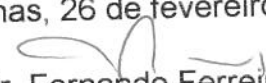


Edson Shusaku Shitara

**“MUTAÇÕES DO GENE N-*ras*
EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO”**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Patologia Clínica do aluno **Edson Shusaku Shitara**.

Campinas, 26 de fevereiro de 2002.


+ Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Orientador



2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Edson Shusaku Shitara

**“MUTAÇÕES DO GENE *N-ras*
EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Patologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando F. Costa



2002

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
SR68m
V EX
TOMBO BC/ 50012
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00170694-0

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

BIB ID 246987

Sh68m Shitara, Edson Shusaku
"Mutações no gene N-ras em pacientes com mieloma múltiplo" /
Edson Shusaku Shitara. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biologia Molecular. 2. Mieloma múltiplo. 3. Gene. 4.
Mutação(Biologia). 5. Carcinogenese. I. Fernando Ferreira Costa.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Gisele Wally Braga Colleoni

2. Carmen Silvia Passos Lima

3. Fernando Ferreira Costa

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/02/2002

20232257

Aos meus pais, Shogo (in memoriam) e Sachiko, pela vida.

A Perla e Pedro Shogo, companheiros de caminhada, baseada no amor.

Aos amigos queridos, pelo apoio, incentivo e carinho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, grande exemplo de seriedade e competência, pela aceitação, apoio e confiança.

Às Profas. Dras. Carmen Sílvia Passos Lima e Gisele Wally Braga Colleoni, membros da banca examinadora, pela atenção, boa vontade e sugestões que aprimoraram este trabalho.

A Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pela atenção, incentivo e iniciação prática de biologia molecular.

A todos os amigos e colegas de Campinas, do laboratório de Imunologia da Profa. Dra. Maria Heloísa S. L. Blotta, e de Biologia Molecular do Hemocentro, pela convivência, auxílio, amizade e torcida, em especial a Manoela Marques Ortega e Dulcinéia Martins de Albuquerque.

A todos os amigos e companheiros de Sorocaba, terra que adotei e que me adotou, da Pró-Hemo, do Diagsom e do Laboratório do Hospital Unimed, representados pelo Frederico, Fábio, Elaine, Bethinha, Mazé, Eliete, Andréa, Márcio, Keila e Sara, com quem aprendi o que é amor à arte.

Aos Drs. Rodolfo P. Machado de Araújo, Gilson L. Delgado e Marie K. Kitanishi, meus padrinhos sorocabanos, a quem sinto gratidão.

Às Profas. Dras. Diana Tannos, da PUC/SP e Maria Elvira Guerra-Shinohara, da FCF-USP, pelo apoio e oportunidades a mim oferecidas.

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), ao Conjunto Hospitalar de Sorocaba (CHS), à Unimed de Sorocaba e à Diagsom Unidade Integrada de Diagnóstico.

A Deus, pela vida e oportunidade de poder servir.

MM	mieloma múltiplo
RFLP	polimorfismo de conformação de hélice simples
DdNTP	dideoxynucleotídeo trifosfato
dNTP	deoxynucleotídeo trifosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
VAD	vincristina, adriblastina, dexametasona
MEK	quinase ativada por mitógeno
PGDF	fator de crescimento derivado de plaquetas
IL	interleucina
TNF	fator de necrose tumoral
DNA	ácido desoxirribonucleico
GTP	guanosina trifosfato
GDP	guanosina difosfato
GAP	proteína ativadora da GTPase
GEF	fator permutador de nucleotídeos de guanina
RTK	receptor tirosina-quinase
GST	gene supressor de tumor
Ig	imunoglobulina
CD	determinante clonal
FISH	fluorescência em hibridização <i>in situ</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
NGF	fator de crescimento neural
EGF	fator de crescimento epidérmico
Kd	quilodaltons
TE	tris-EDTA
PR	em progressão
CN	caso novo (ao diagnóstico)
MO	medula óssea
ID	idade
PL	plasmócitos
SIT	situação
SF	soro fisiológico

RESUMO	viii
SUMMARY	10
INTRODUÇÃO	12
Considerações gerais	13
Quadro clínico	13
Epidemiologia	16
Biologia do mieloma múltiplo	17
Etiopatogenia	19
Estadiamento e prognóstico	19
Transdução de sinais	20
Gene <i>ras</i> e proteína Ras	22
Oncogene <i>ras</i>	27
OBJETIVOS	32
CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
Extração de DNA	37
Amplificação de fragmentos por PCR	38
Purificação	40
Quantificação do produto de PCR – I	41
Amplificação para seqüenciamento	42
Purificação da reação de seqüenciamento	44
Seqüenciamento automatizado	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	77

RESUMO

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença neoplásica maligna que se desenvolve em células linfocitárias de linhagem B, em sua fase mais evoluída, chamada de plasmocitária. Ele é caracterizado pela tríade formada por infiltração plasmocitária de medula óssea (MO), produção de imunoglobulinas (Igs) monoclonais e lesões osteolíticas.

O MM não tem ainda bem esclarecida sua patogênese e etiologia. Fatores diversos são relacionados para justificar a carcinogênese nesta patologia. Mutações no gene *N-ras* estão presentes em aproximadamente 20 a 30 % dos pacientes com esta doença ao diagnóstico, além de acometimento maior quando de atividade do MM.

Neste trabalho, investigamos mutações no proto-oncogene *N-ras* em 44 pacientes com diagnóstico de MM. A metodologia utilizada foi a de amplificação do fragmento do gene *N-ras* através de PCR e determinação da sequência por meio de seqüenciamento automatizado.

Em nossa investigação não encontramos nenhuma mutação do gene em questão.

Concluimos que a ausência de mutações no gene *N-ras* indica, aparentemente, que seu papel não é fundamental na etiopatogenia desta população brasileira avaliada. Este resultado pode sugerir também uma peculiaridade quanto ao uso da terapia gênica que aborde *N-ras* nestes pacientes.

SUMMARY

Various authors met gene *ras* mutation in MM patients, mainly at N- and K-*ras*. The incidence is variable, but a median result is 30-40% at presentation, and until 70% in cases of relapse.

The aim of this study was the determination of the frequency of mutation of the hot-spots codons 12,13 and 61 N-*ras* proto-oncogene. We studied the bone marrow DNA from 44 patients with multiple myeloma.

We used DNA sequencing methodology for identification of mutations at N-*ras* gene. The positive-control was a patient with mutation at codons 12 and 13 of N-*ras* gene from a previous investigation in our laboratory. We didn't find oncogenic mutational alterations.

The result suggests that the mutations of N-*ras* gene are not fundamental importance for pathogenesis of multiple myeloma in the Brazilian population avalied.

INTRODUÇÃO

MIELOMA MÚLTIPLO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O MM, também conhecido como mieloma de células plasmocitárias, mielomatose ou doença de Kahler (KYLE, 1995), é uma proliferação neoplásica maligna caracterizada pela expansão de PLs monoclonais que se disseminam pela MO, causando lesões líticas e produzindo Igs monoclonais (SUKPANICHNANT et al., 1994; BOCCADORO & PILERI, 1997; LINKER, 2001). Pertence a um grupo de desordens referidas como discrasias plasmocitárias, que englobam condições benignas, tal como a gamopatia monoclonal essencial, que em cerca de 18% dos casos pode evoluir para neoplasias plasmocitárias (PASQUALETTI et al., 1996), até situações de grande gravidade e malignidade como a leucemia plasmocítica (BARLOGIE et al., 2001). Por sua vez, as discrasias plasmocíticas fazem parte de uma grande classificação de neoplasias linfóides, mais especificamente de células B (HARRIS et al., 1999). Nesta mesma nova proposta de classificação de neoplasmas hematológicos, sugerida pela Organização Mundial de Saúde, em 1997, as desordens plasmocíticas seriam subdivididas em variantes como mieloma indolente, mieloma osteoesclerótico, plasmocitoma solitário, mieloma não-secretor, entre outros. Essa classificação basear-se-ia em uma combinação de aspectos morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos (DIMOPOULOS et al., 2000).

QUADRO CLÍNICO

Os sintomas observados habitualmente são dor óssea (por fraturas e pelas lesões líticas), redução de peso, fraturas patológicas e aqueles referidos a

hipercalcemia. A maioria dos pacientes tem evidência radiológica de osteólise afetando o crânio, as costelas, os corpos vertebrais, a pelvis e os ossos longos ao diagnóstico (CROUCHER & APPERLEY, 1998). Mais de 50% dos pacientes apresentam as fraturas vertebrais por enfraquecimento ósseo difuso. A fisiopatologia mais aceita para explicar tal processo é um excesso na reabsorção óssea associado à infiltração tumoral. A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) são as principais citocinas envolvidas no desencadeamento e manutenção da atividade osteoclástica (LORENZI, 1998; FELIERS et al., 1999). Essas citocinas, como a interleucina-6 (IL-6), que é considerada o principal fator de estímulo e de sobrevivência das células mielomatosas, são produzidas pelos próprios PLs patológicos e pelas células acessórias da MO (células estromais e histiocitárias), mantendo a base citocina-atividade osteoclástica (BERGER & HAWLEY, 1997; NISHIMOTO et al., 1997; PAPADAKI et al., 1997; PATTENGAL, 1997; GUISE & MUNDY, 1998). Outros autores detectaram o aumento da IL-7, IL-10 e de fator de crescimento transformador (TGF- β 1) em pacientes com MM (KRÖNING et al., 1997).

A anemia provoca cansaço e fadiga. Pode acometer cerca de 2/3 dos pacientes ao diagnóstico. Além da infiltração de células tumorais em MO prejudicando a eritropoiese, a produção de IL-1, TNF-beta e IL-6 também participam na fisiopatologia da anemia nestes casos. A eritropoietina tem sua produção diminuída pelas citocinas acima relatadas, assim como pela insuficiência renal (BARLOGIE et al., 2001).

A insuficiência renal pode provir da deposição de cadeias leves de imunoglobulinas e ao excesso de cálcio, no tecido renal. Com a quantidade aumentada de cadeias leves monoclonais, há uma precipitação destas substâncias em túbulos distais e coletores, formando cilindros que poderão, por sua vez, levar a insuficiência

renal por mecanismos obstrutivos, potencializados por quadros de desidratação. A hipercalcemia, presente em até 25% dos pacientes ao diagnóstico, é causa importante de disfunção renal em pacientes com MM. A hiperuricemia também pode contribuir para esta complicação, pela deposição de cristais de urato nos túbulos distais, coletores e ureteres. A amiloidose ocorre em 10 a 15% dos casos, podendo ser um fator a mais no prejuízo da atividade renal. A proteinúria de Bence-Jones é detectável em cerca de 75% dos pacientes, sendo que a creatinemia está elevada em mais da metade dos pacientes (FOERSTER & PARASKEVAS, 1999).

Susceptibilidade maior a infecções por bactérias Gram positivas e negativas é observada, sobretudo no tecido respiratório e urinário. Pacientes com MM tem sua capacidade de resposta humoral alterada aos estímulos antigênicos, tendo baixos níveis de Igs normais. Diátese hemorrágica (epistaxes e púrpuras) pode ocorrer em decorrência, geralmente, de trombocitopenia ou por inabilidade plaquetária secundária à presença de proteínas monoclonais afetando a agregação das plaquetas. Este achado pode atingir cifras de até 30% dos casos, especialmente em mieloma de IgA (KYLE, 1995).

Manifestações neurológicas, especialmente sensações de parestesias, são conseqüências de compressão de nervos cranianos ou da medula espinhal pelas massas tumorais (HARRIS et al., 1999; BARLOGIE et al., 2001).

Hiperviscosidade é observável em MM, embora seja mais relacionado à Macroglobulinemia de Waldeström. Esta alteração provoca sintomas referentes a distúrbios circulatórios cerebrais, pulmonares e renais. A IgA tem maior tendência à formação de polímeros, permitindo, assim, uma maior incidência de síndrome de

hiperviscosidade em pacientes com MM produtor de IgA, em comparação a aqueles produtores de IgG (BARLOGIE et al., 2001).

A amiloidose, caracterizada pela deposição de fibrinas de proteína insolúvel (amilóide) em órgãos e tecidos, sobretudo do tipo bioquímico de cadeias leves pode ser vista em cerca de 10% dos casos de MM (KYLE, 1995; CHRISTOU et al., 1999). Sítios extramedulares podem ser infiltrados por populações de células mielomatosas. CHEN et al. (1998), relataram plasmocitoma extramedular solitário em retroperitônio. Tais eventos são relativamente raros, tendo uma frequência de menos de 3% de todos os casos de neoplasias plasmocitárias. Outra rara variante de discrasias plasmocitárias é a não-secretora (BOSMAN et al., 1996). Casos de MM IgM são poucas vezes vistos (HAGHIGHI et al., 1998). Outra situação pouco usual é o MM familiar, quando há ocorrência de dois ou mais membros da mesma família com a doença (DESHPANDE et al., 1998).

EPIDEMIOLOGIA

O MM responde por cerca de 1% de todas as neoplasias malignas e 10% dos cânceres hematológicos (FRENCH et al., 2000). A incidência anual numa população de 100.000 habitantes atinge 3 a 4 casos novos (KYLE, 1996). A idade média de acometimento é 65 anos, sendo que menos de 3% estão na faixa abaixo de 40 anos. São raros os relatos de MM em indivíduos na segunda década de vida (BARLOGIE et al., 2001). A incidência aumenta de 7 a 8% em pessoas acima de 65 anos (BOCCADORO & PILERI, 1997). A frequência em negros é de cerca de duas vezes a de brancos. É discretamente mais frequente em homens que mulheres. O MM ocorre

em todas as raças e áreas geográficas, embora a incidência seja menor em populações asiáticas.

