

Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot *

Detection of p53 protein in leukemic cells by flow cytometry and Western blot

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior (MSc)¹, Marcos Antonio Mauricio Scheiner (MSc)², Flavia da Cunha Vasconcelos³, Jane de Almeida Dobbin (MD)⁴, Claudete Esteves Klumb (MD, PhD)⁵, Raquel C. Maia (MD, PhD)⁶.

Resumo

Introdução: A proteína p53 desempenha uma função crucial no controle do ciclo celular, reparo do DNA e na indução de apoptose em células geneticamente instáveis. O Western blot (WB) é o método preconizado para detecção dessa proteína, no entanto é técnica demorada e trabalhosa. Atualmente, a citometria de fluxo (CF) também tem sido empregada na detecção da proteína p53 tendo a vantagem da praticidade. **Objetivos e Metodologia:** Comparar os resultados obtidos pela CF e WB na detecção da proteína p53 em células leucêmicas. Empregamos amostras de 3 pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), 5 com leucemia mielóide aguda (LMA), 6 com leucemia mielóide crônica (LMC) e 8 com leucemia linfóide crônica (LLC). Os controles positivos (5) e negativos (4), para os dois métodos, foram linhagens de células leucêmicas. Juntamente com o controle de marcação negativa, na técnica de CF, utilizamos linfócitos de 40 doadores de sangue. A análise pela CF foi realizada após a marcação com anticorpo monoclonal anti-p53 e o WB por técnica convencional. **Resultados e Conclusões:** Observamos concordância nos resultados em 82% das amostras leucêmicas e em 100% nas linhagens celulares. CF+/WB+ foram observados em pacientes com evolução desfavorável tais como na LLC / Síndrome de Richter, LMC em crise blástica e na maioria das LMA. Apesar do WB ser considerado um método padrão para a detecção da p53, nossos resultados indicam que a CF pode ser empregada satisfatoriamente na detecção dessa proteína em amostras leucêmicas.

Palavras-chave: Proteína p53; Western blot; Citometria de fluxo; Leucemia.

* Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia Celular (LHCM) e Molecular do Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer (LHCM / HC-I / INCA/RJ).

¹ Farmacêutico-Bioquímico, Professor assistente da disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT / UFRN) e Doutorando do LHCM / HC-I / INCA/RJ,

² Farmacêutico-Bioquímico do LHCM / HC-I / INCA/RJ,

³ Bióloga do LHCM / HC-I / INCA/RJ,

⁴ Médica do Serviço de Hematologia do HC-I / INCA/RJ

⁵ Médica do Serviço de Hematologia e do LHCM / HC-I / INCA/RJ

⁶ Médica Hematologista e responsável pelo LHCM / HC-I / INCA/RJ.

Endereço para correspondência - R.C.M. Laboratório de Hematologia Celular e Molecular, Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer / INCA. Praça da Cruz Vermelha, 23, Centro, CEP: 20.230-130. Rio de Janeiro - RJ, Brasil. *E-mail:* rcmaia@inca.gov.br

Abstract

Introduction: The p53 protein plays a crucial role in the cell cycle control, DNA damage repair and induction of apoptosis in genetically unstable cells. The Western blot is the most utilized methodology for p53 detection, but it requires lots of time to be executed and is a very elaborated technique. Nowadays, flow cytometry (FC), a more practical technique is being used for p53 detection. **Objectives and methodology:** to compare the results of p53 detection by FC and WB in leukemic cells. We used samples from 3 patients with acute lymphoid leukemia (ALL), 5 with acute myeloid leukemia (AML), 6 with chronic myeloid leukemia (CML) and 8 with chronic lymphoid leukemia (CLL). The positive (5) and negative (4) controls, used in both methods were leukemic cells lineages. Lymphocytes from 40 healthy donors were used as control for negative labeling in FC. The FC was performed after labeling with p53 monoclonal antibody and the WB by usual protocol. **Results and conclusion:** We verified agreement in the results in 82% of leukemic samples and in 100% of cell lineages. FC+/WB+ results were observed in patients with poor prognosis such as in CLL / Richter Syndrome, CML in blastic crisis and in the majority of AML. Although WB is considered as standard methodology for p53 detection, our results show that FC can be satisfactorily used for detection of this protein in leukemic cells.

Key words: p53 protein; Western blot; Flow cytometry; Leukemia.

INTRODUÇÃO

Mutações e inativações do *gene p53* são as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 50% das neoplasias¹⁻³. Nas hemopatias malignas, as alterações do gene p53 são observadas com menor frequência do que em tumores sólidos, predominando nas doenças mais avançadas e com curso clínico desfavorável⁴⁻⁸.

A proteína p53 funcional (wild type ou wt) apresenta meia vida curta (10 a 20 minutos) e atua na regulação do ciclo celular, reparo do DNA e, dependendo da extensão da lesão, indução da apoptose das células geneticamente instáveis, mantendo desta forma a integridade do genoma^{1-4, 5, 9, 10}.

Uma grande parte das mutações observadas no gene p53 resulta na transcrição e acúmulo de uma proteína mutante e não funcional (p53m), que pode ser facilmente detectada nas células neoplásicas através de métodos imunológicos. Por outro lado, a proteína p53wt raramente pode ser detectada na maioria dos tecidos normais, pois tem uma sobrevivência efêmera, contrastando com a p53m que é estável e, por isso, detectável por várias metodologias¹⁻⁵.

A proteína p53 pode ser detectada utilizando-se anticorpo monoclonal (AcMo) anti-p53 originando a formação do complexo antígeno-anticorpo possível de ser detectado, obedecendo-se as particularidades e complexidade de cada metodologia. Pode-se utilizar para tanto, amostras de cortes histológicos (imunohistoquímica / IHQ)^{4, 5, 11}, células em suspensão

(citometria de fluxo / CF)^{4, 12-15}, imprint de tecidos (imuno-citoquímica / ICQ)^{4, 16} ou lisados celulares (Western blot / WB)^{4, 17, 18}.

