC	350	1,71	H13	20-01-00	KFO	525	1,14
G19	11-06-99	TO	175	3,43	H14	12-02-00	GFH	175	3,43
G20	06-07-99	ASL	nv	0,00	H15	29-03-00	MS	525	1,14
<i>I -LLA pós QT 2 a 4 anos</i>	<i>GRUPO 9</i>				<i>J TS pós QT 6m a 1 ano</i>	<i>GRUPO 10</i>			
I1	29-01-98	BD	nv	0,00	J1	16-05-98	JAV	nv	0,00
I2	28-01-98	KSS	175	3,43	J2	08-06-98	LAN	nv	0,00
I3	25-02-98	VR	nv	0,00	J3	05-07-99	LSS	525	1,14
I4	05-03-98	HLSC	175	3,43	J4	08-07-98	MBW	175	3,43
I5	11-03-98	FFR	175	3,43	J5	13-07-98	AAR	525	1,14
I6	13-03-98	RCS	nv	0,00	J6	31-08-98	MCAB	nv	0,00
I7	18-03-98	WRL	350	1,71	J7	05-11-98	RPM	525	1,14
I8	16-03-98	SCSM	350	1,71	J8	01-06-99	ACS	nv	0,00
I9	01-04-98	JRS	nv	0,00	J9	13-07-99	RPR	nv	0,00
I10	13-03-98	MGS	17,4	34,48	J10	22-06-99	LSC	nv	0,00
I11	08-04-98	JDS	nv	0,00	J11	22-06-99	WM	175	3,43
I12	14-04-98	MPQ	175	3,43	J12	05-01-00	JBN	525	1,14
I13	30-04-98	CAS	nv	0,00	J13	06-07-99	PSC	350	1,71
I14	26-05-98	GM	nv	0,00	J14	05-07-99	FFS	175	3,43
I15	27-05-98	FCM	nv	0,00	J17	08-12-99	ASS	nv	0,00

K- TS pós QT- 2 a 4 anos	GRUPO 11				L - LLa pós QT > 5 anos	GRUPO 12			
K1	28-01-98	AC	nv	0,00	L1	04-02-98	BP	525	1,14
K2	19-02-98	BAV	350	1,71	L2	18-02-98	TV	nv	0,00
K3	12-03-98	JDS	nv	0,00	L3	18-02-98	TC	nv	0,00
K4	28-03-98	ARM	175	3,43	L4	04-02-98	BT	525	1,14
K5	12-04-98	JVK	350	1,71	L5	25-02-98	FLP	350	1,71
K6	06-07-98	RLBJ	nv	0,00	L6	25-02-98	DLA	nv	0,00
K7	06-07-98	LRV	nv	0,00	L7	04-03-98	RVG	nv	0,00
K8	15-07-98	RATK	nv	0,00	L8	04-03-98	EOS	nv	0,00
K9	03-09-98	ASB	525	1,14	L9	04-03-98	HSS	nv	0,00
K10	18-09-98	RAB	nv	0,00	L10	05-03-98	DG	nv	0,00
K11	17-09-98	MBM	175	3,43	L11	02-03-98	LFS	nv	0,00
K12	26-05-99	FAL	525	1,14	L12	11-03-98	AGJ	nv	0,00
K13	09-06-99	LFM	525	1,14	L13	11-03-98	AJB	350	1,71
K14	23-06-99	MAS	525	1,14	L14	18-03-98	LHSP	nv	0,00
K15	22-12-99	VFB	525	1,14	L15	18-03-98	RCF	nv	0,00
M- Sólido pós QT -> 5 anos	GRUPO 13								
M1	06-02-98	SPSS	350	1,71					
M2	15-07-98	SCA	nv	0,00					
M3	16-07-98	AP	350	1,71					
M4	16-07-98	BSD	525	1,14					
M5	17-07-98	VAC	525	1,14					
M6	23-07-98	JMN	nv	0,00					
M7	28-07-98	CGS	nv	0,00					
M8	25-10-98	DCO	nv	0,00					
M9	27-08-98	FAP	nv	0,00					
M10	23-10-98	AG	525	1,14					
M11	03-02-99	RMG	175	3,43					
M12	26-05-99	RF	nv	0,00					
M13	28-05-99	RS	175	3,43					
M14	01-06-99	AMO	525	1,14					
M15	01-06-99	JDS	525	1,14					

Hospital A.C. Camargo - Fundação Antonio Prudente
R. Prof. Antonio Prudente, 211 - Tel. 242-5000 - FAX 242-5088

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos - Resolução Nº 196 de 10.10.1996 - CNS)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO M F NASCIMENTO / /
ENDEREÇO.....Nº.....COMPL.....CEP.....
CIDADE.....ESTADO.....TEL.(.....).....

RESPONSÁVEL (PACIENTES MENORES DE 18 ANOS)

GRAU DE PARENTESCO.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO M F NASCIMENTO / /
ENDEREÇO.....Nº.....COMPL.....CEP.....
CIDADE.....ESTADO.....TEL.(.....).....

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

1. TÍTULO.....
.....
.....

2. PESQUISADOR.....DEPARTAMENTO.....
CARGO.....CRM.....
APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM / /
INÍCIO DO ESTUDO / /

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Justificativas e Objetivos da Pesquisa.....
.....
.....

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.....
.....
.....

3. Complicações e riscos esperados
.....
.....

4. Benefícios que poderão ser obtidos.....
.....
.....

5. Fui esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento, acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.

SIM NÃO

6. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto a continuidade do meu tratamento.

SIM NÃO

7. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo.

SIM NÃO

8. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão.

SIM NÃO

9. Fui esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas informações em caráter confidencial.

SIM NÃO

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo clínico, conforme definido nos itens 1 a 9, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

São Paulo, de de 199

Assinatura do paciente ou Responsável Legal

Assinatura e Carimbo do Pesquisador