BIOLOGIA DO MM

O MM é uma neoplasia que afeta a etapa diferenciada de células B, evoluindo por diversas fases desde o início do processo carcinogênico até o reconhecimento diagnóstico (HALLEK et al., 1998).

Os linfócitos B representam 5-15% da população de linfócitos circulantes e são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas localizadas na membrana superficial onde atuam como receptores específicos de antígenos (ROITT et al., 1997).

A vida das células B é dividida em duas etapas. A primeira, antígeno-independente, ocorre na MO e engloba precursores de linfócitos B, que adquirem receptores de superfície antígeno-específicos. Na MO as células B amadurecem em íntima associação com as células reticulares do estroma, favorecendo sua diferenciação (LeBIEN, 2000). A maioria das células B (mais de 75%) em processo de amadurecimento na MO não chega à circulação, sofrendo um processo de morte celular programada ou apoptose, sendo fagocitadas pelos histiócitos (ROITT et al., 1997). A segunda fase ocorre em órgãos linfóides secundários (linfonodos, tonsilas, placas de Peyer e baço) onde acontece a apresentação dos antígenos. Esta ligação inicia a ativação de células B, com conseqüente proliferação e maturação, o que leva à formação de células B de memória ou PLs secretores de anticorpos (DUCHOSAL, 1997).

Após a ativação de linfócitos B e T por antígenos ou mitógenos, provoca-se nestas células o desencadeamento do processo de diferenciação. Blastos de origem B

amadurecem em células formadoras de anticorpos que, por sua vez, terminam por se diferenciar em PLs, com a efetiva produção de Igs (KLEIN, 1998). Alguns destes linfócitos B ativados são selecionados para terem a função de memória, não se envolvendo na resposta humoral, de liberação de anticorpos, propriamente dita. Os PLs são raramente encontrados na circulação, estando restritos aos tecidos e órgãos linfóides secundários (KAWANO et al., 1993). Os anticorpos produzidos por um PL possuem uma única especificidade, pertencendo a uma única classe de Igs. Os PLs de vida curta duram cerca de 3 dias e são eliminados pelo mecanismo de apoptose, após secretarem Ig habitualmente do tipo IgM. Outras células B ativadas entram nos centros germinativos de tecidos linfóides secundários e são estimulados a adquirir rearranjo hipermutante das seqüências V dos genes das Igs, o que possibilita o desenvolvimento de outros tipos de Igs (G, A, D e E). Os plasmoblastos que sofrem tais modificações retornam para a MO, onde interagem com as células estromais para assim, diferenciarem-se em PLs de vida longa. Estes sobrevivem, em média, 30 dias (HALLEK et al., 1998; RUDIN & THOMPSON, 1998).

As células plasmáticas malignas do MM estão localizadas na MO intimamente ligadas às células estromais, sendo raramente vistas em outros órgãos. Na MO, as células mielomatosas e as células estromais secretam citocinas e interagem através de moléculas de adesão (MELLSTEDT, 2000), ativando outras células, inclusive osteoclastos, que dão suporte ao crescimento e sobrevivência das células do mieloma e levam às complicações associadas com a doença, sobretudo as fraturas patológicas e a hipercalcemia (AMIEL et al., 1999; LAMY et al., 2001).

ETIOPATOGENIA

Um processo multifatorial e de múltiplas etapas podem estar envolvidas na transformação maligna do MM (HALLEK et al., 1998). Mutações ocorridas durante o processo de proliferação celular podem propiciar o acúmulo de danos gênicos.

Existe uma grande complexidade de alterações, desde ativações oncogênicas secundárias a mutações de ponto até anormalidades cromossômicas grosseiras. Alterações oncogênicas podem envolver o *bcl-1*, o *bcl-2*, o *c-myc*, que promovem a redução de apoptose, com conseqüente aumento de carga populacional de células B e PLs (WITZIG et al., 1999). Mutações no gene *ras* podem ter participação importante na patogênese do MM pela ativação excessiva e manutenção de processo proliferativo celular. Mutações dos genes supressores de tumores (GSTs) *p53* e do *rb1* podem ser detectadas por meio do método de Hibridização *in situ* com Fluorescência (FISH), porém em baixa freqüência (ANDERSON, 1993). A identificação e caracterização dos genes envolvidos nas distintas alterações citogenéticas e sua relação com os oncogenes e GSTs poderão proporcionar um melhor entendimento da base molecular do MM, com conseqüente definição de alvos terapêuticos mais específicos, sobretudo na área de terapia gênica e imunoterapia (FEINMAN et al., 1997).

ESTADIAMENTO E PROGNÓSTICO

Os vários sistemas de estadiamento sugeridos habitualmente utilizam dados clínicos e laboratoriais, tais como concentração de hemoglobina, os níveis de proteína na urina e no sangue, a presença de hipercalcemia, a extensão de doença óssea e a creatinemia (BARTL et al., 1991; SUKPANICHNANT et al., 1994; BARLOGIE et al., 2001).

O sistema de estadiamento de Durie-Salmon é um dos mais utilizados já há mais de 20 anos, permitindo boa interpretação dos testes terapêuticos de acordo com os estádios dos pacientes (DURIE & SALMON, 1975).

O prognóstico dos pacientes com MM é pobre, com uma sobrevida média de cerca de 3 anos. A taxa de sobrevida em 5 anos é de cerca de 25% e de 5 % em 10 anos com o tratamento convencional (TSUCHIYA et al., 1994; ANDERSON et al., 1999; SAMPSON et al., 2001).

TRANSDUÇÃO DE SINAIS

A transdução de sinais pode ser entendida como a transmissão de sinais, processo que envolve uma interação de um ligante extracelular com uma proteína receptora transmembrana (DHANASEKARAN, 1998). Esta possui domínios em ambos os lados da membrana, fazendo o papel de ponte entre os meios externo e interno da célula, fundamental para que a unidade celular esteja sintonizada e em comunicação com as outras células do organismo (LEWIN, 2001; PASSARGE, 2001). Este processo assegura a inclusão da célula no contexto multicelular, onde é fundamental garantir a capacidade de crescimento, diferenciação, funções específicas para diferentes tipos de células e resposta apropriada a estímulos externos (KARP, 1999; UINGS & FARROW, 2000; GRIFFITHS et al., 2001).

A interação com o ligante - moléculas ou macromoléculas que podem ser hormônios, íons, proteínas, tais como epinefrina, glucagon, serotonina, acetilcolina, eritropoietina e interferon - converte o receptor de um estado inativo para uma forma ativa (LODISH et al., 2000; RAW & HO, 1999). A interação com o ligante no lado

extracelular influencia a atividade do domínio do receptor no lado citoplasmático. Este processo, mais especificamente, é considerado transdução de sinal, pois o sinal é transduzido através da membrana. O sinal citosólico pode ativar uma série de proteínas ou determinar o aumento da quantidade de uma molécula no interior da célula. Uma molécula produzida em resposta a transdução de sinal ganha o nome de mensageiro secundário (o primário é o ligante extracelular) (LEWIN, 2001).

Um grande grupo de proteínas transdutoras de sinal é o dos receptores tirosina-quinases (RTKs). Em seus domínios citosólicos, há uma atividade enzimática realizada pelas proteíno-quinases, que tem a capacidade de adicionar um grupo fosfato a um aminoácido de uma proteína-alvo, processo conhecido como fosforilação. O fosfato é fornecido pela hidrólise de ATP em ADP (KISHIDA et al., 1997).

Os RTKs possuem como ligantes hormônios ou proteínas/polipeptídeos solúveis ou ligados à membrana. O fator de crescimento neural (NGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e a insulina são alguns desses mensageiros primários. A ligação de uma destas citocinas a este tipo de receptor estimula a atividade tirosina-quinase intrínseca do receptor, com conseqüente modificação conformacional da proteína, o que desencadeia a cascata de transdução de sinal levando a alterações na conformação estrutural de outras proteínas, que finalmente induzem modificações de ativadores transcricionais e repressores, atuando na fisiologia celular e/ou padrões de expressão gênica (LODISH, 2000; GRIFFITHS et al., 2001).

As vias sinalizadoras dos RTKs apresentam um grande espectro de funções que incluem a regulação de proliferação e diferenciação celular, a promoção de sobrevivência celular e a modulação do metabolismo celular (KARP, 1999).

Os RTKs compreendem um domínio extracelular contendo um sítio comunicante com o ligante, uma faixa transmembrana e outro domínio, citosólico, que contém uma atividade tirosina-quinase. A conexão com ligantes causa dimerização de RTKs. A proteína-quinase de cada monômero de receptor fosforila um grupo de resíduos de tirosina no domínio citosólico de seu dímero parceiro, processo dito autofosforilação (GRIFFITHS et al., 1999).

A autofosforilação ocorre em duas etapas: na primeira, resíduos de tirosina na borda de fosforilação próximo ao sítio catalítico são fosforilados, o que provoca alterações conformacionais que facilitam a ligação de ATP em alguns receptores (no caso do receptor de insulina) e a ligação de substratos de proteína em outros receptores, como o receptor FGF. Na segunda etapa, a atividade de receptor quinase fosforila outros sítios no domínio citosólico; as fosfo-tirosinas resultantes servem como sítio de atracção para outras proteínas envolvidas em transdução de sinais mediados por RTKs, isto é, representa um meio de transmitir o sinal para o próximo componente da rota. A existência da tirosina fosforilada determina que o domínio citoplasmático associe-se às suas proteínas-alvo (CAMPBELL et al., 1998). Nesta fase entra em ação a proteína Ras, uma molécula sinalizadora chave nas vias desencadeadas pela ativação dos RTKs (LODISH et al., 2000).

O GENE *ras* E A PROTEÍNA Ras

Ras é uma proteína monomérica de ligação a nucleotídeos de guanina, que é ativa quando ligada a GTP e inativa quando ligada a GDP. Ela tem uma atividade intrínseca de GTPase.

Os genes *ras* que codificam as proteínas Ras foram identificados em mamíferos, pássaros, insetos, moluscos, plantas e fungos (BARBACID, 1987). A família de proteínas Ras compreende H-Ras, K-Ras 4A, K-Ras 4B, N-Ras, e outras proteínas homólogas tais como R-Ras, TC21, Rap e Ral (KIMMELMAN et al., 1997; REBOLLO & MARTÍNEZ-A, 1999). Pertencem ao grupo das proteínas G, proteínas heterotriméricas ligadas ao GTP que funcionam nas vias sinalizadoras intracelulares, usualmente ativadas por ligantes conectadas a receptores de membrana celular (LODISH et al., 2000). Estima-se que existam cerca de mil receptores diferentes do grupo de proteínas G (RAW & HO, 1999).

As proteínas Ras são muito similares, e tem peso molecular de 21.000 daltons (BOS, 1989). Contém 188 ou 189 aminoácidos e exibem alta seqüência de homologia, com os 86 aminoácidos iniciais idênticos, os 78 aminoácidos seguintes com homologia de 79% e os últimos 25 aminoácidos sendo altamente variáveis (SIEBURTH et al., 1998; ROWINSKY et al., 1999). As proteínas Ras são proteínas-G importantes mediadores de diferenciação, proliferação, transdução de sinais e transformação maligna induzidas por fatores de crescimento (BOS, 1995; REUTER et al., 2000).

A função da proteína Ras é controlada por um ciclo guanosina trifosfato-guanosina difosfato (GTP-GDP), que, por sua vez, é regulado por, no mínimo, duas classes distintas de proteínas regulatórias. A primeira, uma proteína ativadora de GTPase (GAP) reconhece a proteína Ras ligada ao GTP e estimula a atividade intrínseca da GTPase para “desencaixar” a ligação Ras-GTP, através de hidrólise. Este fato retorna a proteína Ras ligada ao GDP, portanto à forma inativa. A segunda, fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEF – guanine nucleotide exchange factor) promovem o desacoplamento entre Ras e o GDP para permitir ligação espontânea

entre Ras e GTP, pois a concentração de GTP no citosol é muito mais elevada que a de GDP. Esta conformação Ras-GTP é a forma ativa da proteína, o que desencadeia a cascata sinalizadora (HAUBRUCK & MCCORMICK, 1991; CAMPBELL et al., 1998) (vide fig. 1).

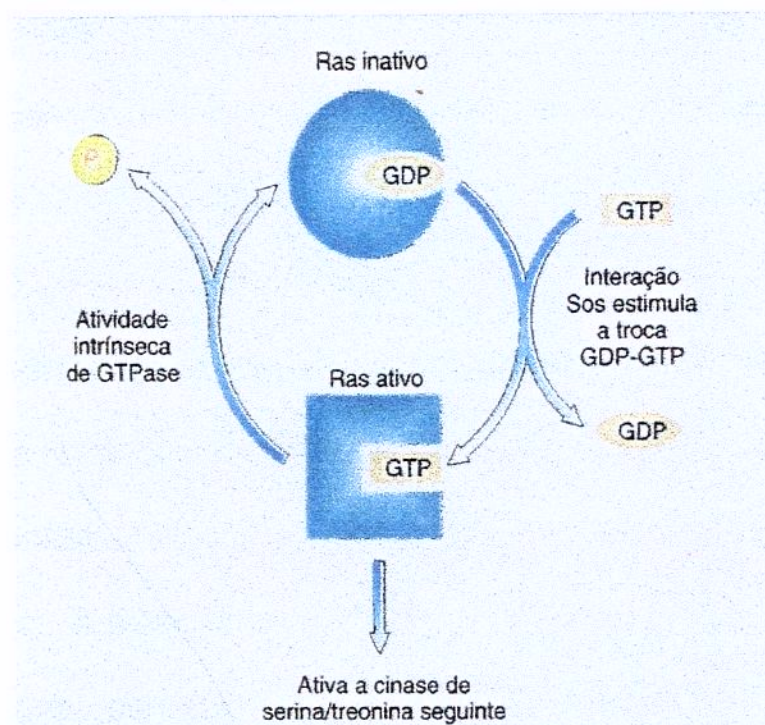


Fig. 1 . Ciclo de atividade da proteína G Ras. Quando ligada ao GDP, Ras está inativa. Sob ação da proteína Sos, há mudança conformacional do Ras que permite desconexão com GDP e ligação com GTP. O complexo Ras-GTP interage com outras proteínas serina/treonina cinases que, por sua vez, continua com o processo de transdução de sinal (WATSON et al., 1992).