O WB é um método analítico que utiliza o alto poder de resolução da eletroforese em gel de poliácridamida e a determinação do peso molecular da proteína em questão com a especificidade da imunoquímica¹⁹. As proteínas resultantes da separação eletroforética são transferidas do gel de poliácridamida para uma membrana de nitrocelulose, imediatamente após a corrida eletroforética, e seguida da incubação com anticorpo primário e de uma segunda incubação com um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. O sistema revelador contém uma substância que ao reagir com o conjugado emitirá luz. Essa membrana quando exposta a um filme radiográfico revela a presença da banda protéica específica para o AcMo empregado¹⁹.

O WB é um método de alta especificidade e sensibilidade, sendo a técnica referida como "padrão ouro" para a detecção de proteínas. No entanto, por se tratar de uma técnica demorada e com várias etapas de execução, sua aplicação prática tem sido dificultada principalmente quando se emprega um grande número de amostras. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos trabalhos de pesquisa, em detrimento de outras metodologias que são mais rápidas e de fácil execução¹⁷.

A CF tem se destacado como um método eficaz para a detecção de antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares e pode ser utilizada na detecção da proteína p53 em células tumorais^{12-15, 20, 32}. Esta metodologia apresenta a vantagem de ser uma

técnica semi-automatizada em que se pode processar e analisar, conjuntamente, um grande número de amostras em tempo reduzido²⁰. Adicionalmente, a CF apresenta como vantagem a possibilidade da análise multiparamétrica, fornecendo informações adicionais tais como análise simultânea de dois ou mais antígenos além da quantificação antigênica²⁰.

Na pesquisa da proteína p53 pela CF, as células são inicialmente permeabilizadas e posteriormente incubadas com AcMo anti-p53 conjugado a um fluorocromo^{12-15, 20}. Após este procedimento elas são introduzidas por aspiração no CF, e neste são conduzidas através de um fluxo de líquido isotônico até um compartimento denominado câmara de fluxo "*flow cell*". Nesse compartimento, um feixe de raios laser incide sobre cada célula, sendo uma parte, bloqueado frontalmente ("*Forward Scatter*" ou FSC) e outra parte dispersada lateralmente ("*Side Scatter*" ou SSC). A fração FSC é relativa ao tamanho da célula e a SSC representa a complexidade intracitoplasmática, que nas células sanguíneas caracteriza a granulosidade interna²⁰. Caso as células expressem o antígeno em estudo ela estará marcada com um anticorpo conjugado a um fluorocromo. No caso das mesmas expressarem outros antígenos para os quais inclui-se a incubação com diferentes anticorpos específicos, as células mostrarão diferentes combinações de anticorpos-fluorocromos. A incidência de raio laser sobre estes fluorocromos causará sua excitação e conseqüente emissão de luz de diferentes comprimentos de onda (por exemplo: isotiocianato de fluoresceína - verde; ficoeritrina - laranja)²⁰.

O objetivo desse trabalho foi detectar a expressão da proteína p53 em células leucêmicas utilizando duas metodologias distintas: CF e WB e correlacionando com os parâmetros clínicos e laboratoriais, tais como os estágios evolutivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram analisadas amostras de sangue periférico (SP) e/ou medula óssea (MO) de 22 indivíduos com hemopatias malignas, atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital de Câncer, Instituto Nacional de Câncer (INCA/RJ): 8 amostras de leucemia linfocítica crônica (LLC), 6 de leucemia mielóide crônica (LMC); 5 de leucemia mielóide aguda (LMA) e 3 de leucemia linfóide aguda (LLA). Das amostras procedentes de pacientes com LLC, 3 foram examinadas na ocasião do diagnóstico, 4 durante o tratamento e uma em transformação para síndrome de Richter (SR). Nos indivíduos acometidos por LMC, um estava em fase crônica e 5 em crise blástica. Dos 5 pacientes com LMA, 4 foram estudados na ocasião do diagnóstico e um estava em recaída. Os três casos de LLA foram estudados na ocasião do diagnóstico.

O diagnóstico e a classificação das leucemias foram baseados em dados clínicos, hematológicos e pelos critérios de classificação citomorfológica proposto pelo grupo French-American-British (FAB) para o diagnóstico das leucemias agudas²¹, imunofenotipagem e citogenética convencional.

LINHAGENS CELULARES - CONTROLES.

As linhagens de células leucêmicas humanas foram, mantidas em meio de cultura (RPMI-1640, Sigma), suplementadas com 10% de soro bovino fetal inativado (SBF, Biomast, Brasil), e mantidas em estufa com 5% de CO₂, segundo a recomendação do American Type Culture Collection (ATCC)²². As linhagens Raji^{23, 24} e Namalva²⁴ que expressam a p53m e as linhagens MT-2²⁵ e C91pl²⁶, que expressam a p53wt foram utilizadas como controles positivos de expressão e as linhagens K562^{26, 27}, Lucena²⁶, Daudi²⁶, HL-60^{26, 28-30} e Jurkat²⁶ como controles negativos (Tabela I). Paralelamente,

Tabela I- Linhagens de células leucêmicas humanas empregadas como controle

Linhagem Celular	Origem	Proteína p53 (expressão)	Gene p53 (status)	Referências
HL-60	Leucemia promielocítica	Negativo	Deleção	26, 28-30
K562	Leucemia mielóide crônica em crise blástica	Negativo	Mutada	26, 27
Lucena	Derivada da linhagem K562	Negativo	NR	26
MT2	Leucemia de células T do adulto	Positivo	Selvagem	25, 26
C91pl	Leucemia de células T do adulto	Positivo	NR	26
Raji	Linfoma de Burkitt	Positivo	Mutada	23, 24, 26
Namalva	Linfoma de Burkitt	Positivo	Mutada	24, 26
Daudi	Linfoma de Burkitt	Negativo	Mutada	24, 26
Jurkat	Linfoma linfoblástico de células T	Negativo	NR	26

NR: dados não citados na literatura consultada.

utilizamos células mononucleares de 40 indivíduos sadios (doadores de sangue) para o estabelecimento do ponto de corte dos níveis de expressão da proteína p53 pela CF.