A hidrólise de GTP ligada desativa o Ras. O tempo médio de conexão GTP-Ras é de aproximadamente um minuto, tempo requerido para a ação da GAP (proteína ativadora do GTPase), que acelera a atividade intrínseca da GTPase em cerca de 100 vezes (LODISH et al., 2000).

As proteínas Ras em mamíferos são estudadas sobretudo porque suas mutantes estão associadas com muitos tipos de câncer humano (KUMAR et al., 1990; HUNTER, 1997). Tais proteínas mutantes, que se ligam mas não se desconectam do GTP, estão permanentemente em estado ligado e com conseqüente possibilidade de promover transformação neoplásica. A proteína mutante apresenta duas propriedades: a) ativação da tirosina-quinase; b) não resposta ao ligante usual. A atividade do receptor tirosina-quinase é aumentada ou dirigida contra novos alvos (WEINBERG, 1984; CRABTREE & CLIPSTONE, 1994; WHITE et al., 1995).

As proteínas Ras participam de um grande processo de controle de múltiplos eventos celulares envolvendo o crescimento, a diferenciação, a apoptose, a organização citoesquelética e o tráfego de membrana, tendo papel central nessa regulação, dependendo do tipo celular e das condições ambientais do tecido ao qual a célula pertence (ROWINSKY et al., 1999; BOS, 2000; WITTINGHOFER, 2000).

A cascata de eventos da ativação da proteína Ras é desencadeada pelo estímulo do receptor por um ligante, por exemplo, EGF ou PDGF. O receptor tirosina-quinase ativa a rota do Ras através de uma proteína adaptadora (Grb e Sos). A ativação do Ras leva à entrada em ação da Raf Ser/Thr-quinase, que, por sua vez, estimula a quinase MEK (anteriormente conhecida como MAPKK, mitogen-activated kinases) (HILL & TREISMAN, 1995; KIVINEN et al., 1998; KOLCH, 2000). A cascata de eventos de fosforilação leva, em última instância, a fosforilação de fatores de

transcrição, que desencadeiam mudanças na atividade celular, que vão desde a multiplicação até a diferenciação, dependendo do tipo de célula (PORTER & VAILLANCOURT, 1998; STERNBERG & ALBEROLA-ILA, 1998; THERRIEN et al., 1998) (vide fig. 2)

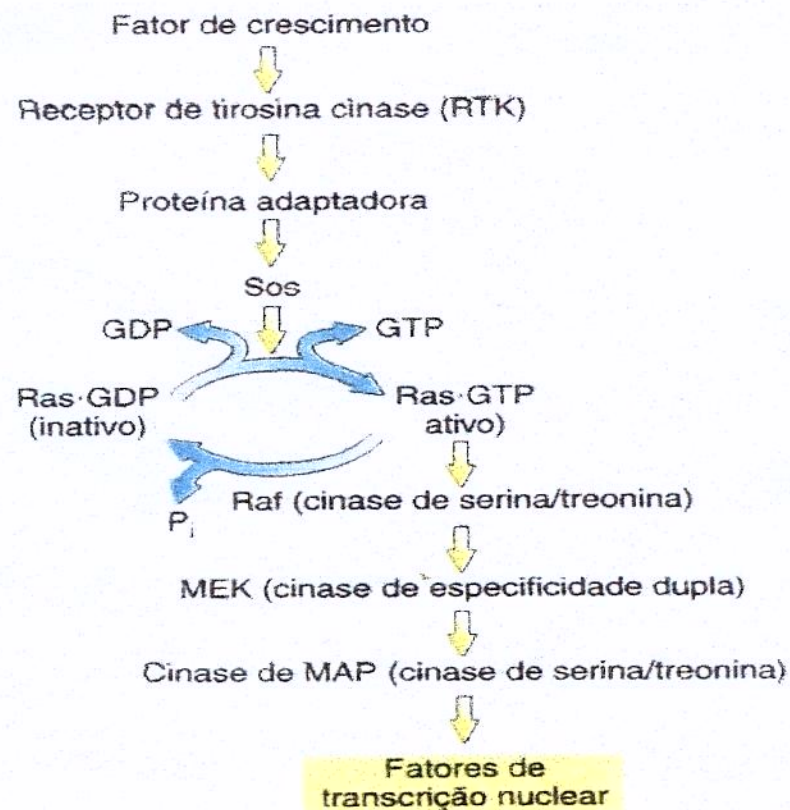


Fig. 2. Via de sinalização de RTK. Ras, Raf MEK são proteína-quinases citoplasmáticas ativadas sequencialmente na cascata de transdução de sinal (GRIFFITHS et al., 2001).

Quando a mitogênese é desencadeada pela ativação de um fator de crescimento ou quando uma célula é transformada para um estado tumorigênico, ocorre uma série de eventos coordenados, que incluem as mudanças na transcrição e modificações da estrutura celular. A ativação da rota de Ras/MAPK envolve fatores de transcrição que tem papel importante em um conjunto de modificações, inclusive a transformação tumorigênica (DER et al., 1996).

O ONCOGENE *ras*

O termo oncogene é utilizado para um grupo de genes reguladores do crescimento que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer após vários tipos de ativação patológica (KLEIN, 1993).

Os oncogenes foram inicialmente identificados como genes carregados por vírus que causam a transformação de suas células-alvo. Uma classe importante de oncogenes virais possui genes equivalentes na célula cumprindo funções normais. Estes genes fisiológicos são chamados de proto-oncogenes. Mutação ou ativação aberrantes dos mesmos estão associados a tumorigênese. Cerca de 100 oncogenes já foram identificados. A geração de um oncogene significa um ganho de função, no qual um proto-oncogene celular é ativado de forma inadequada, através de alteração conformacional da proteína, a superexpressão do gene ou a falha na inativação da sua expressão no momento adequado (LEWIN, 2001).

Os genes individuais *N-ras*, *H-ras* e *K-ras* são intimamente relacionados e codificam produtos protéicos de cerca de 21 kD, coletivamente conhecidos por *p21ras*. Os genes *H-ras* e *K-ras* possuem equivalentes *v-ras* (v de vírus), presentes nas linhagens Harvey e Kirsten do vírus do sarcoma murino. Cada gene *v-ras* está

relacionado ao gene *c-ras* (c de celular). Cada um dos proto-oncogenes *c-ras* é capaz de originar um oncogene transformante por uma única mutação pontual. As mutações do proto-oncogene *ras* podem ocorrer em um único par de bases, com conseqüente substituição de um único aminoácido, habitualmente nas posições 12,13 e 61, da proteína Ras (BYRNE & MARSHALL, 1998).

A substituição na seqüência codificadora pode converter um proto-oncogene celular em um oncogene, que, por sua vez, pode estar associado ao surgimento de um tumor no organismo. No gene *ras*, qualquer mutação nas posições 12,13 e 61 pode converter um proto-oncogene *c-ras* em um oncogene ativo. Todos os três genes *c-ras* (N-, H- e K-*ras*) possuem glicina na posição 12 e 13. Se a glicina for substituída, o gene mutante *c-ras* passa a transformar células em cultura, exceto quando é trocada por prolina (LEWIN, 2001).

A posição 61 é ocupada pela glutamina em genes *c-ras* de tipo selvagem. A sua modificação para outro aminoácido normalmente cria um gene com potencial transformante, exceto quando a substituição é por prolina e ácido glutâmico (LEWIN, 2001).

Quando a expressão de um gene *c-ras* normal é aumentada, as células receptoras podem ser transformadas. Um aumento de 20 vezes no nível de uma proteína Ras não-transformante é suficiente para permitir a transformação de algumas células (LEWIN, 2001).

A oncogênese depende da superatividade da proteína *ras* e é causada pelo aumento da sua quantidade ou por mutações que aumentam sua atividade, sendo que este último meio é o mais importante. Esta transformação inibe a atividade GTPásica. A GAP não é capaz de aumentar sua atividade GTPásica das proteínas Ras que foram

ativadas por mutações oncogênicas. A proteína Ras torna-se refratária à interação com GAP, o que eliminaria a sua atividade. A incapacidade de hidrolisar GTP determina que a proteína Ras passe a existir em uma forma permanentemente ativada; a sua ação contínua sobre a proteína-alvo é responsável pela sua atividade oncogênica (COTRAN et al., 1994; LEWIN, 2001).

Os oncogenes *ras* são importantes participantes na tumorigênese de vários tipos de câncer. Eles foram identificados em carcinomas da bexiga, mama, colon, rins, pulmões, ovário, pâncreas e estômago; em neoplasias hematológicas de linhagem linfóide (leucemia linfóide aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, MM) e mielóide (leucemias mielóides aguda e crônica, leucemia promielocítica) e outros tumores como rabdomiossarcoma, fibrossarcoma, teratosarcoma, gliomas, neuroblastomas e melanomas (BARBACID, 1987; BOS, 1989).

O oncogene *ras* pode ser usado para distinguir processos neoplásicos benignos ou tumorações reacionais e inflamatórias daqueles verdadeiramente malignos, como nas patologias hepáticas (HRUBAN et al., 1997). Outras situações onde o *ras* pode auxiliar é no estadiamento ou no acompanhamento de evolução de outros cânceres, como no de cérvix uterino (O'LEARY et al., 1997). Neoplasias pulmonares também podem demonstrar a presença de mutação do gene *ras* em cerca de um terço dos casos, e pode haver relação com o consumo de tabaco (RODENHUIS et al., 1988; RODENHUIS & SLEBOS, 1992; SALGIA & SKARIN, 1998), assim como com o contato com asbestos (NELSON et al., 1999).

Em câncer de mama, o encontro de expressão elevada de p21*ras* foi relacionada com maior agressividade, assim como maior facilidade de extensão a tecidos vizinhos e metastatização à distância (MOON et al., 2000). Mutações do K-*ras*

também são observadas em cerca de 40% dos casos de câncer coloretal (KOPRESKI et al., 1997). Situações de risco para carcinomas coloretais, mas de cunho benigno, tal como os adenomas coloretais, também apresentam presença evidente de mutações do *K-ras* (MARTÍNEZ et al., 1999).

Em doenças neoplásicas hematológicas, achados de mutações do oncogene *ras* também são importantes. Desde 1983, ano do primeiro relato de mutações *ras* em leucemia mielóide aguda (LMA), vários trabalhos indicam média de 30% dos casos com acometimento mutacional referido (BYRNE, 1998; BEAUPRE & KURZROCK, 1999), tanto em crianças quanto em adultos. Nas situações de recaída de LMA, alterações moleculares relacionadas com perda e/ou aquisição de mutações são mais comuns também (NAKANO et al., 1999). O estudo realizado por MELO et al., em 1997, em amostras de MO de 40 pacientes brasileiros com LMA demonstrou a presença de 20% de alterações mutacionais em *N-ras*. Nenhuma correlação significativa foi observada em relação à idade, ao sexo, a raça, a resposta à terapia, ao subtipo FAB ou a exposição ocupacional. Porém, a sobrevida total e a sobrevida livre de doença foram significativamente menores naqueles que apresentaram as mutações do gene.

Em leucemia linfóide aguda infantil, a ativação da proteína Ras foi encontrada mais freqüentemente, sobretudo naqueles com subtipo T (VON LINTING et al., 2000).

Em síndromes mielodisplásicas, cerca de 9% dos casos podem apresentar mutações somáticas do oncogene *N-ras* (LYONS et al., 1988).

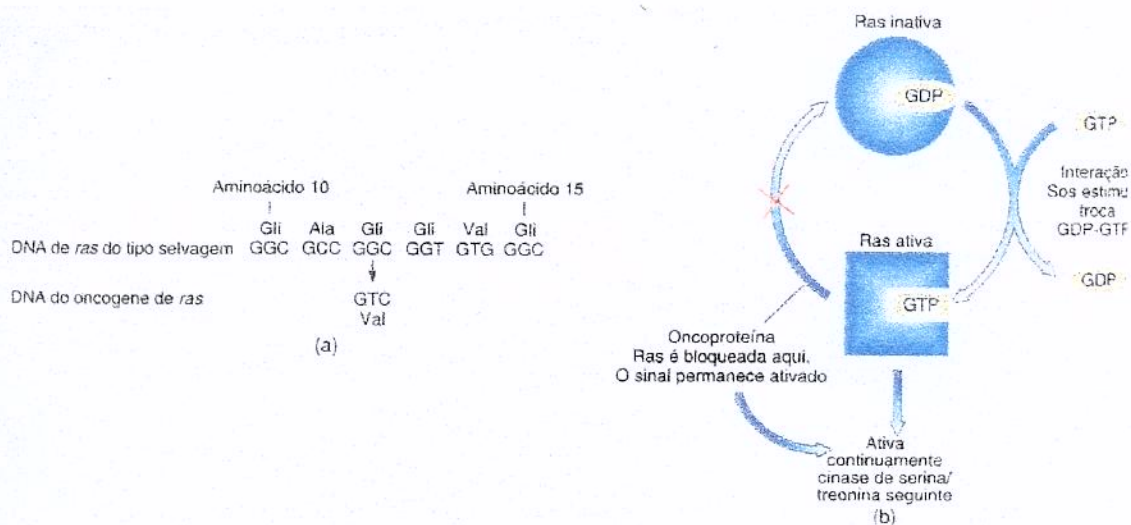


Fig. 3. A oncoproteína mutada Ras. O códon 12 do fragmento de DNA de *ras* do tipo selvagem apresenta modificação em um par de bases (G→T), provocando alteração de aminoácidos de glicina para valina (a). Esta mutação provoca manutenção contínua de estado ativo Ras-GTP, com consequente desencadeamento da cascata de sinais de proliferação celular, o que induz uma situação propícia a tumorigênese (b) (GRIFFITHS et al., 2001).

Em MM, a frequência de mutação de todos os genes *ras* observada em vários relatos é, em média, de 30 a 40 % dos casos ao diagnóstico, e em aproximadamente 60 % em casos em progressão, variando de zero a 100% (NERI et al., 1989; AHUJA et al., 1990; CORRADINI et al., 1993; YASUGA et al., 1995; LIU et al., 1996; GREIPP et al., 1998; BEZIEAU et al., 2001; KALAKONDA et al., 2001). A frequência de mutações no N-*ras* tem atingido, exceto no trabalho de KALAKONDA et al. (2001), média de 20 a 30 % (LIU et al., 1996).

Não temos dados referentes à frequência de mutações do gene N-*ras* em pacientes brasileiros com MM.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o seguinte:

Determinar a frequência de mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *N-ras* dos pacientes com MM em uma população brasileira, utilizando técnica de amplificação de fragmentos gênicos definidos através de iniciadores pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de seqüenciamento de DNA pelo método de Sanger, automatizado.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram estudados 44 pacientes com MM, sendo que 29 pacientes foram avaliados ao diagnóstico e 15 pacientes foram avaliados em fase de progressão da doença.

O período de acompanhamento iniciou-se em Fevereiro de 1999, com término de seguimento em Abril de 2001, num total de 27 meses.

Esses pacientes foram acompanhados pela Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

MÉTODOS

DIAGNÓSTICO DE MIELOMA MÚLTIPLO

O diagnóstico do MM foi baseado em análise de aspectos citológicos, clínicos e laboratoriais, de acordo com os critérios descritos por DURIE (1986). Este autor classificou os achados clínicos e laboratoriais em critérios maiores e menores, sendo que o diagnóstico de MM requer no mínimo um critério maior e um menor ou pelo menos 3 critérios menores. Veja anexo 1.

ESTADIAMENTO

Neste estudo utilizamos o sistema de estadiamento de DURIE & SALMON, de 1975. Os autores utilizaram dados referentes aos níveis de hemoglobina, à calcemia, à

osteólise, a quantidade de componente de Ig monoclonal sérico ou urinário, e à função renal (anexo 2).

Os dados relativos à idade, ao sexo e os resultados dos exames laboratoriais necessários ao diagnóstico, ao estadiamento da doença e à identificação da progressão da doença foram obtidos dos prontuários de cada paciente.

Foram considerados em progressão da doença, os pacientes que apresentaram citopenias atribuídas à infiltração da MO por PLs ou o aumento da concentração da proteína monoclonal sérica ou urinária, durante o seguimento clínico, independentemente de terem ou não terem obtido remissão completa.

Os procedimentos técnicos realizados para a busca das mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *N-ras* em amostras de MO podem ser resumidos nos seguintes passos:

- 1) extração de DNA;
- 2) amplificação do fragmento flanqueado por iniciadores através de metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR), a qual chamaremos de PCR-I;
- 3) purificação do produto amplificado na fase 2;
- 4) quantificação do produto da PCR-I purificada;
- 5) amplificação de fragmento flanqueado por um dos iniciadores para seqüenciamento, utilizando ddNTPs marcados (Big-dye™), a qual consideraremos PCR-II;
- 6) purificação do produto da PCR-II (fase 5);
- 7) seqüenciamento automatizado;
- 8) análise dos seqüenciamentos.

EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de MO recém-coletadas foram submetidas ao manuseio para extração de DNA através de centrifugação de aproximadamente 2 a 3 mL do aspirado a 1500 rpm por 10 minutos, a fim de separar a porção líquida da porção celular, em centrífuga Beckman™ GS-6R, com posterior descarte da porção plasmática sobrenadante. Adicionou-se solução de lise de hemácias [mistura das soluções de cloreto de amônio NH_4Cl 0,144 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 0,01 M (0,5 vez o volume de células)]. O material foi submetido, após agitação à temperatura ambiente, a uma segunda centrifugação, a 2000 rpm por 15 minutos, com descarte de sobrenadante; Nova adição de solução lisante de hemácias até nível de 10 mL do tubo foi realizada, com a realização de terceira centrifugação, a 2000 rpm por 15 minutos; Após descarte de sobrenadante, ressuspendeu-se o botão de células com SF 0,9% 100 μL , de forma gentil e cuidadosa, com o fim de desmanchar o grumo e aumentar a área de contato entre os leucócitos e 1 mL de DNAzol™ (GIBCO BRL – Life Technologies Genomic DNA Isolation Reagent).

O material foi deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas com posterior manipulação cuidadosa até o desvencilhamento do material de DNA. Após a liberação total e completa do DNA, capturamos o grumo mucóide e o colocamos em um tubo tipo Eppendorf® com 100 μL de etanol a 70%, a fim de precipitar o DNA. Houve ressuspensão em 300 μL de água deionizada estéril com NaOH 8 mM e colocação do tubo contendo DNA em banho-maria a 37° C “over-night” para a hidratação do condensado de DNA a fim de que o grumo fosse completamente dissolvido. Mantivemos o material de DNA em freezer a -30° C.

AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA POR PCR

A fim de obtermos material gênico em quantidade suficiente para o propósito deste trabalho, escolhemos a metodologia da reação em cadeia de polimerase (ROGERS et al., 1990; ROLLINS & STILES, 1993; ; VANDE-WOUDE & VANDE-WOUDE, 1993; YAP & MCGEE, 1994; O'LEARY et al., 1997; WALKER & RAPLEY, 1999).

As reações foram realizadas num volume final de 50 μ L, utilizando sistema "master mix". Usamos controle negativo, com todos os reagentes, exceto DNA, e controle positivo de trabalho anterior de nosso laboratório. Os reagentes e suas quantidades para cada amostra foram os seguintes:

H ₂ O	40,75 μ L
Tampão	5,00 μ L
dNTP	1,00 μ L (10 mM)
Mg	1,00 μ L
Iniciador sense	0,50 μ L (20 pmol)
Iniciador anti-sense	0,50 μ L (20 pmol)
Taq polimerase	0,25 μ L
DNA	1,00 μ L
	50,00 μ L

O protocolo seguido no termociclador PTCTM100 – Programable Thermal Controller, da MJ Research, Inc. foi o seguinte:

Tab. 1: As temperaturas, os tempos e os números de ciclos utilizados para a amplificação dos códons 12, 13 e 61 do gene *N-ras* por meio da reação em cadeia de polimerase.

PROCESSO	TEMP (° C)	TEMPO (min)	CICLOS
Denaturação inicial	94	5	1
Denaturação	94	1	35
Anelamento	52	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1

Os iniciadores utilizados nas reações foram adquiridos da GIBCO BRL®, preparados em Novembro de 2000, com seqüências de 20 nucleotídeos, formando dois pares na direção 5' – 3' (sense) e 3' – 5' (anti-sense), para os códons “hot-spots” para mutação no gene *N-ras*, 12,13 e 61:

Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação para a amplificação dos códons 12, 13 e 61 do gene *N-ras* por meio da reação em cadeia de polimerase.

NOMENCLATURA	SENTIDO	SEQÜÊNCIA
<i>N-ras</i> códons 12,13	Sense	ATGACTGAGTACAAACGTGT
<i>N-ras</i> códons 12,13	Anti-sense	CTCTATGGTGGGATCATATT
<i>N-ras</i> códon 61	Sense	CAAGTGGTTATAGATGGTGA
<i>N-ras</i> códon 61	Anti-sense	AGGAAGGCCTTCGCCTGTCC

PURIFICAÇÃO

Para a purificação do produto amplificado do PCR foi utilizado o material comercial adquirido da GIBCO BRL® Life Technologies, o CONCERT™ Rapid PCR Purification System. Este kit foi desenhado com o fim de proporcionar rápida purificação dos produtos da PCR. A solução ligante fornecida pelo kit foi adicionada à reação de amplificação e a mistura é aplicada a um tubo contendo membranas de sílica onde a dupla hélice de DNA é seletivamente adsorvida. A adsorção do material gênico foi influenciada por fatores como a temperatura e a composição do tampão. DNA polimerase, tampão, sobras de iniciadores e restos de dNTPs foram removidos com um tampão de lavagem contendo álcool. O DNA adsorvido na membrana foi eluído em uma solução contendo TE (Tris EDTA). Todas as soluções foram colocadas nesta coluna com membrana e separadas em breves centrifugações, permitindo o completo processamento em cerca de 10 minutos, além de eliminar os riscos de produtos químicos perigosos à saúde, tais como o fenol e o clorofórmio.

PROTOCOLO REALIZADO

Preparamos mistura de 400 μ L de solução ligante com a reação de amplificação com homogeneização posterior. A remoção de óleo não foi necessária. Esta solução de mistura foi colocada num tubo de coluna com membrana filtradora que por sua vez foi conectado em um segundo tubo receptáculo de 2 mL. Houve a centrifugação da mistura a 13.000 rpm por 1 minuto com posterior descarte do efluente centrifugado.

Recolocamos o tubo de coluna com membrana no tubo receptáculo de 2 mL para posterior adição de 700 μ L de tampão de lavagem contendo etanol para nova centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Após o descarte do efluente, realizamos a

terceira centrifugação sem colocação de nenhum reagente, a fim de remover solução de lavagem residual.

Procedemos a eluição do DNA conectando a coluna com membrana em outro tubo de recuperação de 500 μ L e adicionando 50 μ L de tampão TE no centro da membrana da coluna. Incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos.

QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR-I PURIFICADO

A determinação da quantidade de DNA amplificado e purificado foi realizada utilizando-se Low DNA MASS Ladder, fornecido pela GIBCO BRL® Life Technologies. Este marcador é composto por uma mistura de seis fragmentos de DNA previamente conhecidos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pares de bases. O tampão de estoque deste marcador consiste de 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 1mM de EDTA.

Utilizamos volume de 2 μ L de Low DNA MASS ladder adicionado a 3 μ L de corante de azul de bromofenol na corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % e comparamos o tamanho de fragmento amplificado, no nosso caso próximo à marca de 100 pares de bases (o gene *N-ras* tem cerca de 118 pares de bases). Além da confirmação da amplificação do gene estudado pelo tamanho de fragmento, a intensidade da banda amplificada das amostras, observada pela corrida eletroforética concomitante com o marcador, indicou a quantidade relativa de DNA da amostra investigada. Nessa corrida, utilizamos 2 μ L de produto de amplificação de PCR-I adicionado a 3 μ L de corante de azul de bromofenol. Utilizando 2 μ L de Low DNA MASS ladder, as bandas de amostras estudadas apresentavam as seguintes quantidades de DNA, em ng, seguindo a ordem dos fragmentos do Low MASS: 100 ng,

60 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng. Todas as 44 amostras analisadas mostraram uma quantidade de DNA de cerca de 5 ng.

Para uma boa qualidade da análise da sequência de nucleotídeos do gene N-ras, a quantidade de molde de DNA usada na reação de preparo do seqüenciamento deveria ser ótima, para não afetar a qualidade dos dados. Quantidade maior que a ideal poderia provocar picos grosseiros sobretudo no início da corrida. Moldes em menor quantia que a ideal poderiam reduzir a potência do sinal e a altura do pico. Tal determinação foi fundamental para uma boa realização do passo técnico seguinte, que veremos a seguir.

A documentação fotográfica manuseada foi a da Kodak Digital Science 1D™.

AMPLIFICAÇÃO PARA O SEQÜENCIAMENTO COM BIG-DYE™ (PCR-II)

A amplificação para seqüenciamento seguiu a metodologia proposta por SANGER et al., em 1977. Nesta amplificação, ao molde de DNA purificado foi adicionado 1,6 pmol do iniciador anti-sense, tanto para os códons 12,13 quanto para o códon 61, uma mistura de reação pronta de terminação Big-dye™ (Perkin Elmer Applied Biosystems), e água estéril suficiente para completar 10 µL de volume final da solução (WALKER & RAPLEY, 1999).

A grande diferenciação desta metodologia é o uso de dideoxynucleotídeo trifosfato, um composto modificado no anel de açúcar do DNA em que os carbonos 2' e 3' foram deoxidados, isto é, submetidos à retirada de duas moléculas de OH, explicando a nomenclatura dideoxi (CHURCH et al, 1994; HUANG & MATHIES, 1994;). A componente hidroxila do carbono 3' é fundamental para que haja a efetivação da ponte fosfodiéster, pela qual existe a continuação da sequência de nucleotídeos. Com

a ausência desta hidroxila, a ligação fosfodiéster não é possível, provocando ruptura brusca da sequência. Como este oligonucleotídeo terminador ou finalizador é marcado com corante fluorescente, conhece-se desta forma o seu par do DNA molde, do qual se investiga a sequência, pois ocorre ligação aleatória, porém específica com seu par (A-T, C-G e vice-versa). Portanto, se o dideoxi que parou a sequência num certo fragmento for o ddATP, significa que naquela posição da sequência do gene estudado está ocupado pelo T; se o ddGTP parou a sequência, sua contrapartida é o C, e assim por diante.