As amostras dos pacientes e doadores de sangue foram coletadas após os indivíduos ou seus representantes legais serem esclarecidos dos objetivos do presente trabalho e assinado o termo de consentimento pós-informado.

MÉTODOS

Separação de células mononucleares

Amostras de MO e SP foram coletadas em tubos heparinizados e as células mononucleares separadas em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque, 1077- Sigma). Após esse procedimento, as células mononucleares foram lavadas três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressuspensas em meio de cultura RPMI (RPMI 1640-Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF-Gibco) sendo ajustadas para a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/ml.

Teste de viabilidade celular

As células mononucleares foram incubadas em solução de azul de tripan (Merck) a 0,5% em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,4), na proporção de 9/1. Após homogeneização, a mistura foi observada ao microscópio óptico com objetiva de 20X, sendo descartadas as amostras com viabilidade inferior a 80%.

Deteção da proteína p53

A detecção da proteína p53 foi realizada pela CF e WB em suspensões e lisados de células mononucleares de amostras de pacientes leucêmicos, doadores sadios e de linhagens de células leucêmicas, com o AcMo anti-p53 (DO-7, Dako, Carpintaria, CA, USA), que reconhece o epitopo N-terminal da proteína p53 WT e mutada^{13, 17, 26}.

Citometria de fluxo

A fixação e a permeabilização das células mononucleares foram realizadas, empregando-se a solução de lise celular da Becton-Dickinson (Becton Dickinson's FACS lysing solution, San José CA, USA)³¹⁻³⁴. A suspensão celular foi ajustada para a concentração $1,0 \times 10^6$ células/ml/tubo e sobre a mesma, adicionada 1 ml da solução de lise previamente diluída a 10% em água destilada, e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em PBS-tween 20 (Merck) a 2%, seguido de nova centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em solução de PBS com 5% de SBF e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, para

bloquear as ligações inespecíficas. Após o descarte do sobrenadante o sedimento foi ressuspendido em PBS-tween-20 e centrifugado a 1.500 rpm durante 5 minutos, seguido pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento foi pipetado 10ml de AcMo anti-p53 conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC). A mistura foi então homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após essa etapa, o sedimento foi ressuspendido em solução de PBS-tween-20 a 0,5% e centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos, sendo esta etapa repetida mais uma vez. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1 ml de PBS com formalina (Merck) a 1%, preservando à temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise no CF. Para cada amostra testada foi utilizado um controle de marcação inespecífica (IgG 1-FICT, DAKO, Carpintaria, CA, USA).

As leituras e as análises foram realizadas no CF (Fluorescence Activated Cell Analyser - FACScan da *Becton Dickinson*, San-Jose, Ca, USA), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest™ Software, Becton Dickinson immunocytometry systems, San Jose, CA, USA) com aquisição de 40.000 eventos, utilizando-se uma janela de análise (gate) a partir dos parâmetros FSC e SSC. A partir do gate das células em estudo, obtivemos histogramas de intensidade de fluorescência do FITC, em escala logarítmica fornecida pelo CF, que varia de 0 a 104 log da fluorescência dos tubos contendo células marcadas com o AcMo e respectivo controle isotópico (Figura 1)

Os resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células positivas, e de forma quantitativa determinados pela intensidade média de fluorescência - razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) da amostra em estudo e do respectivo controle negativo^{15,26} e o valor D do teste de Kolmogorov-Smirnov (teste KS)^{35, 36}.

Western blot

Preparo das amostras

As amostras foram preparadas por lise direta de 10^6 células, em 20 ml de tampão de lise (10 mM EDTA, 60 mM de pirofosfato, 40mM tris-HCl pH 6,8), acrescida de 20 ml de SDS (solução a 10%) e 20 ml de tampão de amostras (115 mM tris-HCl pH 6,8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-b-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) e incubadas a 95°C por 10 minutos, sendo mantidas a -20°C até serem usadas.