O sistema de processamento de dados da metodologia aplicada permite maior facilidade de leitura pela definição de cores diferentes para cada dideoxinucleotídeo que pára o seqüenciamento: T (vermelho), A (verde) , G (preto) e C (azul).

As reações em cadeia de polimerase foram praticadas nos mesmos aparelhos termocicladores da fase de amplificação do fragmento do DNA (PCR-I), os PTC™100, da MJ Research, Inc.

É importante lembrar que, diferentemente da PCR-I, nesta metodologia de seqüenciamento de Sanger foi utilizado somente um iniciador, sense ou anti-sense, e não um par para flanqueamento como quando da amplificação inicial. Isto para permitir que os dNTPs e os ddNTPs possam associar-se para formar a cadeia de nucleotídeos complementar até a localização do ddNTP que bloqueará a sequência e fornecerá a conseqüente informação da sequência do gene.

Um cuidado adicional que foi levado em conta é a proteção de tubos, reações e reagentes com papel-alumínio para evitar-se efeitos deletérios da luz sobre o Big-dye™, sobretudo a perda da potência fluorescente.

Seguimos o seguinte protocolo de amplificação através de fita simples de DNA-molde, para um total de 10 μ L de volume:

Big-dye™	2 μ L
Iniciador	1 μ L (1,6 pmol)
PCR (DNA-molde)	1 μ L
H ₂ O	<u>5 μL</u>

A programação utilizada para a amplificação dos fragmentos marcados foi a seguinte: denaturação inicial a 96° C, por 2 minutos em 1 ciclo e 25 ciclos alternados de denaturação a 96° C por 10 segundos, anelamento a 50° C por 5 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos.

Observação:

Big-dye™ Terminator Ready Reaction Mix (componentes):

- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP);
- AmpliTaq DNA polymerase
- MgCl₂
- Tampão Tris-HCl

PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO (PCR-II)

Para que houvesse uma boa qualidade da determinação da seqüência dos fragmentos para posterior leitura e definição, além de investigação de possíveis alterações mutacionais, tivemos a necessidade de purificar o produto da reação de seqüenciamento (PCR-II). O objetivo desta fase foi o de retirar, da mistura da reação, o excesso de iniciadores, de tampão, e de dideoxinucleotídeos, grande fonte de problemas no momento da análise de seqüência.

O protocolo utilizado lançou mão de isopropanolol a 75% e etanol a 70%.

PROTOCOLO PARA 10 µL DE VOLUME DE PRODUTO AMPLIFICADO COM BIG-DYE™:

Obs.: todos os passos foram protegidos com papel-alumínio.

Adicionaram-se 40 µL de isopropanolol 75% (álcool isopropílico, da Labsynth, Produtos para Laboratório Ltda.) no tubo com 10 µL de produto de PCR-II, com posterior agitação e centrifugação rápidas. Deixamos a mistura em repouso à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Centrifugamos a solução a 13.000 rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante, com o cuidado de não afetar o produto de amplificação, que se encontrava junto à parede do tubo. Houve a adição de 125 µL de etanol a 70% (ethanol absoluto, da Merck). Nova agitação e centrifugação foram realizadas, a 13.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. A remoção do sobrenadante foi praticada com o máximo cuidado para não lesar “pellet” invisível. O tubo com produto purificado foi secado em termociclador a 80°C por cerca de 5 minutos. A estocagem ocorreu em freezer a - 20° C para aguardar corrida em eletroforese em gel de poliacrilamida, em aparelho automatizado ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (Perkin Elmer), protegido por papel-alumínio.

SEQÜENCIAMENTO AUTOMATIZADO

O material do produto amplificado e purificado na fase anterior, foi submetido a ressuspensão com Formamida (GIBCO BRL®) + Blue Dextran 2000 (Amersham Pharmacia) + EDTA (GIBCO BRL®), num volume total de 2 µL.

Os 2 µL das amostras foram aplicados nos poços do gel de poliacrilamida do ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER, da Perkin Elmer.

Pelo fato dos fragmentos do gene *N-ras* serem pequenos (cerca de 118 pares de bases), o tempo de corrida total dessas amostras foi rápido, em torno de 2 a 3 horas.

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, baseados no tamanho de cada fragmento marcado por terminadores corantes fluorescentes (ddNTPs) (CHEN et al., 1994; LEE et al., 1997; ROSENBLUM et al., 1997;).

Quando da passagem de cada fragmento pela área de leitura e detecção pelo laser de varredura, o corante fluorescente excitado pelo laser emite sinais luminosos que são submetidos a filtro conversor. Desta conversão, há a manipulação dos dados pelo tubo de detecção fotomultiplicador, que, por sua vez, envia informações para análise computadorizada. Importante frisar que todo o processo necessita de sensibilidade e especificidade suficientes para a individualização de fragmentos com apenas uma base de diferença, fundamental para a identificação da sequência de nucleotídeos do gene (DICKER et al., 1993; CHEN, 1994).

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo molecular foi realizado em amostras de MO obtidas por ocasião da coleta para a avaliação citológica necessária à confirmação diagnóstica ou para a confirmação da progressão da doença. Nenhum material adicional foi coletado.

Os procedimentos foram realizados após a obtenção das cartas de consentimento pós-informação, assinadas por pacientes que aceitaram participar do estudo (anexo 3) e após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

RESULTADOS

Foram analisados 44 pacientes dos quais 29 em diagnóstico inicial e 15 em recaída após terapêutica. Destes, 22 foram do sexo masculino e 22 do feminino.

A distribuição dos pacientes por idade apresentou média de 58,4 anos. Somente 1 paciente encontrava-se abaixo dos 40 anos de idade, quando da sua avaliação.

A média do número de PLs nas amostras de MO foi de 33,9%, variando de 5 a 90%. Seis dos nossos pacientes (13,6%) apresentaram contagem plasmocitária nas amostras de MO menor do que 10%, dado semelhante à da literatura (14%) (BOCCADORO & PILERI, 1997).

Quanto ao estadiamento clínico, dos 44 pacientes, obtivemos a seguinte classificação com respectiva frequência: 3 pacientes em estágio IA (6,8%); 8 pacientes em estágio IIA (18,2%); 2 pacientes em estágio IIB (4,5%), 15 pacientes em estágio IIIA (34,1%) e 13 pacientes em estágio IIIB (29,6%). Três pacientes não foram submetidos ao estadiamento (6,8%).

Tabela 3: Lista de pacientes com MM submetidos à investigação de mutação dos códons 12,13 e 61 do gene N-ras. ID: idade; SIT: situação clínica quando da avaliação; CN: ao diagnóstico; PR: em progressão; PL: plasmócitos; MO: medula óssea; EST: estadiamento

PACIENTE	ID (anos)	SIT	PL MO	EST	SEXO
1 (CAA)	34	PR	10 %	III B	M
2 (MR)	64	CN	11 %	III A	M
3 (LAS)	51	CN	41 %	III A	F
4 (SMS)	63	CN	77,5 %	III B	F
5 (MLS)	63	CN	26 %	III A	F
6 (JFM)	53	CN	79 %	III A	M
7 (CCF)	68	PR	48 %	NR	M
8 (TT)	53	CN	23 %	II A	F
9 (OASF)	70	CN	20,8 %	I A	M
10 (APC)	70	PR	13,5 %	III B	M
11 (OM)	78	PR	12,5 %	NR	M
12 (RTSG)	42	PR	80 %	I A	F
13 (MO)	41	PR	40 %	III A	F
14 (JLS)	69	CN	20,5 %	III B	M
15 (PSP)	69	PR	30 %	III B	M
16 (MSP)	58	PR	29 %	II A	F
17 (CGG)	76	CN	18 %	III A	F
18 (SAM)	43	CN	40 %	III B	F
19 (VAO)	69	CN	70,5 %	II B	M
20 (VMJ)	61	CN	42 %	III B	F
21 (JCS)	58	CN	20 %	NR	F
22 (JCR)	51	CN	67 %	III B	M
23 (RBR)	76	PR	6,5 %	III A	F
24 (JAA)	59	CN	33 %	III B	M
25 (MASD)	43	CN	27 %	II A	F
26 (MP)	54	PR	8,5 %	III A	F
27 (EAMF)	46	PR	5 %	II A	M
28 (WRS)	43	PR	20 %	III A	M
29 (MRBM)	61	CN	16 %	I A	F
30 (AOL)	48	CN	30 %	II A	F
31 (WRM)	46	CN	31,3 %	II B	M
32 (MTSM)	63	PR	24,4 %	III A	F
33 (ISS)	56	CN	65,5 %	II B	F
34 (MAL)	56	CN	90 %	III A	F
35 (PL)	61	PR	7,5 %	II A	M
36 (MTN)	64	CN	6 %	III A	M
37 (MM)	43	CN	10,5 %	III A	M
38 (JJS)	74	CN	81%	III B	M
39 (JPL)	53	CN	8 %	III B	M
40 (GAPM)	60	PR	23,5 %	II A	F
41 (SBD)	78	CN	53 %	III A	F
42 (PBF)	44	CN	51,5 %	III B	M
43 (JBV)	60	CN	54 %	III A	M
44 (FCB)	79	CN	21,5%	III B	F

Os resultados da investigação de mutações de ponto nos códons 12,13 e 61 no oncogene N-ras em 44 pacientes com MM foram negativos, isto é, nenhuma mutação nesses sítios susceptíveis (“hot-spots”) foi encontrada. A abordagem aqui utilizada é bastante sensível e específica, sendo capaz de definir claramente alterações mutacionais de ponto, tais como troca de base, deleções ou adições de pares de bases. Este fato foi demonstrado na literatura (BEZIEAU et al., 2001; KALAKONDA et al., 2001) e comprovado com a utilização de um controle positivo de estudo anterior realizado em nosso laboratório (figuras 5, 6 e 7).

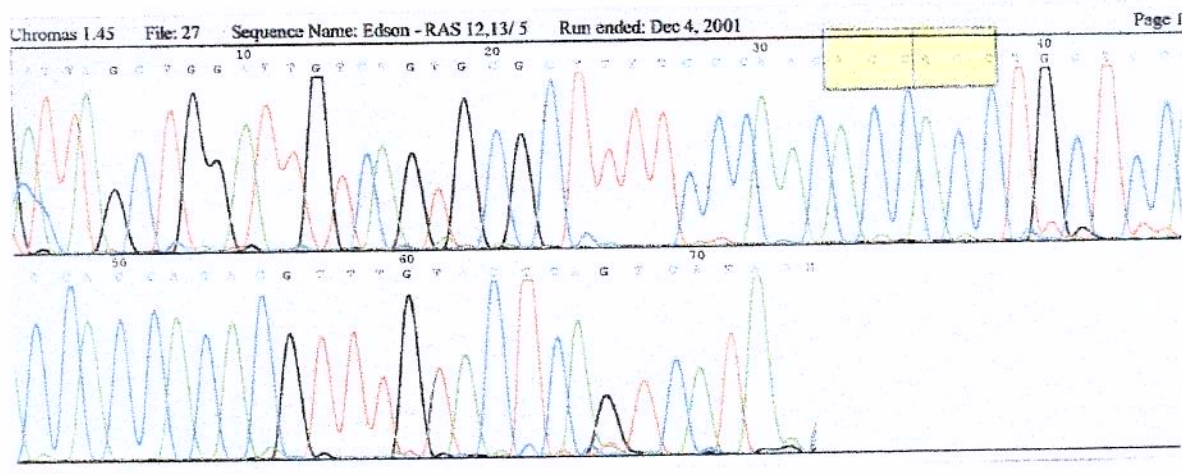


Figura 5. Exemplo de eletroferograma N-ras códons 12,13 em paciente com MM (amostra no. 5). A localização dos códons é observada em retângulo amarelo. Este padrão é o normal.

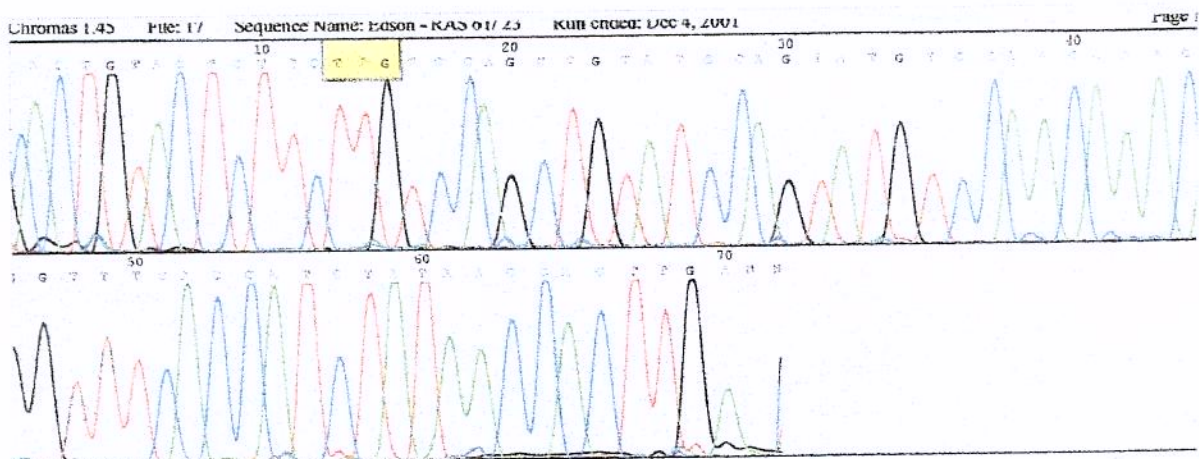


Figura 6. Exemplo de eletroferograma N-ras códon 61 em paciente com MM, (amostra no.23). A localização do códon é observada em retângulo amarelo. Este modelo mostrado é o de padrão normal.

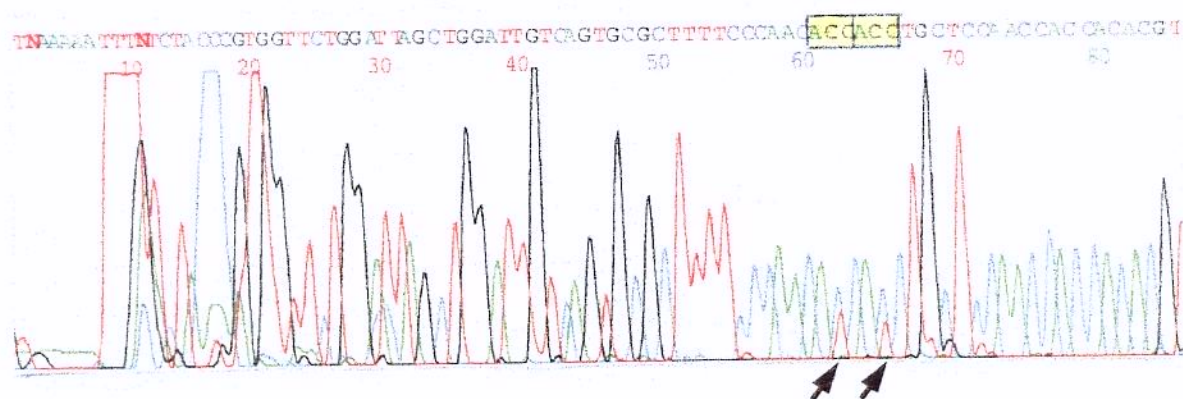


Fig. 7: Eletroferograma de controle positivo para mutação do gene N-ras, códons 12,13. Observar dois picos presentes nas segundas posições de ambos os códons, sendo um dos picos de cor azul (C) e outro de cor vermelha (T), indicando heterozigose, com mudanças de aminoácidos glicina (GGU-gly) para ácido aspártico (GAU-asp). A localização dos códons 12 e 13 está assinalada em retângulo amarelo. Este controle positivo foi extraído de trabalho anterior de nosso laboratório, em paciente com leucemia mielóide aguda, com mutação em ambos os códons 12 e 13.

DISCUSSÃO

O papel dos oncogenes na tumorigênese é importante no sentido de estimular ou desencadear um processo de proliferação exacerbada, que não respeita as regras habituais da homeostase, sobretudo no aspecto de reposição celular e tecidual (BOXER, 1994). Alguns dados sugerem participação fundamental do gene *N-ras* na origem e agressividade do MM.

O objetivo deste trabalho foi averiguar a frequência da ocorrência de mutações gênicas no proto-oncogene *N-ras* associadas à doença. Nesses casos, a literatura traz dados bastante interessantes em relação à participação do oncogene *ras* mutado em sua patogênese. A frequência de mutações do gene *ras* é bastante variável. LIU et al., em 1996, encontraram em 23,1% dos seus 346 pacientes com MM a mutação do *N-ras*. E dentre os subtipos N, o do códon 61 foi o mais comumente ligado ao MM, em 13,3% (HALLEK et al., 1998). Utilizando metodologia de amplificação alelo-específica (ARMS), BEZIEAU et al. encontraram, em 2001, em 54,5% dos seus 62 pacientes com neoplasia plasmocitária, alterações mutacionais nos genes *N-ras* e *K-ras*. Neste trabalho, *K-ras* suplantou *N-ras* em frequência de modificações nos “hot-spots”. CORRADINI et al. (1998) observaram mutações do oncogene *ras* em 9% de seus 77 casos de MM, sendo que 63,6% dos casos positivos apresentavam alterações no códon 61 do subtipo *N-ras*. NERI et al. (1989) detectaram em 18 de 56 amostras de pacientes com MM (32%) mutações no oncogene *ras*, dos quais 77% foram de tipo N. GREIPP et al. (1998) determinaram em sua casuística de 453 pacientes um achado de 39% de mutações do gene *ras*, com maior frequência naqueles que apresentaram morfologia plasmoblástica. YASUGA et al. (1995) encontraram 4,4% de mutações em 45 pacientes, sendo que os dois pacientes tiveram mutação no códon 61 do *N-ras*.

AHUJA et al. (1990) não identificaram mutações do oncogene *ras* em 6 pacientes com MM analisados.

Pacientes	% de mutações N- <i>ras</i>	CN / PR	Referência
56	30,4	43 / 13	NERI et al., 1989
6	0,0		AHUJA et al., 1990
77	9,0	53 / 24	CORRADINI et al., 1993
45	4,4		YASUGA et al., 1995
346	23,1		LIU et al., 1996
453	39,0*		GREIPP et al., 1998
62	54,5		BEZIEAU et al., 2001
34	100,0		KALAKONDA et al., 2001
44	0,0	29 / 15	Este trabalho

* mutação em todos os genes *ras*

KALAKONDA e colegas (2001) descreveram, em 34 pacientes com MM ao diagnóstico, a presença de mutações N-*ras* códon 61 em 100% dos pacientes. Utilizaram como estratégia para a pesquisa preparações de medula óssea altamente enriquecidas por plasmócitos neoplásicos em combinação com PCR-RFLP sensível. Essa separação celular foi obtida por marcação, em citometria de fluxo, de plasmócitos com CD138 e posterior purificação, permitindo análise de células plasmocíticas neoplásicas. A infiltração medular nessa amostra variou de 4 a 82%.

Em fases avançadas ou naquelas onde o comportamento biológico é mais agressivo, os relatos referem níveis de aproximadamente 67% de mutações, em média (DAVIES, 1997). A presença de mutação ativadora de todos os tipos de gene *ras* é correlacionada com prognóstico mais reservado, tal como no MM com maior presença de plasmoblastos (CORRADINI et al., 1993; GREIPP et al., 1998).

Neste trabalho não detectamos nenhuma mutação nos códons 12, 13 e 61 do gene *N-ras* dos 44 pacientes analisados.

Nossa casuística agrupa 44 pacientes com MM. A média etária é de 58,4 anos, sendo que a média na literatura varia de 61 a 65 anos (KYLE, 1996; BARLOGIE et al., 2001). Um paciente (2,3%) tinha idade inferior a 40 anos, dado semelhante à da literatura, que considera frequência menor que 3% (KYLE, 1996; BARLOGIE, 2001).

Em relação à situação clínica dos pacientes avaliados, 29 (65,9%) foram avaliados ao diagnóstico e 15 (34,1%) em progressão da doença, enquanto NERI et al. (1989) encontrou 76,8% e 23,2% e CORRADINI et al., em 1993, 68,8% e 31,2%, respectivamente. Quanto ao estadiamento, 63,7% dos nossos pacientes foram de estágio III, enquanto estágio III para CORRADINI et al. (1993) e para LIU et al. (1996) foram de 58,7 % e 64,4%, respectivamente. Estes dados demonstram proximidade com relatos de literatura.

Um detalhe importante é a correlação entre a intensidade de infiltração plasmocitária na MO, determinada pelo percentual de plasmócitos em relação ao número de leucócitos totais. Uma possibilidade técnica a ser discutida seria a não detecção das mutações pelos métodos utilizados pela reduzida proporção das células neoplásicas em relação às células normais. A sensibilidade das análises de detecção de mutação no gene *ras* por meio de seqüenciamento necessita que de 1 a 2% de população celular seja clonal, sugerindo que somente amostras que contenham ao menos 5% de plasmócitos possam ser analisadas para que se melhore a capacidade de achado de mutações (CORRADINI et al., 1993; LIU et al., 1996). O estudo de NERI et al. (1989) também determinou o limite de 5 a 10% de células malignas como o limiar de sensibilidade da metodologia utilizada.

Nossos controles mostraram que a mutação no estado heterozigótico (ou em uma mistura de células normais e neoplásicas) pode ser claramente detectável com a metodologia utilizada. Desta forma é pouco provável que os métodos levados a efeito neste trabalho não tenham detectado alguma mutação pois a infiltração de plasmócitos em medula óssea sempre foi maior do que 5%.

Os dados aqui obtidos, embora divergentes de vários relatos da literatura, não são únicos. CORRADINI et al. (1993) e YASUGA et al. (1995) encontraram baixa frequência de mutações e AHUJA et al. (1990) também não encontraram mutação no gene *ras* em pacientes com MM, embora estes últimos autores tenham avaliado apenas 6 pacientes.

Nossos dados sugerem que na população brasileira analisada mutações no gene *ras* aparentemente não foram fundamentais para a patogênese do MM. A peculiaridade de nossa população em relação ao contato com produtos químicos (agrotóxicos, solventes) e sobretudo quanto ao irregular controle do manuseio e exposição a essas substâncias pode estar ligada a essa situação. A investigação desse aspecto é de grande importância para o conhecimento dessa discussão, pois componentes das vias sinalizadoras do Ras tem sido abordados como alvos para o desenvolvimento de drogas anti-Ras do tratamento do câncer (CAMPBELL et al., 1998). Se os resultados desses pacientes com MM forem corroborados por outros estudos em nosso meio, possivelmente a eficácia desse tipo de terapêutica não seria tão benéfica para os pacientes brasileiros com MM.

Se a suposição de que a mutação do gene *ras* é necessária para a patogênese do MM é válida ou não para outros grupos populacionais é difícil de ser avaliado pelos

dados de literatura. Estudos abrangentes, multicêntricos, envolvendo pacientes de vários países poderiam contribuir para o esclarecimento desta questão.

CONCLUSÃO

A ausência de mutações no gene *N-ras* em nossos pacientes com MM sugere, aparentemente, que as mutações do gene não contribuíram para a patogênese da doença nesta população.

Além disso, esse dado indica que devem ser conduzidos estudos multicêntricos incluindo populações de várias regiões geográficas para que o papel do gene *ras* na gênese e evolução da doença possa ser esclarecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, H.G.; FOTI, A.; BAR-ELI, M.; CLINE, M.J. – The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematological malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. **Blood**, **75**: 1684 – 1690, 1990.
- AMIEL, A.; KIRGNER, Í.; GABER, E.; MANOR, Y.; FEJGIN, M. & LISHNER, M. - Replication pattern in cancer asynchronous replication in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **108**: 32-37, 1999.
- ANDERSON, K. – Plasma cell tumors. In: HOLLAND, J.F. - **Cancer Medicine**. 3 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 2075-2093.
- ANDERSON, K.C.; HAMBLIN, T.J.; TRAYNOR, A. – Management of multiple myeloma today. **Sem.Hematol.**, **36 (suppl.3)**: 3-8, 1999.
- BARBACID, M. – ras genes. **Ann. Rev. Biochem.**, **56**: 779-827, 1987.
- BARLOGIE, B.; SHAUGHNESSY, J.; MUNSHI, N.; EPSTEIN, J. - Plasma cell myeloma. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. - **Williams Hematology**. 6 ed. New York, McGraw-Hill, 2001. p.1279-1304.
- BARTL, R.; FRISCH, B.; DIEM, H.; MÜNDEL, M.; NAGEL, D.; LAMERZ, R.; FATH-MOGHADAM, A. - Histologic, biochemical, and clinical parameters for monitoring multiple myeloma. **Cancer**, **68**: 2241-2250, 1991.
- BEAUPRE, D.M. & KURZROCK, R. - RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. **J. Clin. Oncol.**, **17**: 1071-1079, 1999.
- BERENSON, J.R.; BERGSAGEL, P.L.; MUNSHI, N. - Initiation and maintenance of multiple myeloma. **Sem. Hematol. (suppl 3)**, **36**: 9-13, 1999.

- BERGER, L.C. & HAWLEY, R.G. – Interferon – beta interrupts interleukin – 6 dependent signaling events in myeloma cells. **Blood**, **89**: 261 – 271, 1997.
- BERGSAGEL, D.E.; WONG, O.; BERGSAGEL, P.L.; ALEXANIAN, R.; ANDERSON, K.; KYLE, R.A.; RAABE, G.K. - Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. **Blood**, **94**: 1174-1182, 1999.
- BEZIEAU, S.; DEVILDER, M-C.; AVET-LOISEAU, H.; MELLERIN, M-P.; PUTHIER, D.; PENNARUN, E.; RAPP, M-J. ; HAROUSSEAU, J-L.; MOISAN, J-P.; BATAILLE, R. – High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. **Hum. Mut.**, **18**: 212-224, 2001.
- BILLADEAU, D.; JELINEK, D.F.; SHAH, N.; LeBIEN, T.W.; VAN NESS, B. – Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. **Cancer Res.**, **55**: 3640 – 3646, 1995.
- BILLADEAU, D.; LIU, P.; JELINEK, D.; SHAH, N.; LeBIEN, T.W.; VAN NESS, B. – Activating mutations in the N- and K-ras oncogenes differentially affect the growth properties of the IL-6-dependent myeloma cell line ANBL6. **Cancer Res.**, **57**: 2268 –2275, 1997.
- BOCCADORO, M. & PILERI, A. – Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, **11**: 111 – 131, 1997.
- BOS, J.L. – Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, **49**: 4682-4689, 1989.
- BOS, J.L. – p21ras: An oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. **Eur. J. Cancer** **31A**: 1051-1054, 1995.