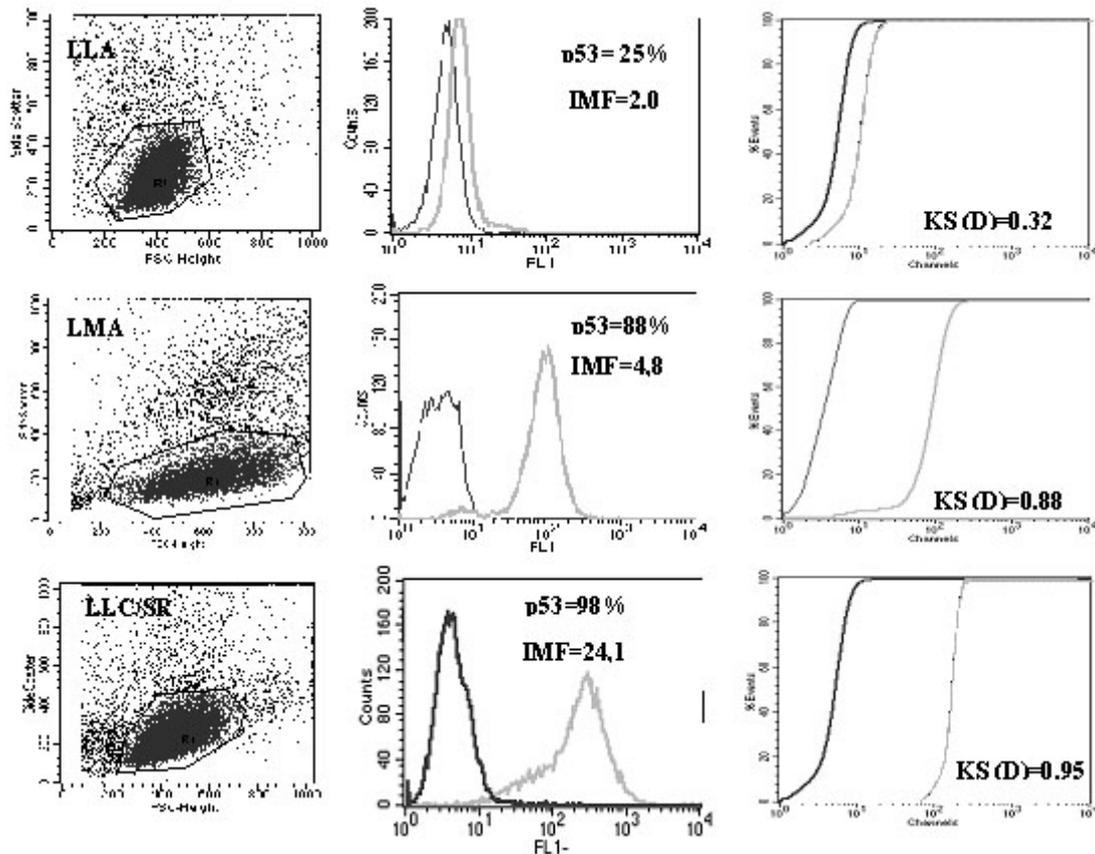
Eletroforese de proteínas

Para cada amostra, 2×10^6 células foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (acrilamida/bis-acrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 12%

Figura 1- Expressão da proteína p53 por citometria de fluxo em amostras de pacientes leucêmicos.

As amostras foram incubadas com anticorpo monoclonal (AcMo) I anti-p53 conjugado ao FITC. Coluna da esquerda: representação gráfica das características físicas das células determinadas pelo espalhamento luminoso. O FSC (forward scatter) representa o tamanho das células e SSC a complexidade interna das células. Coluna do meio: expressão da proteína p53 avaliada através da relação da intensidade média de fluorescência (IMF) das células marcadas com o AcMo anti-p53 e células da mesma amostra incubadas com anticorpo isotípico e também pelo percentual de células p53 positivas. Coluna da direita: representação gráfica do teste Kolmogorov-Smirnov.

LMA: leucemia mieloide aguda; LLC/SR: leucemia linfocítica crônica em transformação para Síndrome de Richter e LLA: leucemia linfóide aguda.



preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empilhamento (*stacking gel*) a 3% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS. A composição do tampão de eletroforese foi 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 200 mM de glicina e 1% de SDS. A eletroforese das proteínas foi realizada a 70 Volts em gel 14cm X 16 cm com duração de 16 horas.

Transferência das bandas protéicas para suporte sólido

Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semi-seca (Hoeffer-Scientific), por 2 horas, sendo a amperagem estabelecida em função da área da membrana.

Marcação AcMo anti-p53

Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de nitrocelulose, foi incubada por 2 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS (10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada 2 vezes em tampão TBS-tween 0,2% por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com o AcMo anti-p53 (clone DO-7 DAKO), diluído 1/2000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS, por 16 horas na temperatura de 2 a 8°C.

Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes (15 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-tween 0,2%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG F(ab)2

HRP - PIERCE), diluído 1/4.000 em leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS, por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida de 6 lavagens (15 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-tween.

Revelação

A banda da proteína p53 foi revelada utilizando-se o Kit ECL (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), de acordo com as especificações do fabricante e exposição da membrana a um filme de raio X (MAMOM KODAK) por 10 minutos e revelação em máquina de raio-X (Kodak).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas utilizando os testes do qui-quadrado (χ^2) empregando-se o software EPI-INFO 6.04 e a análise de variância (ANOVA) pelo *software* SPSS 9.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Foram também construídos os gráficos de correlação linear comparando os diversos parâmetros obtidos na CF. Os valores D do teste KS foram obtidos no software do próprio citômetro de fluxo.

RESULTADOS

Nas 40 amostras de doadores de sangue, observamos as seguintes variações: 0 a 4% de células positivamente marcadas; 1,0 a 1,4 nos valores do IMF e resultados do teste KS (D) variando de 0,01 a 0,08. Resultados similares foram observados nas amostras de células das linhagens leucêmicas: HL-60, K562, Lucena, Daudi e Jurkat.

Nas linhagens leucêmicas, constatamos uma correlação de 100% entre os resultados obtidos pelo WB e CF, com expressão positiva da proteína p53 nas linhagens Namalva, Raji, C91pl e MT2 e negativa nas linhagens HL-60, K562, Lucena, Daudi e Jurkat. Nessas linhagens, as análises da quantificação antigênica, obtidas pela CF, revelaram resultados variados para o IMF e valor D do teste KS. Os valores mais elevados, na maioria dos casos, foram observados nas células com p53 positiva pelo WB. Estes resultados, nas células com p53 negativa pelo WB, foram menores e similares aos observados nos linfócitos dos doadores saudáveis (Tabela II e Figuras 2a e 2b).

Nas amostras dos pacientes leucêmicos, houve concordância de resultados na maioria dos casos ($P=0,002$, teste χ^2). Observamos 9 amostras duplamente positivas (CF+/WB+) e duplamente negativas (CF-/WB-). Resultados discordantes, (CF+ / WB-) e (CF-/WB+), foram observados em 4 amostras. As amostras duplamente positivas foram aquelas correspondentes a uma evolução clínica desfavorável, como LLC/SR (1 caso), LMC /CB (4 casos), LMA (1 secundária e 2 de novo) e 1

Tabela II - Expressão da proteína p53 em linhagens de células leucêmicas pela citometria de fluxo e Western blot.

Células	Citometria de Fluxo			Western blot
	%*	IMF*	KS (D)*	Status
HL60	0	1,0	0,01	negativo
K562	0	1,3	0,05	negativo
Lucena	0	1,2	0,04	negativo
Jurkat	0	1,0	0,01	negativo
MT2	87	3,5	0,85	positivo
C91pl	87	4,2	0,86	positivo
Raji	93	51,3	1,00	positivo
Namalva	93	42,4	0,93	positivo
Daldi	3	1,1	0,04	negativo

(*): média dos valores determinados pela realização dos testes em triplicata; %: percentual de células marcadas; IMF: intensidade média de fluorescência; KS (D): Valor D do teste Kolmogorov-Smirnov.

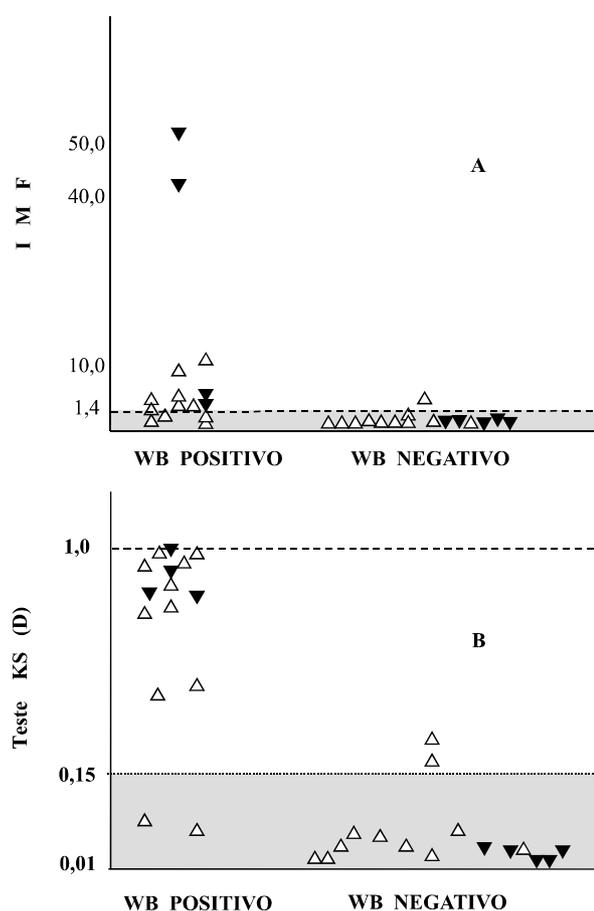


Figura 2- Distribuição dos valores do índice médio de intensidade de fluorescência (A) e valor D do teste Kolmogorov-Smirnov (B) versus os resultados do Western blot em amostras de pacientes (Δ) e linhagens leucêmicas (\blacktriangledown). Valores discriminados na área cinza, representam os resultados negativos.

caso de LLA recém diagnosticada. Todas essas amostras apresentaram percentual elevado da expressão da proteína p53, juntamente com níveis elevados do IMF e valor D do teste KS (Tabelas III e IV).

Amostras duplamente negativas foram observadas em 5 casos de LLC (3 recém diagnosticadas e 2 em fase de acompanhamento terapêutico), 1 caso de LMC em crise blástica, 2 casos de LMA (1 de novo e 1 em recaída) e 1 de LLA recém diagnosticada. Nesses casos, observamos que a expressão da proteína p53 foi similar nas amostras dos doadores e nas linhagens Jurkat, HL-60, K562, Lucena e Daudi, que foram utilizadas como controles negativos (Tabelas II e III e Figuras 2a e 2b).

Constatamos 4 amostras com resultados discordantes, 2 com CF+/WB- (1 LMC em FC e 1

LLA recém-diagnosticada) e 2 com CF-/WB+ (2 LLC em acompanhamento terapêutico).

Nas 2 amostras com resultados CF+/WB- os parâmetros: IMF, valor D do teste KS e percentual de células p53 positivas, foram menores, porém ainda acima do limiar de negatividade.

Nas duas amostras com resultados CF-/WB+, os resultados da CF são similares aos encontrados nas amostras duplamente negativas.

Na análise envolvendo a correlação linear entre os parâmetros IMF, valor D do teste KS e percentual de células p53 positivas, observamos uma tendência para correlação positiva entre esses parâmetros tanto no grupo de pacientes, como no grupo de doadores e linhagens celulares. Essa correlação foi positivamente acentuada, para

Tabela III - Expressão da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot.

Paciente	Diagnóstico	Status	Expressão da proteína p53			
			Citometria de fluxo			Western blot
			%	IMF	KS (D)	
1	LLC	transformada	74%	4,1	0,95	Positivo
2	LLC	diagnóstico	0%	1,0	0,01	Negativo
3	LLC	TT	0%	1,2	0,08	Negativo
4	LLC	TT	0%	1,2	0,09	Negativo
5	LLC	TT	0%	1,3	0,10	Positivo
6	LLC	TT	1%	1,3	0,13	Positivo
7	LLC	diagnóstico	0%	1,2	0,05	Negativo
8	LLC	diagnóstico	0%	1,0	0,01	Negativo
9	LMC	CB	20%	2,2	0,53	Positivo
10	LMC	CB	98%	11,9	0,98	Positivo
11	LMC	CB	81%	4,5	0,81	Positivo
12	LMC	FC	35%	1,5	0,39	Negativo
13	LMC	CB	4%	1,2	0,10	Negativo
14	LMC	CB	54%	2,1	0,56	Positivo
15	LMA	secundária	96%	10,0	0,99	Positivo
16	LMA	diagnóstico	0%	1,0	0,05	Negativo
17	LMA	de novo	88%	4,8	0,88	Positivo
18	LMA	de novo	92%	4,1	0,94	Positivo
19	LMA	de novo	0%	1,1	0,02	Negativo
20	LMA	de novo	79%	3,3	0,79	Positivo
21	LLA	de novo	25%	2,0	0,32	Negativo
22	LLA	de novo	0%	1,0	0,04	Negativo

%; percentuais de células marcadas, IMF: intensidade média de fluorescência, KS (D): Valor D do teste Kolmogorov-Smirnov; LLC: leucemia linfocítica crônica; LMC: leucemia mielóide crônica; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; CB: crise blástica; FC: fase crônica; TT: em tratamento. $P=0,002$

os três grupos, quando utilizamos o percentual de células p53 positivas versus o valor D do teste KS, onde sempre obtivemos um valor de $R^2 > 0,90$ (Tabela V e Figura 3).

Tabela IV- Análise de variância entre os resultados obtidos pela citometria de fluxo e Western blot em 22 amostras de pacientes leucêmicos .

Variável	Western blot negativo		Western blot positivo		p
	$\bar{X} \pm dp$	n=11	$\bar{X} \pm dp$	n=11	
%	10 ± 24,7		57,9 ± 37,9		0,002
IMF	1,22 ± 0,30		4,51 ± 3,44		0,005
KS (D)	0,11 ± 0,13		0,70 ± 0,33		<0,001

%; percentual de células positivas; IMF: índice médio de fluorescência; KS: teste de Kolmogorov-Smirnov. $\bar{X} \pm dp$ = média ± desvio padrão.

Tabela V- Parâmetros obtidos na citometria de fluxo em amostras dos pacientes, linhagens leucêmicas e doadores de sangue.

Amostras	R ²	R ²	R ²
	IMF x KS (D)	% x IMF	% x KS (D)
Pacientes, n=22	0,62	0,67	0,99
Linhagens, n=9	0,50	0,50	0,99
Doadores, n=40	0,92	0,99	0,93

%; percentual de células positivas; IMF: índice médio de fluorescência; KS: teste de Kolmogorov-Smirnov; R²: Teste de correlação linear

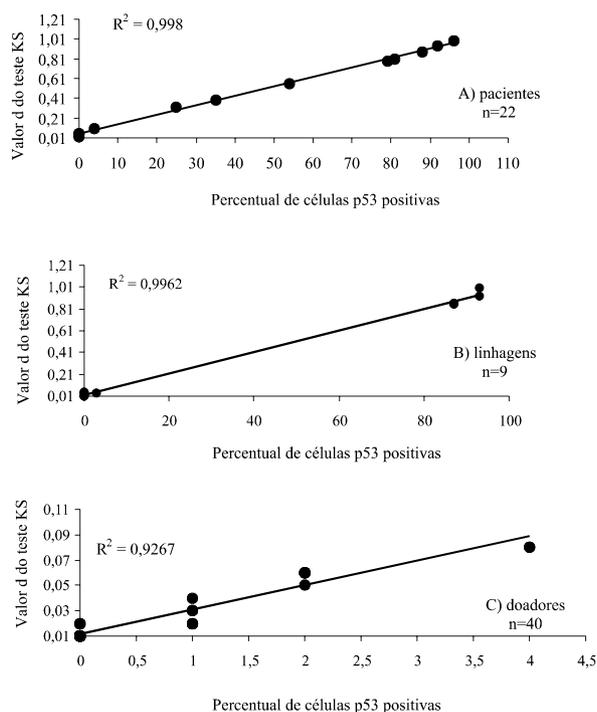


Figura 3 - Análise de correlação linear da expressão da proteína p53 com os diversos parâmetros obtidos na citometria de fluxo: A, amostras dos pacientes; B, amostras procedentes das linhagens de células leucêmicas e C, amostras dos doadores.

DISCUSSÃO

Embora as alterações do gene e proteína p53 ocorram com menor frequência nas neoplasias do sistema hematopoético do que em tumores sólidos, diversos trabalhos têm destacado a relevância clínica das disfunções desse gene e / ou inativação de seu produto de transcrição. A associação entre a mutação e a superexpressão da proteína p53 e a evolução clínica desfavorável nas leucemias tem sido observada^{5-8, 12, 14, 28}. Nessas neoplasias, mutações do gene p53 são encontradas em 25 a 30% dos linfomas de Burkitt, na LMC em crise blástica em 25%, em 5 a 10% das LMA, síndrome mielodisplásica (SMD), linfomas não Hodgkin (LNH) e LLC, exceto nas transformações para SR onde este percentual é mais elevado. Essas mutações são raramente observadas na LLA, exceto nas recaídas e no tipo citomorfológico L3^{4-8, 12-14, 28}.

As mutações, em geral do tipo missense, podem ser demonstradas por técnicas moleculares como o single strand conformation polymorphism (SSCP) ou métodos de seqüenciamento de DNA^{4-5, 11}. No entanto, por serem metodologias dispendiosas e demoradas em que são necessárias várias etapas de processamento, sua utilização na rotina torna-se restrita, principalmente quando se processa um grande número de amostras. Outra limitação para o emprego dessas técnicas de biologia molecular, no estudo de mutações do gene p53 nas leucemias, é a frequente contaminação das amostras por células não tumorais, levando a amplificação de alelos não mutados do gene p53 e a resultados falso-negativos, o que dificulta a realização e a interpretação desses resultados^{37, 38}.

Em nosso trabalho, investigamos a expressão da proteína p53 em linhagens de células leucêmicas, em células normais de doadores de sangue e em leucêmicas, comparando dois métodos de detecção: o WB e a CF.

O WB é classicamente referido como método padrão ouro na pesquisa da proteína p53 em células tumorais. Porém, sua aplicabilidade na rotina laboratorial deve ser discutida em função de algumas particularidades desse método, como as numerosas etapas de processamento, o que demanda um longo tempo para obtenção dos resultados, podendo também ser apontada como uma das causas de erro^{5, 18, 26}. Há necessidade da utilização de diversos equipamentos de apoio e manipulação de substâncias químicas tóxicas e carcinogênicas. Esses fatores também podem ser tomados como indicadores para elevação dos custos e dificultam a sua aplicação na rotina laboratorial.

Ultimamente a CF tem se destacado como um método de detecção de antígenos de superfície e intracelulares, podendo também ser empregada na detecção da proteína p53^{5, 12-15, 20, 26, 30}. A marcação prévia de células com AcMo conjugado a diferentes fluorocromos possibilita a análise

de uma célula com uma determinada característica física e/ou química, mesmo em amostras com diferentes populações celulares²⁰. Estas peculiaridades da CF possibilitam o emprego dessa metodologia na área de imunologia e onco-hematologia, na caracterização de antígenos celulares, nas imunodeficiências³⁹, no diagnóstico de processos leucêmicos^{31-34, 40-42}, na detecção da doença residual mínima⁴³ e durante a evolução e tratamento dessas doenças³¹⁻³⁴.

Para detecção da proteína p53 pela CF, conhecendo-se seus aspectos fisiológicos, procurou-se estabelecer um protocolo de fixação e permeabilização que possibilitasse o acesso e direcionamento do AcMo ao núcleo das células preservando, ao mesmo tempo, suas características físico-químicas^{12-15, 26}. Por se tratar de um procedimento semi-automatizado, a CF apresenta vantagens em termos de viabilidade de execução ao utilizar-se amostras recém obtidas e a reação imunológica se processar diretamente na própria célula.

Existem diferentes protocolos descritos na literatura com o emprego de metanol^{12, 14, 20}, saponina^{13, 20}, além de kits comerciais para lise e permeabilização celular^{20, 26, 31-34, 44}. Porém, o emprego desses reagentes em processos de permeabilização celular tem gerado resultados com eficiência controversa^{20, 44}. Farrat e colaboradores, em 1994³¹, descreveram um método de pesquisa de antígenos intracitoplasmáticos em células leucêmicas, preservando ao mesmo tempo, os sinais de difração de luz, a antigenicidade dos epitopos e o acesso dos anticorpos ao interior das células permeabilizadas. Este protocolo foi, recentemente, reproduzido com sucesso por nosso grupo na pesquisa da proteína p53 em linhagens de células tumorais, onde obtivemos uma correlação de 100% dos resultados com a ICQ e WB²⁶. No presente estudo, esse protocolo foi empregado com modificações e observamos uma boa correlação com os resultados do WB em amostras de pacientes leucêmicos ($P=0,002$) e em 100% nas amostras procedentes de linhagens celulares leucêmicas.

Existem várias formas de se avaliar os resultados na CF. Em nosso estudo, utilizamos: i) a percentagem de células p53 positivas^{26, 39}, ii) mudança do canal médio de fluorescência calculado pela razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) da amostra marcada com o AcMo e da respectiva amostra marcada com o controle isotópico^{15, 26, 40} e iii) o valor D do teste estatístico Kolmogorov-Smirnov (teste KS)^{35, 36}. O teste KS analisa e compara os histogramas, gerados pelas células que foram marcadas com o AcMo e as marcadas com o controle isotópico do ensaio. Ele mede a diferença entre as duas curvas de distribuição, gerando um valor D, sendo calculado pelo próprio software do CF, e considerado como positivo para os valores $D \geq 0,15$ ^{35, 36}. Esse teste consegue detectar células pouco marcadas, identificando diferenças de fluorescência entre

as amostras testadas com o AcMo e células da mesma amostra marcadas com o controle inespecífico. Desta forma, quanto mais alto o valor D, maior será a diferença entre as curvas. Quando D for $> 0,30$ a amostra será intensamente positiva, se o valor D estiver entre 0,15 e 0,25 a intensidade antigênica será moderada, baixa quando o valor D estiver entre 0,05 e 0,14 e ausência de fluorescência quando o valor de D for menor que 0,05^{35, 36}.

A reprodutibilidade desse método foi demonstrada em nosso trabalho, pela realização dos testes em triplicata nas linhagens leucêmicas e em linfócitos normais procedentes de 40 doadores de sangue. Nessas amostras, estabeleceu-se valores que serviram como parâmetros para definir um ponto de corte, visando identificar a expressão da proteína p53 pela CF. Observou-se variação de 0 a 4% para o percentual de células marcadas; 1,0 a 1,4 nos valores do IMF e valores de D do teste KS variando de 0,01 a 0,08.

Nas linhagens leucêmicas K562, Lucena, HL-60, Daudi e Jurkat, que não expressam a proteína p53, obtivemos resultados similares aos observados em amostras dos doadores, com resultados negativos no WB. A linhagens Raji, Namalva, MT2 e C91pl apresentaram percentual de células p53 positivas, IMF e valor D do teste KS superiores aos observados nas amostras dos doadores e nas linhagens, K562, Lucena, Jurkat, Daudi e HL-60, correlacionando-se com os resultados positivos no WB.

As amostras procedentes dos pacientes apresentaram níveis variáveis de expressão para a proteína p53 pela CF. Com os parâmetros obtidos por esse método foi possível fazer a correlação desses resultados com o WB, sendo encontradas 18 amostras com resultados iguais e 4 discordantes entre si ($P=0,002$).

Amostras com resultados p53+ observadas no WB apresentaram, na maioria dos casos, elevado percentual de positividade associando-se aos níveis mais altos de IMF, e valor D do teste KS, quando testadas pela CF. Esses casos corresponderam na maioria das vezes aos pacientes com doenças cuja evolução clínica era mais desfavorável tais como: LLC/SR, LMC em CB e na maioria dos casos de LMA.

Nas amostras com resultados discordantes (CF+/WB) foi observado um percentual menor de células p53+, bem como níveis mais baixos de IMF e valor D do teste KS. Esses valores estão acima dos obtidos nas amostras dos doadores de sangue e linhagens p53 negativa (Lucena, Daudi, Jurkat, K562 e HL-60). Esses achados associados às características metodológicas da CF, tais como simplicidade de execução, utilização de células recém obtidas e o fato da reação imunológica se processar na própria célula (marcação direta), pode refletir, uma maior sensibilidade da CF quando comparada ao WB, que apresenta além da necessidade de maior tempo de execução, a possibilidade da degradação da proteína p53

por proteases, quando o material é estocado em temperatura inadequada ou por um tempo prolongado ²⁶.

Concluindo, os nossos resultados demonstraram que ambos os métodos de estudo: CF e WB são úteis na detecção da proteína p53 em células leucêmicas.

A CF pode ser uma metodologia mais adequada em função da simplicidade de execução, sensibilidade e fornecimento dos resultados em tempo inferior quando comparado com o WB. Desta forma, nossos resultados sugerem que a CF pode ser empregada no estudo da expressão da proteína p53 em células leucêmica.

REFERÊNCIAS

- Beroud C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(1):200-4.
- Soussi T, Dehouche K, Bérout C. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogenèse. *Med Sci Synth.* 2000;16:1378-96.
- Martin A. Le gène suppresseur de tumeur p53 (2^a partie): applications en pathologie humaine. *Ann Pathol.* 1995;15(3):184-91.
- Klumb CE, Cavalcanti GB Jr. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002;24(2):111-25.
- Cavalcanti GB Jr, Klumb CE, Maia RC. p53 e as hemopatias malignas. *Rev Bras Cancerol.* 2002;48(3):419-27.
- Fenaux P. The clinical significance of the p53 supressor gene in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 1997;98:502-11.
- Preudhomme C, Fenaux P. p53 et hemopathies malignes. *Pathol Biol.* 1997;45(10):777-908.
- Imamura J, Miyoshi I, Koeffler P. p53 in hematologic malignancies. *Blood.* 1994;84(8):2412-21.
- Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F, Depper W. The dual role model for p53 maitaining genomic integrity. *Cell Mol L Sci.* 1999;55:12-27.
- Yonish-Rouach E. A question of life or death: the p53 tumor supressor gene. *Pathol Biol.* 1997;45(10):815-23.
- Klumb CE, Furtado DR, de Resende LM, Carriço MK, Coelho AM, de Meis E, et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutation in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol.* 2003;71:81-90.
- Konikova E, Kuseuda O, Babusikova I. Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma.* 1999;46(6):368-76.
- Fillippini G, Griffin S, Uhr M, Eppenberger H, Bonilla J, Cavalli F, et al. A novel flow cytometry method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry.* 1998;31:180-6.
- Konikova E, Kuseuda O. Flow cytometry of p53 protein expression in some hematological malignancies. *Neoplasma.* 2001;48(4):290-8.
- Kimura O, Sugamura K, Kijima T, Makino M, Shigeru T, Ito H, et al. Flow cytometry examination of p53 protein in primary tumors and metastases to the liver and lymphonodes of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1996;39(12):1428-33.
- Tiniakos DG, Healicon RM, Hair T, Wadehra V, Horne CHW, Angus B. p53 immunostaining as a marker of malignancy in cytologic preparations of body fluids. *Acta Cytol.* 1995;39:171-6.
- Bonsing BA, Cover WE, Gorsira MCB, van Viet M, Oud PS, Cornelisse CJ, et al. Specific of seven Monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. *Cytometry.* 1997;28:11-24.
- Turpeinen M, Serpi R, Rahkolin M, Vähäkangas K. Comparison of anti p53 antibodies in immunoblotting. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:850-6.
- Margni R, Mailchiodi EL, Chiaramonte MG. Electroforese en gel de poliacrilamida; isoelectroenfocado; inmunotransferencia (immunoblotting). In: Margni RA. *Inmunología e immunoquímica: fundamentos.* 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. cap. 21, p. 981-8.
- Mark JJ, Heller R. *Methods in molecular biology: flow cytometry protocols.* Totowa: Humana Press; 1988. vol. 91.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981;47:553-61.
- American Type Culture Collection [homepage on the Internet]. [cited 2003 Dec]. Available from: <http://www.atcc.org>.
- Duthu A, Debuire B, Romano J, Ebrhart J, Fiscella M, May E, et al. p53 mutations in Raji cells: characterizations and localizations relative to other Burkitt's lymphomas. *Oncogene.* 1992;7(11):2161-7.
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inhirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutation in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5413-541.
- Mahieux R, Pise-Masison CA, Nicot C, Green P, Hall WW, Brady JN. Inactivation of p53 by HTLV type I and HTLV-type 2 Tax trans-Activators. *Aids Res Hum Retrovir.* 2000;16(16):1677-81.
- Cavalcanti GB Jr, Scheiner MAM, Oliveira JGP Vasconcelos FC, Ferreira ACS, Maia RC. Citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa. *Rev Bras Anal Clin.* 2003;35(3):135-42.

27. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of p53 gene in the human erithroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res.* 1993;17(12):1045-50.
28. Prockocimer M, Shakai M, Ben Bassat H, Wolf D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. *Blood.* 1986;68(1):113-8.
29. Siles E, Villalobos M, Valenzuela MT, Núñez MI, Gordon A, McMillan TJ, et al. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1996;73:581-8.
30. Danova M, Giordano M, Mazzini G, Riccardi A. Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. *Leuk Res.* 1990;14(5):417-22.
31. Faharat N, van der DP, Praxedes M, Morila R, Matutes E, Catovsky D. Demonstration of cytoplasmic and nuclear antigens in acute leukaemia using flow cytometry. *J Clin Pathol.* 1994;47:843-9.
32. Syrälä MT, Tiirikainen M, Jansson ST, Krusius T. Flow cytometry analysis of terminal deoxynucleotidyl transferase. A simplified method. *Am J Clin Pathol.* 1993;99:298-303.
33. Drach D, Drach J, Glassi H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometry detection of cytoplasmic antigens in acute leukemias: implications for lineage assignment. *Leuk Res.* 1993;17(5):455-61.
34. Slaper-Cortenbach ICM, Admiraal LG, Kerr JM, van Leeuwen EF, von dem Borne AEGK, Tetteroo PA. Flow-cytometry detection of terminal deoxynucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphatic leukemias. *Blood.* 1988;72(5):1639-44.
35. Young IT. Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J Histochem Cytochem.* 1997;25(7):935-41.
36. Lampariello F. On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. *Cytometry.* 2000;39:179-88.
37. Soussi T, Dhouche K, Bérout C. p53 Website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2000;15:105-13.
38. Tönisson N, Zernant J, Kurg A, Hendrik P, Slavim G, Hanno R, et al. Evaluating the arrayed primer extension resequencing assay of TP53 tumor suppressor gene. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2000;299:5503-8.
39. Rodrigues CS, de Queiros MGL, Sales VSF, Brito TNS, da Fonseca HEM, Paiva AS, et al. Estudo comparativo entre duas técnicas de contagem de subpopulação de células T em indivíduos infectados e não infectados com o vírus da imunodeficiência humana. *Rev Bras Anal Clin.* 2002;34(2):95-101.
40. Maynadié M, Picard F, Husson B, Chatelain B, Cornet Y, le Roux G, et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2002;100(7):2349-56.
41. Weir EG, Borowitz MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemias. *Semin Hematol.* 2001;38(2):124-38.
42. Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol.* 2001;38(1):111-23.
43. Stetler-Stevenson M. Novel methods in detection of minimal residual non-Hodgkin lymphoma. *Cytotherapy.* 1999;1:336-40.
44. Macey MG, McCarthy DA, Milene T, Cavenagh JD, Newland AC. Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotype analysis by flow cytometry. *Cytometry.* 1999;38(4):153-60.