- BOS, J.L. – Ras. In: HALL, A., ed. – **GTPases**. Oxford, Oxford University Press, 2000. p. 67-88.
- BOSMAN, C.; FUSILLI, S.; BISCEGLIA, M.; MUSTO, P.; CORSI, A. – Oncocytic nonsecretory multiple myeloma. **Acta Haematol.**; **96**: 50-56, 1996.
- BOXER, L.M.- The role of oncogenes in hematologic malignancies. **Ann. Rev. Med.**, **45**: 1-11, 1994.
- BROWN, T.A . – Alterações no material genético. In: _____ - **Genética, um enfoque molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara- Koogan, 1999, p: 135-152.
- BYRNE, J.L. & MARSHALL, C.J. – The molecular pathophysiology of myeloid leukaemias: Ras revisited. **Br. J. Haematol.**, **100**: 256 – 264, 1998.
- CAMPBELL, S.L.; KHOSRAVI-FAR, R.; ROSSMAN, K.; CLARK, G.J.; DER, C.J. – Increasing complexity of Ras signaling. **Oncogene**, **17**: 1395-1413, 1998.
- CHADBURN, A.; CESARMAN, E.; KNOWLES, D.M. – Molecular pathology of posttransplantation lymphoproliferative disorders. **Sem. Diagn. Pathol.**, **14**: 15 – 26, 1997.
- CHEN, E.Y. – The efficiency of automated DNA sequencing. In: ADAMS, M.D., FIELDS, C.; VENTER, J.C. - **Automated DNA Sequencing and Analysis**. San Diego, Academic Press, 1994. p. 3-10.
- CHEN, T-C.; WU, J-H.; NG, K-F.; LIEN, J-M.; HUNG, C-F. – Solitary extramedullary plasmacytoma in the retroperitoneum. **Am. J. Hematol.**, **58**: 235-238, 1998.
- CHRISTOU, L.; HATZIMICHAEL, E.C.; SOTSIU-CANDILA, F.; SIAMOPOULOS, K.; BOURANTAS, K.L. - A patient with multiple myeloma amyloidosis and light-chain deposition disease in kidneys with a long survival. **Acta Haematol.**, **101**: 202-205, 1999.

CHURCH, G.M.; GRYAN, G.; LAKEY, N.; KIEFFER-HIGGINS, S.; MINTZ, L.; TEMPLE, M.; RUBENFIELD, M.; JAEHN, L.; GHAZIZADEH, H.; ROBISON, K.; RICHTERICH, P. – Automated multiplex sequencing. In: ADAMS, M.D., FIELDS, C.; VENTER, J.C. - **Automated DNA Sequencing and Analysis**. San Diego, Academic Press, 1994. p. 11-16.

CORRADINI, P.; LADETTO, M.; VOENA, C.; PALUMBRO, A.; INGHIRAMI, G.; KNOWLES, D.M.; BOCCADORO, M.; PILERI, A. – Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. **Blood**, **81**: 2708 – 2713, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. – Oncogenes in cancer. In: - _____ - **Robbins: Pathologic Basis of Disease**, 5 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1994. p. 259.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. – Plasma cell dyscrasias and related diseases. In: _____ - **Robbins: Pathologic Basis of Disease**, 5 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1994. p. 662-665.

CRABTREE, G.R. & CLIPSTONE, N.A. – Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. **Ann. Rev. Biochem.**, **63**: 1045-1083, 1994.

CROUCHER, P.I. & APPERLEY, J.F. – Bone disease in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **103**: 902-910, 1998.

DAVIES, F.E. – The use of biological variables to predict outcome in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **99**: 719 – 725, 1997.

De ROBERTIS, E.M.F. & HIB, J. – A comunicação intercelular e a transmissão intracelular de sinais. In: _____ - **Bases da Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2001. p:193-207.

DER, C.J.; BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.; CLARK, G.J.; COFFEY, R.J.; GANGAROSA, L.M.; KHOSRAVI-FAR, R.; OLDHAM, S.M.; SOLSKI, P.A.; VAN AELST, L.; WESTWICK, J.K.; WHITE, M.A.; WIGLER, M.H. – Ras causes tumorigenic transformation by activation of Raf/MAPK-dependent and -independent signaling pathways. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, **37**: 653-654, 1996.

DESHPANDE, H.A., HU, X-P., MARINO, P., JAN, N.A.; WIERNIK, P.H. - Anticipation in familial plasma cell dyscrasias. **Br. J. Haematol.**, **103**: 696-703, 1998.

DHANASEKARAN, N. – Cell signaling: an overview. **Oncogene**, **17**: 1329-1330, 1998.

DHANASEKARAN, N.; TSIM, S-T.; DERMOTT, J.M.; ONESIME, D. - Regulation of cell proliferation by G proteins. **Oncogene**, **17**: 1383-1394, 1998.

DICKER, A.P.; VOLKENANDT, M.; BERTINO, J.R. – Manual and automated sequencing of product generated by the Polymerase Chain Reaction. In: WHITE, B.A **Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications**. Totowa, NJ, Humana Press, 1993. p. 143-152.

DIMOPOULOS, M.A.; MOULOPOULOS, L.A.; MANIATIS, A - Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. **Blood**, **96**: 2037-2044, 2000.

DUCHOSAL, M.A. – B-cell development and differentiation. **Sem. Hematol.**, **34**: 2-12, 1997.

DURIE, B.G.M. & SALMON, S.E. - A clinical staging for multiple myeloma. **Cancer**, **36**: 842-854, 1975.

DURIE, B.G.M. – Staging and kinetics of multiple myeloma. **Sem. Oncol.**, **13**: 300-309, 1986.

- FEINMAN, R.; SAWYER, J.; HARDIN, J.; TRICOT, G. – Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, **11**: 1 – 25, 1997.
- FELIERS, D.; WOODRUFF, K.; ABBOUD, S. – Potential role of insulin-like growth factor binding protein-4 in the uncoupling of bone turnover in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **104**: 715-722, 1999.
- FOERSTER, J. & PARASKEVAS, F. – Multiple myeloma. In: LEE, G.R., FOERSTER, J., LUKENS, J., PARASKEVAS, F., GREER, J.P.; RODGERS, G.M. - **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10 ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 2631-2680.
- FRENCH, J.D., TSCHUMPER, R.C.; JELINEK, D.F. – Dissection of the signalling requirement of interleukin-6-stimulated myeloma cell growth. **Acta Oncol.**, **39**: 777-781, 2000.
- GREIPP, P.R.; LEONG, T.; BENNETT, J.; GAILLARD, J.P.; KLEIN, B.; STEWART, J.A.; OKEN, M.M.; KAY, N.E.; VAN NESS, B.; KYLE, R.A. – Plasmablastic morphology – an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. **Blood**, **91**: 2501 – 2507, 1998.
- GRIFFITHS, A. J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. – Regulação do número de células: células normais e células cancerosas. In: _____ - **Genética Moderna**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2001. p. 419-440.
- GUISE, T.A. & MUNDY, G.R. – Cancer and bone. **Endoc. Rev.**, **19**: 18-54, 1998.
- GUTKIND, J.S. – Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. **Oncogene**, **17**: 1331-1342, 1998.

- HAGHIGHI, B.; YANAGIHARA, R.; CORNBLEET, P.J. – IgM myeloma: case report with immunophenotypic profile. **Am. J. Hematol.**, **59**: 302-308, 1998.
- HALLEK, M.; BERGSAGEL, L.; ANDERSON, K.C. – Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. **Blood**, **91**: 3 – 21, 1998.
- HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T.A.; BLOOMFIELD, C.D. – World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: reports of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. **J. Clin. Oncol.**, **17**: 3835-3849, 1999.
- HAUBRUCK, H. & McCORMICK, F. – Ras p21: effects and regulation. **Bioch. Bioph. Acta**, **1072**: 215-219, 1991.
- HILL, C.S. & TREISMAN, R. – Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, **80**: 199-211, 1995.
- HRUBAN, R.H.; STURM, D.J.; SLEBOS, R.J.C; WILENTZ, R.E.; MUSLER, A.R.; YEO, T.A.; VAN VELTHUYSEN, M-L.F.; OFFERHAUS, G.J.A. – Can K-ras codon 12 mutations be used to distinguish benign bile duct proliferations from metastases in the liver? A molecular analysis of 101 liver lesions from 93 patients. **Am. J. Pathol.** **151**: 943-949, 1997.
- HUANG, X.C. & MATHIES, R.A. – Application of capillary array electrophoresis to DNA sequencing. In: ADAMS, M.D., FIELDS, C.; VENTER, J.C. - **Automated DNA Sequencing and Analysis**. San Diego, Academic Press, 1994. p. 17-28.
- HUNTER, T. – Oncoprotein networks. **Cell**, **88**: 333 – 346, 1997.
- KALAKONDA, N.; ROTHWELL, D.G.; SCARFFE, H.; NORTON, J.D. - Detection of N-RAS codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation. **Blood**, **98**: 1555-1560, 2001.

- KARP, G. – Cell signaling: communication between cells and their environment. In: _____. – **Cell and Molecular biology. Concepts and Experiments** . 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1999. p: 655- 699.
- KARP, G. – Cancer. In: _____. - **Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments**. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1999. p:700-732.
- KAWANO, M.M.; HUANG, N.; HARADA, H.; HARADA, Y.; SAKAI, A.; TANAKA, H.; IWATO, K.; KURAMOTO, A. – Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. **Blood**, **82**: 564-570, 1993.
- KIMMELMAN, A.; TOLKACHEVA, T.; LORENZI, M.V.; OSADA, M.; CHAN, A.M-L. – Identification and characterization of R-ras 3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution. **Oncogene**, **15**: 2675 – 2685, 1997.
- KISHIDA, S.; KOYAMA, S.; MATSUBARA, K.; KISHIDA, M.; MATSUURA, Y.; KIKUCHI, A. - Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. **Oncogene**, **15**: 2899-2907, 1997.
- KIVINEN, L.; TSUBARI, M.; HAAPAJÄRVI, T.; DATTO, M.B.; WANG, X.F.; LAIHO, M. - Ras induces p21 Cip1/Waf1 cyclin kinase inhibitor transcriptionally through Sp1-binding sites. **Oncogene**, **18**: 6252-6261, 1998.
- KLEIN, B. – Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma. **Sem. Hematol.**, **32**: 4 – 19, 1995.
- KLEIN, G. – Oncogenes. In: HOLLAND, J.F. **Cancer Medicine**. 3 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 65-77.

- KLEIN, U.; GOOSSENS, T.; FISCHER, M.; KANZLER, H.; A.; BRAEUNINGER, RAJEWSKY, K; KÜPPERS, R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. **Immunol. Rev.**, **162**: 261-280, 1998.
- KOLCH, W. - Meaning relationship: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.**, **351**:289-305, 2000.
- KOPRESKI, M.S.; BENKO, F.A.; KWEE, C.; LEITZEL, K.E.; ESKANDER, E.; LIPTON, A.; GOCKE, C.D. – Detection of mutant k-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, **76**: 1293-1299, 1997.
- KRÖNIG, R.; SUKUMAR, S.; BARBACID, M. – Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. **Science**, **248**: 1101-1104, 1990.
- KUMAR, R.; SUKUMAR, S.; BARBACID, M. -Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. **Science**, **248**: 1101-1104, 1990.
- KYLE, R.A. – Multiple myeloma and other plasma cell disorders. In: HOFFMAN, R. **Hematology. Basic Principles and Practice**. 2 ed. New York, Churchill Livingstone 1995. p. 1354-1374.
- KYLE, R.A. & BLADÉ, J. – Multiple myeloma and related disorders. In: ABELOFF, M.D. **Clinical Oncology**. New York, Churchill Livingstone, 1995. p. 2053-2073.
- KYLE, R.A. - Plasma cell disorders. In: BENNETT, J.C. & PLUM, F. - **Cecil Textbook of Medicine**. 20 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1996. p. 958-968.
- LADANYI, M.; WANG, S.; NIESVIZKY, R.; FEINER, H.; MICHAELI, J. - Proto-oncogene analysis in multiple myeloma. **Am. J. Pathol.**, **141**: 949 – 953, 1992.
- LAMY, O.; JENZER-CLOSUIT, A.; BURCKHARDT, P. – Hypercalcemia of malignancy: an undiagnosed and undertreated disease. **J. Int. Med.**, **250**: 73-79. 2001.
- LeBIEN, T.W. – Fates of human B-cell precursors. **Blood**, **96**: 9-23, 2000.

- LEE, L.G.; SPURGEON, S.L.; HEINER, C.R.; BENSON, S.C.; ROSENBLUM, B.B.; MENCHEN, S.M.; GRAHAM, R.J.; CONSTANTINESCU, A.; UPADHYA, K.G.; CASSEL, J.M. – New energy transfer dyes for DNA sequencing. **Nucleic Acids Res.**, **25**: 2816-2822, 1997.
- LEVINE, A.J. – Principles of cell regulation. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. - **Williams Hematology**. 5 ed. New York, McGraw-Hill, 1995, p.: 107 – 113.
- LEWIN, B. - Oncogenes and cancer. In: _____. - **Genes** VI ed. Oxford University Press, 1997. p. 1131 – 1172.
- LEWIN, B. – Transdução de sinais. In: _____. - **Genes** VII ed. Porto Alegre, Artmed, 2001. p. 765-797.
- LINKER, C.A. - Multiple myeloma. In: TIERNEY, Jr., L.M.; McPHEE, S.J.; PAPADAKIS, M.A. – **Current Medical Diagnosis and Treatment** 40 ed. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001. p. 538-540.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. – **Molecular Cell Biology**. 4 ed. New York, W. H. Freeman and Company, 2001. 1084p.
- LIU, P.; LEONG, T.; QUAM, L.; BILLADEAU, D.; KAY, N.E.; GREIPP, P.; KYLE, R.A.; OKEN, M.M.; VAN NESS, B. - Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III trial. **Blood**,: 2699 – 2706, 1996.
- LORENZI, T.F. – Doenças proliferativas da linhagem linfóide. In: VERRASTRO, T., LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. - **Hematologia e Hemoterapia, Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo, Atheneu, 1998. p. 139-173.

- LYONS, J.; JANSSEN, J.W.G.; BARTRAM, C.; LAYTON, M.; MUFTI, G.J. - Mutation of Ki-ras and N-ras oncogenes in myelodysplastic syndromes. **Blood**, **71**: 1707-1712, 1988.
- MARTINEZ, M.H.; MALTZMAN, T.; MARSHALL, J.R.; EINSPAHR, J.; REID, M.E.; SAMPLINER, R.; AHNEN, D.J.; HAMILTON, S.R.; ALBERTS, D.S. - Risk factor for Ki-ras protooncogene mutation in sporadic colorectal adenomas. **Cancer Res.**, **59**: 5181-5185, 1999.
- MELLSTEDT, H. - Progress in the understanding of the biology and the treatment of multiple myeloma. **Acta Oncol.**, **39**: 763-764, 2000.
- MELO, M.B. - Mutações do oncogene N-ras em leucemias agudas. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- MELO, M.B.; LORAND-METZE, I.; LIMA, C.S.P.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. - N-ras gene point mutations in Brazilian acute myelogenous leukemia patients correlate with poor prognosis. **Leukemia and Lymphoma**, **24**: 309 - 317, 1997.
- MOON, A.; KIM, M-S.; KIM, T-G.; KIM, S-H.; KIM, H.E.; CHEN, Y.Q.; KIM, H-R. - H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. **Int. J. Cancer**, **85**: 176-181, 2000.
- NAKANO, Y.; KIYOI, H.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; OHNO, R.; SAITO, H.; NAOE, T. - Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. **Br. J. Haematol.**, **104**: 659-664, 1999.
- NELSON, H.H.; CHRISTIANI, D.C.; WIENCKE, J.K.; MARK, E.J.; WAIN, J.C.; KELSEY, K.T. - K-ras mutation and occupational asbestos exposure in lung adenocarcinomas: asbestos-related cancer without asbestosis. **Cancer Res.**, **59**: 4570-4573, 1999.

- NERI, A.; KNOWLES, D.M.; GRECO, A.; McCORMICK, F.; DALLA-FAVERA, R. - Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. **Proc. Natl. Ac. Sci. USA**, **85**: 9268-9272, 1988.
- NERI, A.; MURPHY, J.P.; CRO, L.; FERRERO, D.; TARELLA, C.; BALDINI, L.; DALLA-FAVERA, R. - ras oncogene mutation in multiple myeloma. **J. Exp. Med.**, **170**: 1715-1725, 1989.
- NISHIMOTO, N.; SHIMA, Y.; YOSHIZAKI, K. – Myeloma biology and therapy. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, **11**: 159-172, 1997.
- O'LEARY, J.J.; ENGELS, K.; DADA, M.A. – The polymerase chain reaction in pathology. **J. Clin. Pathol.**, **50**: 805-810, 1997.
- PAPADAKI, H.; KYRIAKOU, D.; FOUDOLAKIS, A.; MARKIDOU, F.; ALEXANDRAKIS, M.; ELIOPOULOS, G.D. – Serum levels of soluble IL-6 receptor in multiple myeloma as indicator of disease activity. **Acta Haematol.**, **97**: 191-195, 1997.
- PASQUALETTI, P.; CASALE, R.; COLLACIANI, A.; ABRUZZO, B.; COLANTONIO, D. – Multiple myeloma: relationship between survival and cellular morphology. **Am. J. Hematol.**, **33**: 145-147, 1990.
- PASSARGE, E. - Cell-to-cell interactions. In: _____. - **Color Atlas of Genetics**, 2 ed. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2001. p. 264-299.
- PATTENGAL, P.K. - Role of interleukine-6 in the pathogenesis of murine plasmacytoma and human multiple myeloma. **Am. J. Pathol.**, **151**: 647-649, 1997.
- PORTER, A. C. & VAILLANCOURT, R.R. – Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. **Oncogene**, **16**: 1343-1352, 1998.

RAW, I. & HO, P.L. – cAMP e Ca^{2+} como segundos mensageiros. In: _____. **Integração e seus sinais**. São Paulo, Editora Unesp, 1999. p. 31-79.

REBOLLO, A. & MARTINEZ-A, C. – Ras proteins: recent advances and new functions. **Blood**, **94**: 2971-2980, 1999.

REUTER, C.W.W.; MORGAN, M.A.; BERGMANN, L. – Targeting the Ras signaling pathway. a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? **Blood**, **96**: 1655-1669, 2000.

RODENHUIS, S. & SLEBOS, R.J.C. – Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. **Cancer Res.**, **52**: 2665 – 2669, 1992.

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R.J.; BOOT, A.J.M.; EVERS, S.G.; MOOI, W.J.; WAGENAAR, A.A.; VAN BODEGOM, P.C.; BOS, J.L. - Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. **Cancer Res.**, **48**: 5738-5541, 1988.

ROGERS, B.B.; ALPERT, L.C.; HINE, E.A.S.; BUFFONE, G.J. - Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. **Am. J. Pathol.**, **136**: 541 – 548, 1990.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. – Células envolvidas nas respostas imunes. In: _____. **Imunologia**, 4 ed. São Paulo, Manole, 1997. p. 2.1-2.17.

ROLLINS, B.J. & STILES, C.D. – Molecular biology. In: HOLLAND, J.F. – **Cancer Medicine**. 3 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 14-32.

ROSENBLUM, B.B.; LEE, L.G.; SPURGEON, S.L.; KHAN, S.H.; MENCHEN, S.M.; HEINER, C.R.; CHEN, S.M. - New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. **Nucleic Acids Res.**, **25**: 4500-4504, 1997.

- ROWINSKY, E.K.; WINDLE, J.J.; VON HOFF, D. - Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. **J. Clin. Oncol.**, **17**: 3631-3652, 1999.
- RUDIN, C.M. & THOMPSON, C.B. – B-cell development and maturation. **Sem.Oncol.**, **25**: 435-446, 1998.
- SALGIA, R. & SKARIN, A.T. - Molecular abnormalities in lung cancer. **J. Clin.Oncol.**, **16**: 1207 – 1217, 1998.
- SAMPSON, F.C.; BEARD, S.M.; SCOTT, F; VANDENBERGHE, E. – Cost-effectiveness of high-dose chemotherapy in first-line treatment of advanced multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **113**: 1015-1019, 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **74**: 5463-5467, 1977.
- SIEBURTH, D.S.; SUN, Q.; HAN, M. – SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signalling in *C. elegans*. **Cell**, **94**: 119-130, 1998.
- STERNBERG, P.W. & ALBEROLA-ILA, J. – Conspiracy theory: RAS and RAF do not act alone. **Cell**, **95**: 447-450, 1998.
- SUCHY, B.; WALDMANN, V.; KLUGBAUER, S.; RABES, H.M. –Absence of RAS and p53 mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. **Br. J. Cancer**, **77**: 952-955, 1998.
- SUKPANICHNANT, S.; COUSAR, J.B.; LEELASIRI, A.; GRABER, S.E.; GREER, J.P.; COLLINS, R.D. – Diagnostic criteria and histological grading in multiple myeloma. **Hum. Pathol.**, **25**:303-318, 1994.

- THERRIEN, M.; WONG, A.M.; RUBIN, G.M. - CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signalling. **Cell**, **95**:343-353, 1998.
- TSUCHIYA, J.; MURAKAMI, H.; KANO, T.; KOSAKA, M.; SEZAKI, T.; MIKUNI, C.; KAWATO, M.; TAKAGI, T.; TOGAWA, A.; ISOBE, T.; SUZUKI, K.; IMAMURA, Y.; TAKATSUKI, K. - Ten-year survival and prognostic factors in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **87**: 32-834, 1994.
- UINGS, I.J. & FARROW, S.N. - Cell receptors and cell signalling. **J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.**, **53**: 295-299, 2000.
- VANDE-WOUDE, S. & VANDE-WOUDE, G.F. - Principles of molecular cell biology of cancer: introduction to methods in molecular biology. In: DEVITA JR., V.T., HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. - **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 4 ed. Philadelphia. J.B. Lippincott Co., 1993. p: 3-22.
- VON LINTING, F.C.; HUVAR, I.; LAW, P.; DICCIANI, M.B.; YU, A.L.; BOSS, G.R. - Ras activation in normal white blood cells and childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clin.Cancer Res.**, **6**: 1804-1810, 2000.
- WALKER, M.R. & RAPLEY, R. - Métodos para determinação da sequência de nucleotídeos do DNA. In: _____. - **Guia de Rotas na Tecnologia do Gene**. São Paulo, Atheneu, 1999. p. 140-147.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. - Oncogenes and anti-oncogenes. In: _____. - **Recombinant DNA**. 2 ed. New York, W.H. Freeman and Cy., 1992. p. 335-367.
- WEINBERG, R.A. - Ras oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. **Blood**, **64**: 1143-1145, 1984.
- WHITE, M.A.; NICOLETTE, C.; MINDEM, A.; POLVERINO, A.; VAN AELST, L.; KARIN, M.; WIGLER, M.H. - Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. **Cell**, **80**: 533-541, 1995.

- WITTINGHOFFER, A. – The functioning of molecular switches in three dimensions. In: HALL, A. – **GTPases**. Oxford, Oxford University Press, 2000. p. 244-310.
- WITZIG, T.E.; TIMM, M.; LARSON, D.; THERNEAU, T. & GREIPP, P.R. - Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. **Br. J. Haematol.**, **104**: 131-137, 1999.
- YAP, E.P.H & MCGEE, J.O'D. - Detection of mutations by PCR. In: **PCR Technology: Current Innovations**. CRC Press Inc., 1994. p: 107-120
- YASUGA, Y.; HIROSAWA, S.; YAMAMOTO, K.; TOMIYAMA, J.; NAGATA, K.; AOKI, N. – N-ras and p53 gene mutations are very rare events in multiple myeloma. **Int. J. Hematol.**, **62**: 91, 1995.

ANEXOS

Anexo 1

Critérios diagnósticos para o mieloma múltiplo

Critérios maiores:

- I – plasmocitoma em biópsia de tecidos
- II – plasmocitose na medula óssea; > 30 % de plasmócitos
- III – pico monoclonal de gamaglobulinas em eletroforese sérica:
 - IgG > 3,5 g/dL ou
 - IgA > 2,0 g/dLou excreção de cadeias leves κ ou λ na urina de 24 h > 1,0 g

Critérios menores:

- A – plasmocitose na medula óssea entre 10 e 30 % dos leucócitos
- B – pico gama monoclonal presente em níveis menores que as estabelecidas nos critérios maiores
- C – lesões osteolíticas
- D – IgM < 0,05 g/dL, IgA < 0,1g/dL ou IgG < 0,6 g/dL

Diagnóstico de mieloma múltiplo: 1 critério maior + 1 critério menor ou
3 critérios menores
nas seguintes combinações:

- 1 – I + B, I + C, I + D
 - 2 – II + B, II + C, II + D
 - 3 – III + A, III + C, III + D
 - 4 – A + B + C, A + B + D
-

Anexo 2

Categorização para estadiamento clínico-laboratorial:

Estadio I:

- nível de hemoglobina $> 10,0$ g/dL
- cálcio sérico ≤ 12 mg/dL
- osteólise ausente ou plasmocitoma ósseo solitário
- taxas de produção baixa de Ig monoclonal:
 - IgG $< 5,0$ g/dL
 - IgA $< 3,0$ g/dL
 - proteinúria monoclonal < 4 g/24 h

Estadio II:

- dados intermediários entre estadios I e III

Estadio III:

- nível de hemoglobina $< 8,5$ g/dL
- cálcio sérico > 12 mg/dL
- osteólise avançada – grau 3
- taxas elevadas de produção de Ig monoclonal
 - IgG $> 7,0$ g/dL
 - IgA $> 5,0$ g/dL
 - proteinúria monoclonal > 12 g/24 h

Subclassificação:

- A – função renal relativamente normal (creatinina sérica $< 2,0$ mg/dL)
- B – função renal anormal (creatinina sérica $\geq 2,0$ mg/dL)
-

Anexo 3

Termo de consentimento livre e esclarecido para
participação do projeto de estudo intitulado:

“MUTAÇÕES DO GENE N-ras EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO”

Nome do paciente:.....

Idade:anos RG: HC:.....

Endereço:

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de parentesco:.....

Endereço:.....

Estou ciente de que para realizar o diagnóstico da minha doença ou de sua recaída, necessito ser submetido à punção de medula óssea. Este procedimento é realizado por meio de punção por agulha no osso esterno ou em osso da bacia. Trata-se de um procedimento de rápida duração (cerca de 5 minutos), cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local da punção, que é atenuada com a anestesia local. Estou ciente que parte da amostra de medula óssea, colhida para o diagnóstico da minha doença ou a identificação de recaídas, será utilizada para a pesquisa de mutações do gene N-ras observáveis na minha doença. Desta forma, estarei participando do estudo “Mutações do Gene N-ras em Pacientes com Mieloma Múltiplo”. Estou ciente de que o material obtido será utilizado apenas para esta pesquisa. Serei beneficiado com a realização da punção de medula óssea porque os resultados obtidos deste exame vão determinar o meu diagnóstico ou identificar as recaídas da doença. Estou ciente de que não terei prejuízos com realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo

pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo poderei procurar o Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa no Hemocentro – UNICAMP, à rua Carlos Chagas, 480, Campus da Cidade Universitária. CEP 13081-970. Tel.: 3788 8740 e 3788 8022. Fax: 3788 8750.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel.: 3788 8936. Fax: 3788 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimento sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador legal

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa