

BC/21328
IB/81002

T/UNICAMP

M491_m

Mônica Barbosa de Melo



Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
MÔNICA BARBOSA MELO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

MUTAÇÕES DO ONCOGENE N-ras EM LEUCEMIAS AGUDAS

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, Área de Genética Médica

Campinas

- 1994 -



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M 491 m
V.	Ex
TOMBO BC	21328
PROC.	286194
C	☐
D	☒
PREÇO	CR\$ 800,00
DATA	30/03/94
N.º CPD	

CM-00057977-5

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Dacila, pelo apoio, incentivo e
amizade inestimáveis.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pelo exemplo de seriedade, pela orientação, confiança e apoio.

À Profa. Dra. Sara T.O. Saad pelas sugestões apresentadas no exame prévio e no decorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Carmen S.B. Martins pela valiosa amizade, pelo exemplo de força, garra e disposição, pelos ensinamentos das primeiras técnicas de hibridização e pelas sugestões no exame prévio.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati pelo agradável convívio e sugestões durante o exame prévio.

À Profa. Dra. Irene Lorand-Metze pelas valiosas sugestões durante o exame prévio.

À Profa. Dra. Christine Hackel pelo apoio, pela agradável convivência durante esses anos e pelas sugestões dadas com relação a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Magna pelos primeiros passos na iniciação científica.

À Marilda pela amizade e pela paciência no laboratório no decorrer das primeiras técnicas.

À Celinha pela amizade e apoio didático.

À Malu pela amizade e incrível ajuda na área de informática.

À Lena pelo carinho especial e auxílio no laboratório.

À Ana Paula e ao Carlos pelo apoio estatístico.

À Carmen Silvia Passos Lima pela amizade e grande apoio na parte clínica deste trabalho.

À Noelandi pelo capricho nas fotografias.

À Silvia Miranda pelo convívio e inestimável amizade.

À Stefânia pela super amizade.

Ao José Paulo pela paciência, compreensão e amor.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	18
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÕES.....	73
RESUMO	76
SUMMARY	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	i

Aos colegas e residentes Marcelo, João Augusto, Kátia, Simone, Alexandre, Valéria, Katinha e Lupa pela coleta das amostras dos pacientes.

Aos colegas: Maristela, Patricia, Valder, Aranha, Afonso, Silvana, Tereza, Dilmara, Simone, Carlos, Adriana, Tita, Sandra, Lili, Neiva, Luís Cláudio, Luciana, Roberto, Maria Paula e Cris pelo convívio e amizade.

Aos pacientes atendidos no ambulatório da Disciplina de Hematologia da FCM UNICAMP.

Ao Hemocentro da UNICAMP, à FAPESP, ao CNPq e ao FAEP pelo apoio financeiro.

A todos que, no decorrer deste trabalho, fizeram parte da minha vida e contribuíram para o meu crescimento profissional e como ser humano.

INTRODUÇÃO

A hipótese da existência de um agente infeccioso que poderia induzir a formação de tumores em aves foi formulada por Peyton Rous no início deste século. Estudos posteriores conduziram à descrição do vírus do sarcoma de Rous, caracterizado como um retrovírus capaz de provocar o aparecimento de neoplasias (Rous, 1967).

Retrovírus são vírus cujo material genético é constituído por RNA e que contêm duas cópias de seu genoma em cada "vírion" (forma extracelular do vírus). Estes vírus são caracterizados pela propriedade de transcrever estas seqüências de RNA em uma cópia de DNA com dupla hélice que é então integrada ao genoma da célula infectada. A transcrição ocorre precocemente durante o processo infeccioso e é catalisada por uma enzima denominada transcriptase reversa. Esta enzima utiliza as duas cópias do genoma viral e por meio de um mecanismo complexo de ligação entre as duas hélices dá origem a uma cópia completa de DNA denominada de provírus, a qual uma vez integrada ao genoma da célula hospedeira tem comportamento semelhante a qualquer gene celular. A propriedade tumorigênica desse gene forneceu o substrato para sua caracterização como oncogene, termo que passou a representar genericamente um gene do genoma viral capaz de induzir tumores (Rosenberg & Krontiris, 1991).

A investigação a respeito dos mecanismos envolvidos nessa propriedade de produzir tumores mostrou que a indução de fibrosarcomas em aves e a transformação de fibroblastos de embriões de aves em cultura de tecidos requeria um gene viral chamado src ("sark"). A análise pormenorizada desse fragmento gênico facultou uma notável descoberta em biologia, que o gene src é homólogo a um gene celular normal presente não somente em pássaros, mas também em numerosos outros seres eucarióticos, desde mamíferos até *Drosophilas*. Este achado foi seguido por estudos que revelaram que todos os retrovírus que transformaram células em cultura de tecidos ou induziram tumores de curta latência "in vivo" continham genes transformantes distintos do src, mas que também derivavam de genes celulares normais (Rosenberg & Krontiris, 1991). O termo proto-oncogene foi introduzido com o objetivo de diferenciar a forma celular normal (c-oncogenes) da sua forma viral (v-oncogenes) (Minden, 1987).

Merece menção que três dessas descobertas originadas do estudo dos retrovírus, a descrição dos vírus indutores de câncer, a identificação da transcriptase reversa e a detecção dos

oncogenes celulares, resultaram na concessão do Prêmio Nobel de Medicina para respectivamente Francis Peyton Rous (1966), David Baltimore, Renato Dulbecco e Howard Temin (1975) e J. Michael Bishop e Harold Varmus (1989).

Estes proto-oncogenes foram então extensivamente estudados tendo sido demonstrado sua conservação durante a evolução, o que sugere que possam desempenhar papéis importantes no metabolismo e crescimento celular. Desse modo, a hipótese hoje amplamente aceita é que um proto-oncogene foi incorporado ao genoma viral em um mecanismo de "captura", e então, nesse novo estado, seria capaz de induzir a formação de tumores. As hipóteses que explicam o fato de um gene envolvido no mecanismo fisiológico celular normal passar a induzir crescimento maligno são múltiplas. Em primeiro lugar, é conhecido que, vários tipos de alterações podem ocorrer como consequência da captura desses genes, pois os genes celulares são removidos dos elementos que controlam sua expressão. No retrovírus a expressão do gene é controlada pelo promotor viral e por elementos estimuladores ("enhancers") localizados na posição terminal 5' do retrovírus integrado, em uma estrutura chamada "long terminal repeat" ou LTR. Os sinais de poliadenilação são fornecidos pelas seqüências LTR localizadas na posição terminal 3' do genoma viral. Em segundo lugar, visto que o gene está contido em um elemento infeccioso, ele pode ser introduzido em células que normalmente não expressariam essas seqüências. Finalmente, na maioria dos casos a seqüência codificadora do gene celular é alterada como consequência da recombinação com o genoma viral (Rosenberg & Kravitz, 1991).

Os proto-oncogenes produzem moléculas proteicas que estão intimamente envolvidas no controle da proliferação ou diferenciação celular. De acordo com as propriedades funcionais das proteínas produzidas pelos proto-oncogenes, eles são genericamente classificados em proto-oncogenes com ação de fatores de crescimento, com ação de receptores de fatores de crescimento, com ação de proteínas quinases, com ação de proteínas G e proto-oncogenes que dão origem a proteínas nucleares:

1- Proto-oncogenes com ação de fatores de crescimento

Exemplos desse tipo de proto-oncogene incluem *c-sis*, *int-2*, *hst*. O gene foi descoberto em um vírus produtor de sarcoma em primatas. A proteína codificada pelo proto-oncogene *sis* é homóloga ao fator plaquetário de crescimento (platelet derived growth factor - PDGF).

2- Proto-oncogenes com ação de receptores de fatores de crescimento

Essa classe de proto-oncogenes é representada por *c-erbB1*, *c-erbA*, *c-erbB2*, *c-fms*. As proteínas dos receptores de fatores de crescimento são localizadas na membrana celular e aparentemente têm a função de enviar um sinal à estrutura intracelular após a interação com o fator de crescimento.

3- Proto-oncogenes com ação de proteínas-quinases

Esse tipo de proto-oncogene compreende a maior família conhecida desses genes. O protótipo dessa classe é o *c-src*, que codifica uma proteína que está localizada na superfície interna da membrana celular e é capaz de fosforilar resíduos tirosina em uma grande variedade de substratos. Além do *c-src* podemos citar *c-abl*, *c-yes*, *c-mil/raf*.

4- Proto-oncogenes com ação de proteínas G

Essa classe de proto-oncogenes é representada pelos genes *c-ras*. As proteínas G compreendem um grupo de moléculas que fazem parte da cadeia de transdução de sinais intracelulares. São assim, proteínas de membrana capazes de transmitir sinais para outras proteínas celulares ou enzimas que catalisam a síntese de outros mensageiros. As proteínas G são ativadas pela ligação com a guanosina trifosfato (GTP) e sua atividade é controlada pela hidrólise do GTP. A reação de hidrólise é mediada por uma proteína celular chamada proteína ativadora de GTPase (GAP). Os produtos dos genes *c-ras* são proteínas semelhantes às proteínas G e têm a propriedade de ligação com o GTP. Todas as proteínas *ras* são encontradas na superfície interna da membrana plasmática, sugerindo que elas tenham ação de proteínas G.

5- Proto-oncogenes que dão origem a proteínas nucleares

Essa classe de proto-oncogenes é representada pelos genes *c-myc*, *c-myb* e *c-fos*. As proteínas nucleares em células normais aparentemente controlam a proliferação e a capacidade de auto-renovação da célula. Essa última propriedade ocorre quando a divisão celular resulta em duas células filhas idênticas à célula mãe e que mantêm sua capacidade de proliferação. A propriedade de auto-renovação em uma população de células precursoras é fundamental para a homeostase de qualquer tecido renovável. (Minden, 1987; Kastan *et al*, 1989; Rawn, 1989; McKenzie, 1991; Williams, 1990).

Compreende-se por ativação o mecanismo através do qual um proto-oncogene com função fisiológica passa a ter a capacidade de induzir tumores, recebendo a denominação de oncogene. Nos tumores humanos, os principais tipos de ativação podem ser classificados em mutação, amplificação gênica e rearranjo gênico:

1- Mutação: As mutações resultam em produto proteico alterado com conseqüente modificação de sua função normal. Esse tipo de evento é bem definido para os genes da família *ras*, tanto em leucemias como em carcinomas. Essas mutações alteram padrões críticos da estrutura normal da proteína *ras*, de modo que sua função é alterada. Outros exemplos de ativação de oncogenes por mutação é o caso do gene *c-myc* que ocorre em linfomas de células B e que podem modificar seqüências que regulam a transcrição.

2- Amplificação gênica: Resultam em amplificação do número de cópias do gene que pode incluir de 3 a mais de 100 cópias. Esses genes amplificados produzem níveis muito elevados da proteína correspondente. Um exemplo desse fato é o gene *N-myc* em neuroblastomas.

3- Rearranjo gênico: Em geral ocorre como resultado de um rearranjo cromossômico. O oncogene que sofre o rearranjo pode produzir um produto alterado ou uma quantidade aumentada de produtos. Exemplos dessas mudanças podem ser observados no rearranjo *bcr/c-abl* na leucemia mielóide crônica, onde o gene *c-abl* no cromossomo 9 é translocado para o cromossomo 22 dando origem ao cromossomo Philadelphia (Ph^1). Ocorre o mesmo com o gene *c-myc* no cromossomo

8, que é translocado tanto para o cromossomo 14, 2 ou 22 no linfoma de Burkitt (Minden, 1987; Kastan *et al*, 1989; Williams, 1990; Rosenberg & Krontiris, 1991)

Dessa forma, os proto-oncogenes compreendem um grupo de genes celulares envolvidos em todos os níveis de controle da divisão e diferenciação celular. Em cada um dos genes até o momento utilizados como exemplo, um evento somático resultou em uma mutação com característica genética de alelo dominante, fazendo com que esses genes permaneçam "ativados" e como consequência desencadeando divisão celular não controlada.

Entretanto, existem genes cujos produtos têm a função fisiológica de inibir o crescimento e diferenciação celular e podem demonstrar o padrão oposto aos oncogenes quando sofrem mutações ou rearranjos. Nesse caso, os genes são desativados e levam à perda do controle negativo do crescimento resultando em padrão desordenado de proliferação celular. Os genes que têm essa propriedade são conhecidos como genes supressores de tumores ou anti-oncogenes e os exemplos mais conhecidos são o P53 e o RB (retinoblastoma) (Rosenberg & Krontiris, 1991; Kaelin Jr., 1993).

As lesões nos proto-oncogenes e genes supressores de tumores parecem ter uma prevalência semelhante entre as neoplasias humanas. Aparentemente, no entanto, a maioria das neoplasias malignas poderiam ter origem pelos efeitos colaborativos de oncogenes ativados e mutações em genes supressores de tumores (Bishop, 1991). A proliferação neoplásica compreende uma série de eventos complexos, que provavelmente dependem de interações várias entre diferentes genes para ser concretizada. Em um dado clone de células tumorais, haveria uma série consecutiva de ativações de oncogenes e de mutações em anti-oncogenes, cada uma conferindo às células tumorais alguns dos fenótipos que em conjunto constituem o comportamento maligno como um todo. Este padrão é em geral denominado de hipótese de múltiplos eventos ("multistep") para indução de neoplasia. (Weinberg, 1984; Weiberg, 1989; Sugimura, 1992).

Vogelstein & Kinzler (1993) dão a esse mesmo processo a denominação de conceito dos múltiplos eventos ("multi-hit concept"), que basicamente poderia ser explicado pelo fato que cada mutação levaria a uma série de multiplicações celulares associadas ao aumento gradual no tamanho do tumor inicialmente benigno, desorganização e malignidade. Parecem ser requeridas de

três a seis mutações para completar o processo. Dessa maneira seria possível explicar porque a maioria das neoplasias ocorrem em pessoas mais idosas, uma vez que são necessárias décadas para um indivíduo acumular o número de mutações suficientes para causar a malignidade. Um exemplo representativo dessa hipótese encontra-se na figura 1.

A linhagem de leucemia promielocítica humana HL-60, fornece outro exemplo de célula tumoral na qual várias lesões separadas, mas potencialmente oncogênicas têm sido descritas: o gene *c-myc* é amplificado e super expresso, o gene *N-ras* apresenta substituição de uma base, o gene *P53* apresenta deleção gênica e o gene *neu/erb B2* está amplificado. Existem vários outros exemplos de linhagens celulares com no mínimo 2 oncogenes mutantes identificados. Também é comum o encontro de genes ativados em tumores ou linhagens celulares afetados por mais de uma lesão (Stamatoyannopoulos *et al*, 1987). Experimentos de transformação utilizando fibroblastos de embriões de camundongos mostraram que os oncogenes *ras* e *myc* separadamente não foram capazes de induzir a transformação celular total, enquanto que os dois oncogenes introduzidos simultaneamente atingiram esse resultado. Esses dados sugerem que cada oncogene seria especializado em induzir parte dos fenótipos requeridos para a transformação total. Entretanto, nem todos os oncogenes parecem seguir este mecanismo de passos múltiplos, pois existem dados que sugerem que um único oncogene seria capaz de induzir tumorigênese sob condições especiais (Weinberg, 1989).

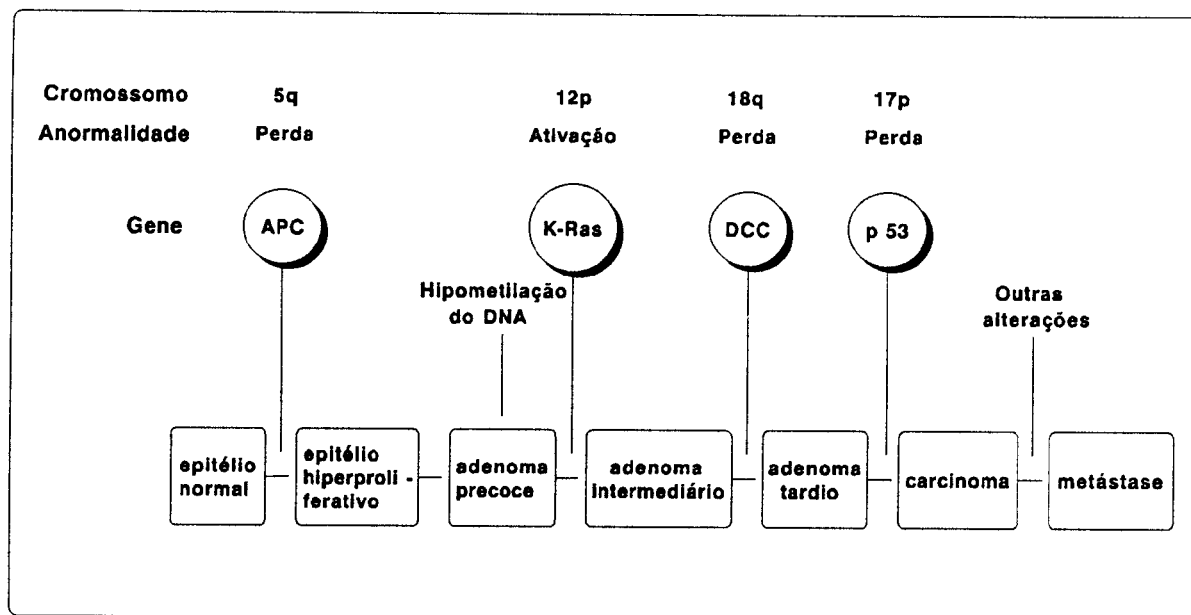


Figura 1: Representação das alterações gênicas nas neoplasias colo-retais, um exemplo do conceito dos múltiplos eventos ("multi-hit concept") (Vogelstein & Kinzler, 1993; Casartelli, 1993).

APC, DCC e p53 são genes supressores, onde:

APC = gene envolvido na "adenomatous polyposis coli" familiar

DCC = gene deletado no carcinoma de cólon

PROTO-ONCOGENE RAS

Os numerosos estudos visando estabelecer as bases moleculares das neoplasias mostram com frequência anormalidades nos membros de uma pequena família gênica conhecida como *ras*. Esta denominação é derivada das palavras "rat sarcoma" porque os genes foram identificados pela primeira vez como o princípio transformante das linhagens Harvey e Kirsten de vírus de sarcoma de rato (Harvey, 1964; Kirsten & Mayer, 1967). Os genes *ras* foram identificados em mamíferos, pássaros, insetos, moluscos, plantas, fungos e leveduras. A análise da sequência de nucleotídeos e dos produtos destes genes revelaram alto grau de conservação, o que indica fortemente um possível papel fundamental destes genes na proliferação celular (Barbacid, 1987; Toksoz *et al*, 1989; Grand & Owen, 1991).

GENES RAS DE MAMÍFEROS

Até o momento, três genes *ras* foram identificados no genoma de mamíferos, os genes *H-ras-1*, *K-ras-2* e *N-ras*. Além disso, dois pseudogenes, *H-ras-2* e *K-ras-1*, foram identificados e caracterizados em ratos e seres humanos e parecem existir na maioria, se não em todos os mamíferos (Hall & Brown, 1985; Barbacid, 1987). A localização destes três genes nos cromossomos humanos e em roedores também foi determinada. O *N-ras*, originalmente identificado em células originadas de neuroblastoma humano, encontra-se no braço curto do cromossomo 1, enquanto que o *H-ras-1* e *K-ras-2* estão localizados nos braços curtos dos cromossomos 11 e 12, respectivamente (Minden, 1987).

Os três genes funcionais codificam proteínas altamente relacionadas, genericamente conhecidas como p21 (21 Kd), as quais se ligam à guanosina trifosfato (GTP) e à guanosina difosfato (GDP) com elevada afinidade (Mckenzie, 1991; Haubruck & McCormick, 1991). As sequências codificadoras de cada um desses genes estão igualmente distribuídas em 4 exons exceto para o gene *K-ras-2*, o qual possui 2 alternativos quarto exons (exons IV A e IV B) que propiciam a síntese de duas proteínas p21 isomórficas de 188 e 189 resíduos e que diferem em

seus domínios carboxi-terminais. A estrutura dos introns nos diferentes genes é extremamente variável. Como consequência, os genes *ras* exibem estruturas genéticas distintas com tamanhos que variam de 4.5 Kb do H-*ras*-1 a 50 Kb do K-*ras*-2 (Barbacid, 1987).

PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

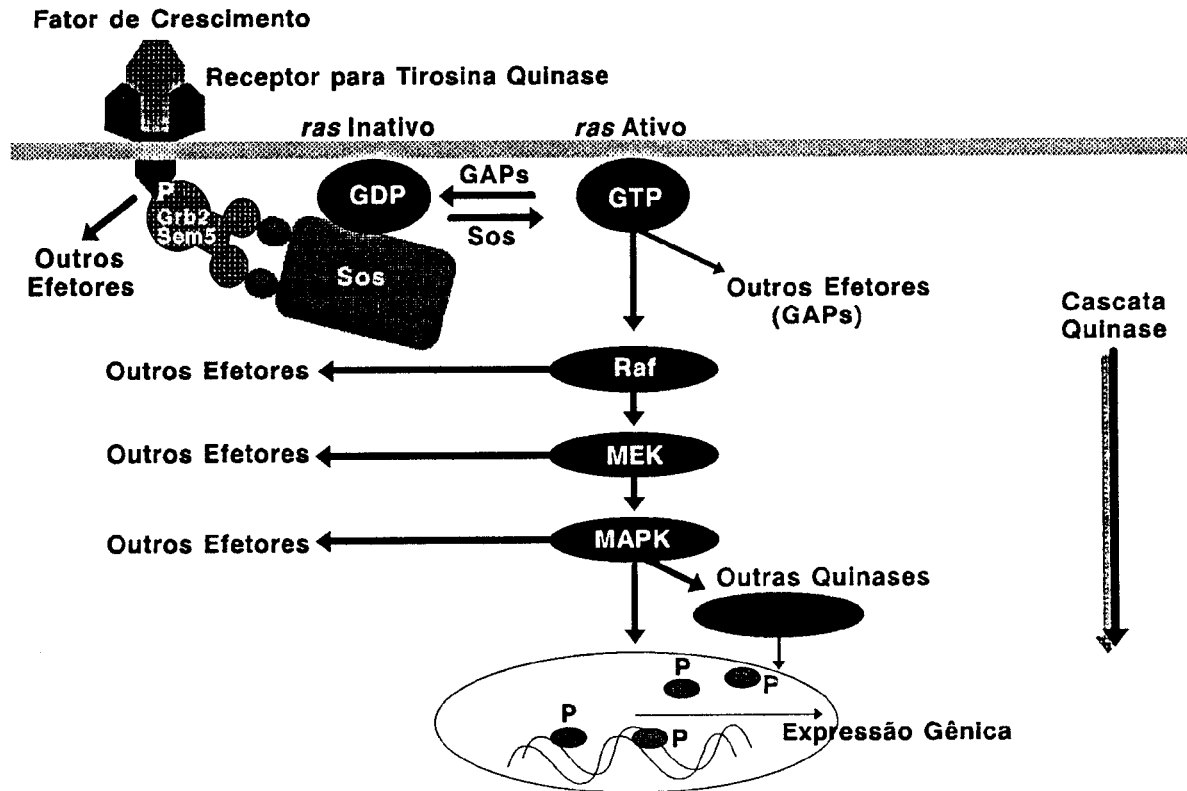
As proteínas codificadas pelos genes *ras*, independentemente de sua origem filogenética, são capazes de ligação com nucleotídeos de guanina GTP e GDP e possuem reduzida atividade intrínseca de GTPase. Além do mais, as proteínas *ras* exibem homologia significativa com a subunidade α das proteínas G, tais como a G_s , que ativa a adenilato ciclase em resposta a estímulos β adrenérgicos; G_i , que inibe essa enzima e parece ativar a fosfolipase C; G_o , com função ainda não determinada e transducina, uma proteína que regula a atividade fosfodiesterase do cGMP na transdução de sinais visuais (Barbacid, 1990).

A notável semelhança entre as proteínas *ras* e as proteínas G conduziu à proposição que as proteínas *ras* p21 poderiam estar envolvidas na transdução de sinais (Chang *et al*, 1991). Essas proteínas provavelmente existem em equilíbrio entre um estado ativo e um estado inativo. A maioria das moléculas produzidas pelos genes *ras* em uma célula estaria no estado inativo caracterizado por conformação que permite a ligação do GDP. As proteínas *ras* normais permaneceriam em seu estado inativo até receberem um estímulo de outra proteína, provavelmente um receptor de membrana. Esse estímulo resultaria na troca de GDP por GTP que consequentemente conduz a uma mudança conformacional para o estado ativo. A conformação do estado ativo da proteína *ras*-GTP permitiria a interação entre as moléculas efetoras para continuar a transdução de sinais. Uma vez ocorrida essa interação, as proteínas *ras* ligadas ao GTP seriam inativadas com o conseqüente retorno do complexo *ras*-GDP. (Barbacid, 1987; Trahey & McCormick, 1987; Rawn, 1989).

Esse modelo fornece as bases teóricas que explicariam porque mutações poderiam conferir propriedades transformantes aos genes *ras*. Estas mutações produziriam proteínas que poderiam reverter o equilíbrio normal entre as formas ativa e inativa. A estabilização das proteínas *ras* no

seu estado ativo causaria um fluxo contínuo de transdução de sinais, o qual resultaria na transformação maligna. Teoricamente, esse processo poderia ser alcançado por mutações que inibiriam a atividade de GTPase das proteínas *ras*, que aumentariam a taxa de troca entre GDP e GTP, ou induziriam mudança conformacional ativa, mesmo sem a ligação de nucleotídeos de guanina. Esse modelo também leva em consideração que os genes *ras* normais poderiam induzir a transformação maligna quando super-expressos. Níveis altos de proteínas *ras* normais poderiam produzir moléculas suficientes em seu estado ativo ligado a GTP para induzir transformação maligna sem afetar o equilíbrio entre as formas ativa e inativa características das proteínas *ras* normais (Barbacid, 1987) (figuras 2 e 3).

A atividade intrínseca de GTPase das proteínas p21 é fraca e consequentemente não seria propícia para o tipo de desativação rápida requerida durante a transdução de sinais. A conversão eficiente de GTP para GDP é feita pela interação das proteínas p21 com uma molécula de 120000 Da designada Gap (proteína ativadora de GTPase) (Trahey & McCormick, 1987; Toksoz *et al*, 1989; Barbacid, 1990). A GAP catalisa a conversão do complexo GTP-p21 para GDP-p21 pelo menos 50 vezes mais rápido do que a reação intrínseca p21/GTPase (Trahey & McCormick, 1987). A GAP também é capaz de ligação com as proteínas p21 mutadas, mas essa interação não é capaz de estimular a hidrólise de GTP. Como resultado, as proteínas mutantes oncogênicas permanecem permanentemente ligadas ao GTP sob condições fisiológicas. Um exemplo é a proteína mutante p21 leu-61 que é capaz de interagir com GTP com afinidade 50 vezes maior que a proteína normal (McCormick, 1990). As primeiras mutações nos oncogenes *ras* foram determinadas por transfecção de células da linhagem de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 com DNA obtido de células tumorais, seguidos de clonagem e sequenciamento do oncogene. Nas células transformadas, as mutações encontradas quase sem exceção foram localizadas nos codons 12, 13, e 61 dos genes *H-ras*, *K-ras* e *N-ras* (van Mansfeld & Bos, 1992). Estudos de mutagênese "in vitro" mostraram que mutações nos codons 63, 116, 119 e 146 também são capazes de conferir propriedades transformantes aos genes *ras*. Dentre todas essas mutações, as que ocorrem nos codons 12 e 61 são as mais freqüentes tanto em tumores humanos como em tumores animais



MEK: MAP quinase quinase

MAPK: quinase ativada por mitogênio

Sos: fator liberador de nucleotídeos de guanina

Figura 2: Atividade da proteína produzida pelo proto-oncogene *ras*, da superfície celular ao núcleo, onde os genes são ativados ou desativados em resposta ao sinal que entra na célula. O processo se inicia com a ligação de um fator de crescimento, como o fator de crescimento epidermal ao seu receptor de tirosina quinase, resultando na auto-fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor. Os controladores dos fatores de troca do *ras*, como Grb2/Sem5, entram em operação, recrutando fatores de troca (ou ativadores, por exemplo, Sos) para interagir com o gene *ras*. Os ativadores funcionam como agentes liberadores de nucleotídeos de guanina, convertendo *ras*-GDP, a forma inativa, para a forma ativa *ras*-GTP. Abaixo do *ras*, o alvo principal é a proteína Raf, também produto de um oncogene. Uma vez ativada, a Raf fosforila uma segunda quinase (MAP quinase quinase ou MEK). Após mediação por outras quinases, os sinais passam para o núcleo da célula através da fosforilação dos fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Outras rotas sinalizadoras que interagem com essa via não estão demonstradas (Egan & Weinberg, 1993).

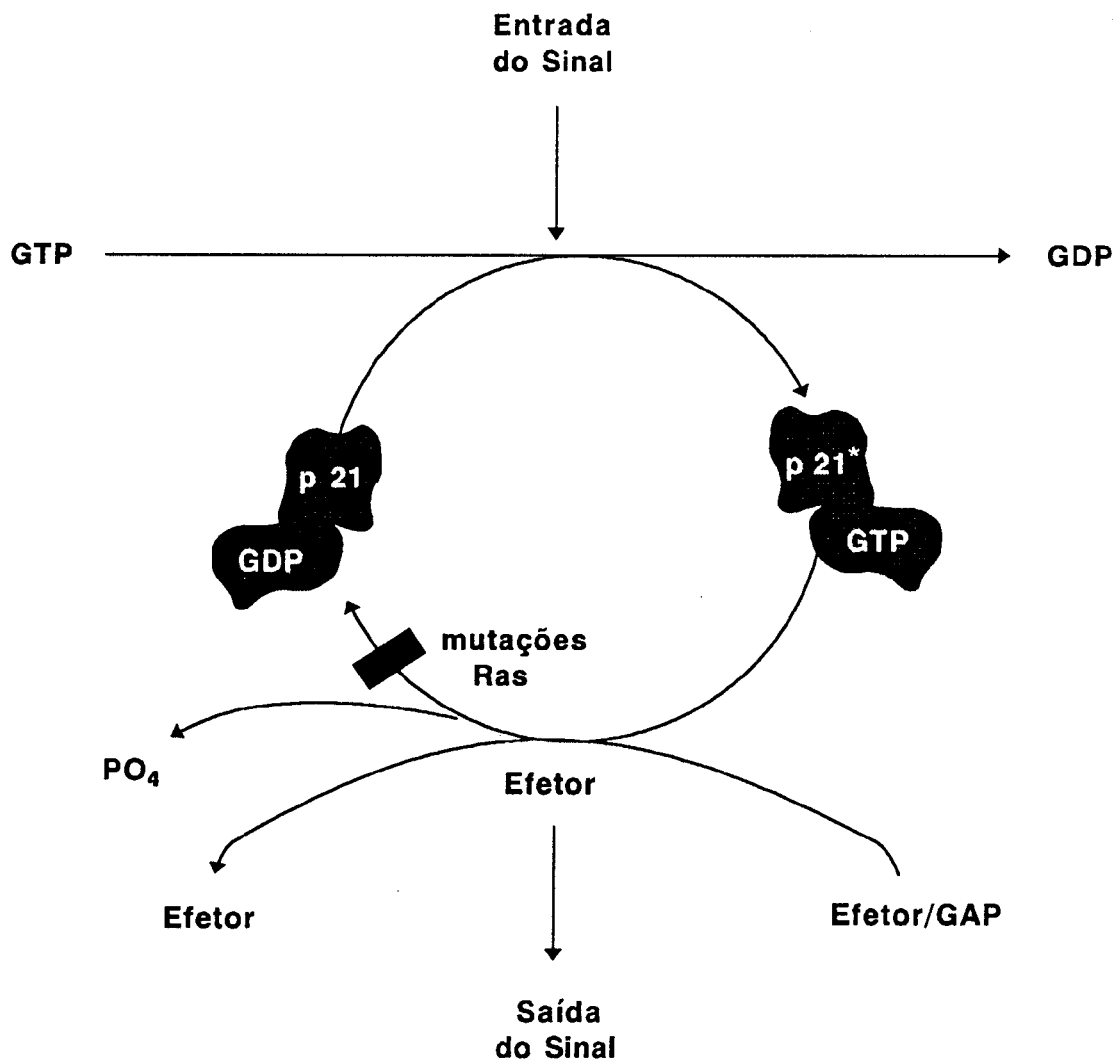


Figura 3: Função da proteína G *ras*. A proteína p21 produzida pelo gene *ras* é inativa quando ligada ao GDP. A entrada do sinal resulta na substituição de GDP por GTP e conseqüente ativação do produto do gene *ras*. A p21* interage com o efetor GAP para resultar na transdução distal do sinal. As mutações de ponto *ras* que levam ao fenótipo transformado geralmente reduzem a hidrólise do GTP, mantendo uma grande proporção das moléculas p21 celulares no estado ativo. Os componentes da transdução do sinal, tanto proximais como distais da p21, não foram ainda identificados (Rosenberg & Krontiris, 1991).

induzidos por carcinógenos. As proteínas dos genes *ras* normais contêm o aminoácido glicina na posição 12, um resíduo que parece ser necessário para a sua função fisiológica normal. A substituição da glicina por qualquer outro aminoácido com exceção da prolina, resulta na ativação oncogênica das moléculas *ras*. A análise de raio-X de proteínas p21 cristalizadas normais e transformantes, parece indicar que esse aminoácido é crítico para a interação da molécula p21 com o fosfato da molécula GTP, interação requerida para a atividade GTPase eficiente.

Assim, de acordo com essas previsões, os produtos dos oncogenes *ras* exibem tanto uma habilidade diminuída para hidrolisar GTP (mutações nos codons 12 e 61) como uma afinidade muito limitada para se ligar a nucleotídeos de guanina (mutações nos codons 116 e 119). Uma vez que as proteínas *ras* existem em um equilíbrio entre formas inativas (ligadas a GDP) e ativas (ligadas a GTP), as mutações que resultam em estabilização das proteínas *ras* em seu estado ativo causariam um fluxo contínuo de transdução de sinais o qual poderia resultar em transformação maligna (Barbacid, 1990).

OS ONCOGENES RAS E O INÍCIO DA NEOPLASIA

A maioria dos dados sobre o papel do proto-oncogene *ras* na patogênese das neoplasias humanas é derivada de estudos em modelos animais (Barbacid, 1987). Deste modo, a primeira indicação que a ativação do proto-oncogene *ras* estaria envolvida nos primeiros estágios da carcinogênese foi fornecida pela identificação de mutações em papilomas pré-malignos de pele em camundongos (Balmain & Pragnell, 1983). Vários experimentos em animais mostram que os proto-oncogenes *ras* podem ser ativados por substâncias químicas carcinogênicas, permanecendo latentes, sem induzir as manifestações fenotípicas da neoplasia. Provavelmente fatores adicionais antes do início da neoplasia devem interagir com os oncogenes *ras* ativados e assim desencadeariam o desenvolvimento da neoplasia (Kumar *et al*, 1990; Reynolds *et al*, 1990).

A partir desses dados foi possível formular a hipótese de que no homem os proto-oncogenes *ras* poderiam ser esporadicamente ativados durante a vida de indivíduos saudáveis, tanto por exposição a agentes carcinogênicos como por erros esporádicos durante a replicação

celular. Esses oncogenes permaneceriam latentes até que sob certas condições especiais (ex.: exposição a agentes tóxicos como cigarro, vírus, e outros) levariam ao desenvolvimento neoplásico (Kumar *et al*, 1990).

A utilização extensiva da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) simplificou muito o procedimento de análise de tumores para detecção de mutações de ponto. Além disso possibilitou que materiais arquivados, como esfregaços de sangue ou medula óssea ou blocos de tecidos incluídos em parafina pudessem ser utilizados como fonte de DNA para análise (van Mansfeld & Bos, 1992). Como consequência do emprego da PCR, numerosos grupos de investigadores foram capazes de detectar oncogenes *ras* ativados em câncer de estômago, pulmão, pâncreas, cabeça e pescoço, próstata, em leucemia mielóide aguda, câncer de mama e cólon (Bos, 1989; McKenzie, 1991). As freqüências mais elevadas foram observadas em adenocarcinomas do pâncreas, cólon e pulmão, em tumores da tireóide e em leucemia mielóide (tabela 1a).

Tabela 1a: Freqüência de mutações no oncogene *ras* em vários tipos de tumores.

Tipo de tumor	% de mutações	referência
adenocarcinoma do pâncreas	93	Smit <i>et al</i> , 1988
carcinoma de pulmão	17 - 30	Rodenhuis <i>et al</i> , 1988 Suzuki <i>et al</i> , 1990 Rodenhuis & Slebos, 1992
tumores da tireóide	15 - 20	Lemoine <i>et al</i> , 1988 Namba <i>et al</i> , 1990
câncer de cólon	40 - 50	Bos <i>et al</i> , 1987b Forrester <i>et al</i> , 1987 Vogelstein <i>et al</i> , 1988

Mutações do gene *K-ras* aparentemente predominam em tumores pancreáticos e parecem identificar um subgrupo de pacientes com pior prognóstico e menor tempo de sobrevida livre de doença. Deng *et al* (1991) sugerem que mutações do gene *H-ras* aparentemente se correlacionam com número de metástases e tempo de sobrevida em pacientes com câncer gástrico. Vários estudos são concordantes em apontar mutações no oncogene *ras* como um evento precoce no desenvolvimento de câncer de cólon (McKenzie, 1991).

Mutações no proto-oncogene *N-ras* foram detectadas com relativa frequência em algumas neoplasias hematológicas. Por razões ainda não completamente esclarecidas esse tipo de mutação parece ser a anormalidade mais comum na leucemia mielóide aguda (LMA). É possível que especificamente o proto-oncogene *N-ras* tenha um papel crítico no controle da proliferação e diferenciação das células hematopoéticas (Kastan *et al*, 1989).

A prevalência de mutações no proto-oncogene *ras* nas síndromes mielodisplásicas (MDS) é variável entre 6 e 40% dos casos estudados (Lyons *et al*, 1988; Padua *et al*, 1988; Bar-Eli *et al*, 1989; Yunis *et al*, 1989; Ahuja *et al*, 1990; van Kamp *et al*, 1992). Embora os dados não sejam conclusivos, aparentemente a presença da mutação está associada com menor sobrevida e probabilidade maior de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda (van Kamp *et al*, 1992; Paquette *et al*, 1993).

Nas leucemias mielóides agudas a frequência de mutações no proto-oncogene *N-ras* é variável entre 11 e 27% dos casos estudados. Em geral essas mutações são mais frequentemente observadas nos subtipos morfológicos M4 e M5, classificados segundo os critérios do grupo Franco-Britânico-Americano (FAB). No entanto, a importância dessa alteração como indicador de prognóstico e resposta à terapêutica não está ainda elucidada. Assim, nos poucos estudos em que essas variáveis foram consideradas, não foi possível observar diferenças significativas entre pacientes portadores da mutação e aqueles em que a mutação estava ausente (Bos *et al*, 1987a; Janssen *et al*, 1987; Browett & Norton, 1989; Radich *et al*, 1990; Farr *et al*, 1991; Chin *et al*, 1992; Taylor *et al*, 1992).

No entanto, Taylor *et al* (1992) correlacionaram a presença de mutações no proto-oncogene *ras* com a exposição a agentes químicos em pacientes portadores de LMA. Observaram

que pacientes portadores de LMA com mutações no proto-oncogene *ras* apresentavam frequências de exposição a agentes químicos significativamente maiores do que os pacientes com LMA e ausência de mutações.

Mutações no proto-oncogene *N-ras* são também bastante frequentes em portadores de leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (40 a 50%) (Padua *et al*, 1988; Hirsch-Ginsberg *et al*, 1990), mas, em contraste, são menos frequentes naqueles com leucemia mielóide crônica (LMC) (0-3%) (Janssen *et al*, 1987; Hirsch-Ginsberg *et al*, 1990; Ahuja *et al*, 1990).

Nas leucemias linfóides agudas (LLA) as frequências de mutações são em geral menores que aquelas descritas para LMA e variam de 6 a 18% (Rodenhuis *et al*, 1986; Neri *et al*, 1988; Browett & Norton, 1989; Ahuja *et al*, 1990; Lübbert *et al*, 1990). Em um desses estudos a presença de mutação foi claramente associada com pior prognóstico da doença (Lübbert *et al*, 1990).

OBJETIVOS

Tomados em seu conjunto, os dados da literatura não permitem concluir se a frequência de mutações no proto-oncogene *ras* nas leucemias mielóides agudas varia de acordo com a população estudada ou com os vários possíveis agentes etiológicos envolvidos. Além disso, não está ainda completamente esclarecida a correlação entre a existência de mutações e a evolução clínica ou a classificação morfológica das leucemias agudas. Importa, ainda, ressaltar que não existem estudos relativos à frequência de mutações no proto-oncogene *ras* em populações brasileiras.

Desse modo, os objetivos desse trabalho foram:

- 1- Estimar a frequência e os tipos de mutações no proto-oncogene *N-ras* em 53 pacientes portadores de leucemias agudas atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP.
- 2- Analisar, ainda que com as limitações existentes nesse tipo de estudo, a correlação entre a existência da mutação e a classificação morfológica das leucemias, a possível exposição a agentes tóxicos e a evolução clínica dos pacientes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 53 pacientes portadores de leucemias agudas (40 LMA e 13 LLA), escolhidos aleatoriamente, atendidos no ambulatório da disciplina de Hematologia da UNICAMP, no período de 30/11/89 a 08/09/92. O estudo compreendeu 28 homens e 25 mulheres, com idade variando entre 16 e 81 anos. Além disso, apenas como um exemplo ilustrativo de um caso com mutação no oncogene *N-ras* em uma condição diferente da leucemia aguda, foi estudado um paciente do sexo masculino, com 55 anos, portador de leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). O diagnóstico da leucemia aguda foi levado a efeito por meio das características clínicas e do estudo citológico e citoquímico da medula óssea realizado em esfregaços obtidos por aspiração medular e corados pelo Leishman e pelas seguintes reações citoquímicas: "Sudan Black" ou a peroxidase, ácido periódico Schiff e a alfa-naftil acetato esterase (Dacie & Lewis, 1984). Em casos recentes o diagnóstico foi feito por meio de imunofenotipagem (com a utilização dos anticorpos CD 2, CD 3, CD 5, CD 10, CD 13, CD 19, CD 33, CD 34, CD 41 e CD 42) realizada de acordo com os métodos descritos por Waller & MacLennan (1977). As características clínicas e hematológicas dos pacientes estudados encontram-se nas tabelas 5 e 6.

A classificação das leucemias agudas em LLA e LMA e a identificação de seus subtipos foi realizada segundo a proposta do grupo cooperativo FAB (Bennett *et al*, 1976; Bennett *et al*, 1985a; Bennett *et al*, 1985b).

Os critérios para remissão clínica e hematológica utilizados nesse estudo foram aqueles classicamente adotados na literatura com ligeiras modificações (Lister *et al*, 1987).

Basicamente os critérios para a remissão hematológica foram:

1. Sangue periférico com dosagem de hemoglobina (Hb) maior que 10g/100ml, número de granulócitos maior que $1,5 \times 10^9/L$, número de plaquetas maior que $100 \times 10^9/L$ e ausência de blastos.
2. Mielograma com medula normocelular, e percentagem de células blásticas (sem características neoplásicas) menor que 5%.

O critério básico de recidiva hematológica foi a percentagem de células blásticas com características morfológicas sugestivas de células neoplásicas superior a 5% no exame citológico

da medula óssea, ou alternativamente, a invasão de órgãos não hematopoéticos por células leucêmicas (Cheson *et al*, 1990).

Os pacientes com LMA e idade menor que 60 anos foram tratados segundo um esquema quimioterápico modificado do protocolo do grupo cooperativo alemão LMA (Büchner *et al*, 1991). Os pacientes com idade igual ou maior que 60 anos foram tratados com Ara C em baixas doses para a indução da remissão de acordo com a descrição de Wahlin *et al* (1991). A terapêutica quimioterápica para os pacientes com LLA foi realizada segundo a descrição de Hoelzer *et al* (1984). Estes protocolos encontram-se descritos pormenorizadamente no Anexo 1.

Para os cálculos da sobrevida global e da sobrevida livre da doença foram consideradas como data do diagnóstico, da remissão e da recaída os dias de coleta do mielograma. A data do óbito foi considerada como aquela do atestado de óbito ou a obtida por informação verbal dos familiares.

Apesar da reconhecida limitação dos métodos de análise a respeito da exposição dos pacientes a possíveis agentes tóxicos, neste trabalho foram avaliados os possíveis fatores de risco ocupacional descritos previamente como provavelmente associados ao aparecimento de leucemias (tabela 1b) (Sandler & Collman, 1987; Taylor *et al*, 1992). Os dados foram obtidos pela análise do prontuário médico, por entrevista com o paciente por um dos pesquisadores diretamente envolvidos no contato com o paciente e por entrevistas com a família por telefone. Não foi possível a obtenção de dados confiáveis em 10 pacientes, que foram portanto, excluídos dessa análise.

Tabela 1b: Ocupações de risco, como sugerido por Taylor e colaboradores, 1992.

Mecânicos de automóveis
Trabalhadores em indústrias automobilísticas
Cabeleireiros, barbeiros ou cosmetologistas
Técnicos em laboratórios de biologia
Trabalhadores em indústrias químicas
Trabalhadores em indústrias de corantes
Eletricistas
Trabalhadores em indústrias de aparelhos eletrônicos
Fazendeiros
Embalsamadores
Carpinteiros
Atendentes de postos de gasolina
Jardineiros
Trabalhadores em indústrias de couro/sapatos
Trabalhadores em indústrias de munições/explosivos
Trabalhadores em indústrias nucleares
Enfermeiras
Outros profissionais da área da saúde que cuidam de pacientes
Pintores
Aplicadores de pesticidas
Trabalhadores em indústrias de petróleo
Farmacêuticos
Trabalhadores em indústrias de plásticos
Trabalhadores em gráficas
Trabalhadores em indústrias de borracha
Trabalhadores em indústrias têxteis
Motoristas de caminhões, ônibus ou táxi
Técnicos de raio-X

Neste trabalho a detecção de mutações no proto-oncogene *N-ras* foi levada a efeito pela hibridização alelo-específica após amplificação deste gene pela PCR e fixação do DNA em filtros de nylon pela técnica de "dot blot".

Extração de DNA a partir de leucócitos

A extração de DNA genômico de leucócitos foi feita a partir de 20 ml de sangue periférico, colhidos em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma 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). Após o repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, o hemolisado foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos lisado em solução de NaCl 0,3M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 4,2 g de uréia, 1ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, por 16 horas a 37°C.

Foi adicionada uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (volume/volume). A amostra foi agitada lentamente e a seguir centrifugada por 20 minutos a 2500 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento acima. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi então adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação.

Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido nucleico foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (três vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada, estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica em comprimento de onda = 260nm (Sambrook *et al*, 1989).

Extração de DNA de lâminas

Utilizou-se para a extração de DNA, preparações citológicas de sangue periférico ou medula óssea, modificando-se um método através do qual extrai-se DNA de células ou tecidos previamente fixados (Jeanpierre, 1987). O DNA foi isolado de material de arquivo, usando esfregaços corados ou não corados pelo corante de Leishman e estocados por um período que variou de um mês até mais de um ano à temperatura ambiente. Usualmente, 1 ou 2 lâminas foram raspadas em um tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml, usando lâmina de bisturi também estéril. O material raspado foi ressuspensão em 400 µl de hidrocloreto de guanidina 6 M, 30 µl de sarcosil 20%, 30 µl de acetato de amônio 7.5 M e 10 µl de proteinase K (10 mg/ml). A mistura foi incubada por 1 hora a 60°C e 1 ml de etanol absoluto gelado foi adicionado. Após lenta homogeneização, a mistura ficou a -20°C por uma noite e então foi centrifugada por 20 minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuspensão em 50 µl de água (Melo *et al*, 1992).

Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki e colaboradores (1988), com algumas modificações. Os fragmentos do gene amplificado têm aproximadamente 118 pares de bases, e incluem os codons 12, 13 e 61. Os dois pares de "primers" utilizados foram provenientes da Clontech (Palo Alto, Califórnia - EUA) (Padua *et al*, 1988) e estão descritos a seguir:

5' N-ras/codons 12,13	ATG ACT GAG TAC AAA CGT GT
3' N-ras/codons 12,13	CTC TAT GGT GGG ATC ATA TT
5' N-ras/codon 61	CAA GTG GTT ATA GAT GGT GA
3' N-ras/codon 61	AGG AAG CCT TCG CCT GTC CT

A mistura de reação consistiu de 100 µl, contendo 100 pM de cada iniciador ("primer"), 200 µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (10mM Tris-HCl pH 8.3, 0,01% gelatina, 50 mM KCl e 1.5 mM MgCl₂) e 2.5 unidades de Taq polimerase. A quantidade de DNA empregada em cada reação de PCR foi de 0.5 µg. As reações de PCR foram efetuadas em aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer-Cetus) segundo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 4% ou em gel de poliacrilamida 7%, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultra-violeta.

Fixação do DNA em filtros de "nylon" como "Dot Blot"

Foram utilizados 30 µl da reação de PCR para cada "Dot Blot", acrescidos de 170 µl de solução de NaOH 0.4 N, EDTA 25 mM. Após homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, aquecida a 95°C por 2 minutos e colocada em gelo até sua aplicação. O DNA foi imobilizado em membranas de nylon no sistema "Dot Blot" (Aparato Bio-Dot - Biorad) e fixado em estufa a vácuo por 2 horas a 80°C. Cada membrana foi feita em duplicata (Sambrook *et al*, 1989; Costa *et al*, 1992).

Fixação do DNA por meio de "Southern Blot"

Após eletroforese em gel de agarose a 2%, o material foi transferido para filtros de "nylon" pelo método de transferência alcalina (Sambrook *et al*, 1989), com tampão NaOH 0.5 N e NaCl 1.5 N.

A transferência foi feita pelo método "seco", isto é, sobre o gel foi colocado o filtro de "nylon", papel de filtro e papel toalha. O único tampão utilizado foi aquele contido no próprio gel. O tempo de duração da transferência foi ao redor de 12 horas, o que resultava em transferência total do DNA da agarose para o filtro. Após a transferência a membrana foi neutralizada por 2 minutos em tampão 0.45 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5. Após secagem, o DNA foi fixado pelo aquecimento a 80°C por 2 horas (Costa *et al*, 1991).

Hibridização

A hibridização foi realizada utilizando-se sondas alelo-específicas para as mutações previamente descritas nos codons 12, 13 e 61 do oncogene N-*ras* (Tabelas 2, 3 e 4, onde Tm(°C) significa temperatura de "melting" e Tl significa temperatura de lavagem) (Costa *et al*, 1992). Os oligonucleotídeos utilizados como sonda para todas as mutações e para a sequência normal são provenientes da Clontech (Palo Alto, Califórnia - EUA) (Lyons *et al*, 1988).

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas na hibridização alelo-específica para o codon 12.

	sequência	Tm(°C)	Tl(°C)
1	GGA GCA <i>GGT</i> GGT GTT GGG AA (gly) normal	64	66
2	GGA GCA <i>AGT</i> GGT GTT GGG AA (ser) mutante	62	64
3	GGA GCA <i>TGT</i> GGT GTT GGG AA (cys) mutante	62	64
4	GGA GCA <i>CGT</i> GGT GTT GGG AA (arg) mutante	64	66
5	GGA GCA <i>GAT</i> GGT GTT GGG AA (asp) mutante	62	64
6	GGA GCA <i>GCT</i> GGT GTT GGG AA (ala) mutante	64	66
7	GGA GCA <i>GTT</i> GGT GTT GGG AA (val) mutante	62	64

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas na hibridização alelo-específica para o codon 13.

	sequência	T _m (°C)	T _i (°C)
1	GGA GCA GGT <i>GGT</i> GTT GGG AA (gly) normal	64	66
2	GGA GCA GGT <i>AGT</i> GTT GGG AA (ser) mutante	62	64
3	GGA GCA GGT <i>TGT</i> GTT GGG AA (cys) mutante	62	64
4	GGA GCA GGT <i>CGT</i> GTT GGG AA (arg) mutante	64	66
5	GGA GCA GGT <i>GAT</i> GTT GGG AA (asp) mutante	62	64
6	GGA GCA GGT <i>GCT</i> GTT GGG AA (ala) mutante	64	66
7	GGA GCA GGT <i>GTT</i> GTT GGG AA (val) mutante	62	64

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas na hibridização alelo-específica para o codon 61.

	sequência	T _m (°C)	T _i (°C)
1	ACA GCT GGA <i>CAA</i> GAA GAG TA (gln) normal	58	60
2	ACA GCT GGA <i>GAA</i> GAA GAG TA (glu) mutante	58	60
3	ACA GCT GGA <i>AAA</i> GAA GAG TA (lys) mutante	56	58
4	ACA GCT GGA <i>CGA</i> GAA GAG TA (arg) mutante	60	62
5	ACA GCT GGA <i>CTA</i> GAA GAG TA (leu) mutante	58	60
6	ACA GCT GGA <i>CCA</i> GAA GAG TA (pro) mutante	60	62
7	ACA GCT GGA <i>CAT</i> GAA GAG TA (his 1) mutante	58	60
8	ACA GCT GGA <i>CAC</i> GAA GAG TA (his 2) mutante	60	62

Marcação das sondas com isótopos radioativos

A reação de marcação dos oligonucleotídeos foi realizada em solução contendo 10 pmoles da sonda, 5 unidades de T4 polinucleotídeo quinase (USB), 8 µl de [γ - 32 P] ATP Amershan 5000 Ci/mmol; 10 µCi/µl), em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.6; MgCl₂ 10 mM; DTT 0.5 mM; espermidina 0.1 mM, EDTA 0.1 mM, com volume final de 50 µl (modificado de Sambrook *et al*, 1989). A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, parando-se a reação com 100 µl de TNE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, EDTA 1mM (pH 8,0). Foi feita 1 extração (volume:volume) com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e 1 extração (volume:volume) com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após purificação em coluna de Sephadex G50, a eficiência da marcação foi avaliada pela leitura da radioatividade em solução obtida pela diluição de 1 µl de sonda em 3000 µl de líquido de cintilação (contador de cintilação líquida LS 5000 TA-Beckman) (Sambrook *et al*, 1989).

Pré-hibridização

Os procedimentos para os filtros obtidos por "Dot Blot" ou "Southern Blot" foram idênticos.

Os filtros foram colocados no interior de recipientes plásticos flexíveis, com 10 ml de tampão de hibridização (concentração final: 5X SSPE*, 5X Denhardt's** e SDS 0.5%) e incubados por 2 horas a 48°C.

*SSPE 20X: 175,3g NaCl, 27,6g NaH₂PO₄.H₂O, 7,4g EDTA, água q.s.p. 1000ml.

**Denhardt's 50X: 5g Ficoll, 5g polivinilpirrolidone, 5g BSA (bovine serum albumine), água q.s.p. 500 ml.

Hibridização

Após a pré-hibridização, as sondas previamente marcadas foram adicionadas aos recipientes plásticos na razão de 5.0×10^6 cpm/ml de tampão e incubadas por mais 3 horas à temperatura de 48°C.

Lavagens

Foram realizadas 2 lavagens à temperatura ambiente por 5 e 15 minutos respectivamente, em solução 2X SSPE, 0.1% SDS. A temperatura da terceira lavagem foi igual a $T_m + 2$ (T_m = temperatura de "melting") (tabelas 2, 3 e 4) e a solução utilizada foi 5X SSPE, 0.1% SDS.

$$T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2.$$

Após a hibridização os filtros foram secos e expostos em filme de raio X durante a noite, com o uso de intensificador a -70°C ou à temperatura ambiente sem o uso de intensificador.

Sequenciamento direto do fragmento amplificado:

O sequenciamento foi realizado utilizando dsDNA Cycle Sequencing System (BRL) e CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit (Sonati *et al*, 1993). Os procedimentos são semelhantes e estão descritos a seguir:

Purificação do DNA:

Aproximadamente 200 fmol de DNA, produto de amplificação por PCR, diluído em água de forma a atingir o volume de 20µl, receberam 20µl de acetato de amônio 4M e 160µl de isopropanol. A mistura foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e a seguir foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi então lavado com etanol 70% e ressuspenso em 20µl de água destilada.

Marcação do iniciador ("primer"):

Os mesmos "primers" utilizados na amplificação foram marcados radioativamente em reações de 5µl, contendo 60mM Tris-HCl (pH 7,8); 10mM MgCl₂; 0,2mM KCl; 1pmol de "primer"; 2pmol de [γ -³²P] ATP 5000 Ci/mmol - 10mCi/ml; 1U T4 polinucleotídeo kinase, incubados por 30 minutos a 37°C, seguidos por 5 minutos a 55°C e então dispostos em gelo.

Reação:

Aos 5µl de "primer" marcado foram adicionados 37,5mM Tris-HCl (pH 9,0); 6,25mM MgCl₂; 37,5mM KCl; 50fmol de DNA; 2,5u Taq DNA polimerase, para um volume final de 36µl. Aliquotas de 8µl dessa mistura foram adicionadas a 4 tubos diferentes: o primeiro contendo 2mM de ddATP e 50µM de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP e dTTP, o segundo 1mM de ddCTP e 50 µM de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP, o terceiro 0,2mM ddGTP e 50µM de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP e o quarto tubo 2mM de ddTTP e 50µM de cada dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, e dTTP. A seguir, essas misturas foram submetidas a 20 ciclos de 30 segundos (s) a 95°C, 30s a 55°C, 60s a 70°C e 10 ciclos de 30s a 95°C e 60s a 70°C. As reações foram interrompidas com 5µl de solução contendo formamida 95%, 10mM de EDTA pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno-cianol, e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, tampão (Tris-borato, pH 8,3 90mM, EDTA 4mM) e uréia 7M, em placas de 40x30cm e 0,4mm de espessura (aparato GIBCO-BRL), por 1 hora a 1500 volts (fonte Bio Rad 3000Xi). O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo usado na preparação do gel. A autorradiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raio X, sem intensificador, por 16 horas.

Análise Estatística

Dentre os 40 pacientes com LMA, as seguintes variáveis foram comparadas com relação à presença ou ausência de mutações no oncogene *N-ras*: idade, sexo, raça, exposição a substâncias tóxicas, obtenção de remissão, sobrevida global (SG) e sobrevida livre da doença (SLD).

Para a comparação entre a presença ou ausência de mutações e a variável contínua idade foi utilizado o teste de Wilcoxon (Mann-Whitney) (Wilcoxon, 1945; Mann & Whitney, 1947), comparando suas medianas. Para a comparação das variáveis categóricas (sexo, raça, exposição a substâncias tóxicas e resposta à terapêutica de indução da remissão) foi utilizado o teste exato de Fisher (Fisher, 1934). Os cálculos foram feitos utilizando o "software" SAS (Statistical Analysis System).

Para a comparação entre a presença ou ausência de mutações e as variáveis contínuas sobrevida global (SG) e sobrevida livre da doença (SLD) foi utilizado o teste de Wilcoxon generalizado (Gehan, 1965a; Gehan 1965b). Para estimar as curvas da SG e SLD foi utilizado o método de Kaplan-Meier, (Kaplan & Meier, 1958), que é apropriado para amostras pequenas com censuras observadas progressivamente, com a utilização do "software" STATA.

RESULTADOS

Extração de DNA

O DNA foi purificado a partir de amostras do sangue periférico ou medula óssea em 46 pacientes. Nos pacientes restantes (8) a extração de DNA foi levada a efeito a partir de material obtido de esfregaços de lâminas de arquivo de mielogramas realizados em períodos de tempo variáveis de um a dois anos antes do início do estudo (pacientes números 1, 8, 9, 10, 11, 14, 33 e 48 - tabelas 5 e 6).

As amplificações dos fragmentos de DNA foram comparáveis nos dois tipos de métodos de extração empregados (Figura 4).

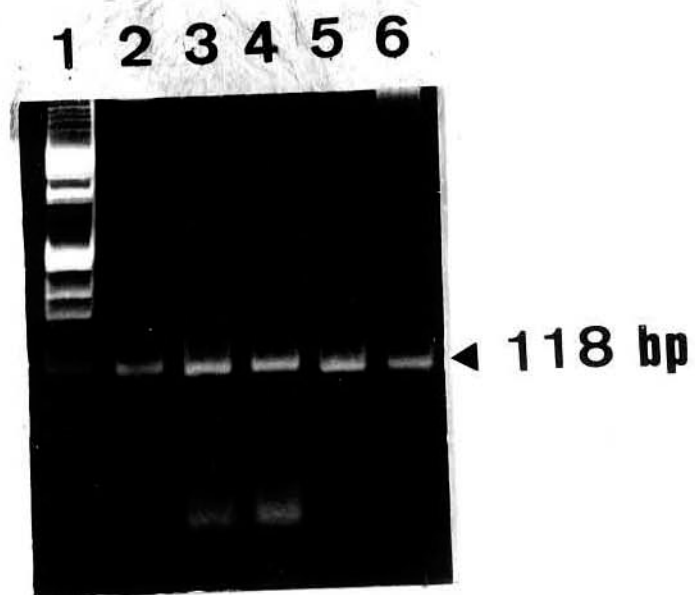


Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% da amplificação do oncogene N-Ras por PCR. Posição 1: Φ X 174 Hae III; posições 2 a 4: DNA extraído de lâminas de medula óssea; posições 5 e 6: DNA extraído de leucócitos de sangue periférico ou aspirado de medula óssea com fenol/clorofórmio.

Hibridização alelo-específica ("dot blot")

As amostras utilizadas nesse trabalho foram constituídas sempre por grande percentagem de células blásticas (30-100%). Nos casos com mutação os resultados foram inequívocos e o sinal positivo com a sonda mutante foi sempre comparável em intensidade ao sinal obtido com a sonda normal. As figuras 5 a 13 mostram todas as mutações detectadas.

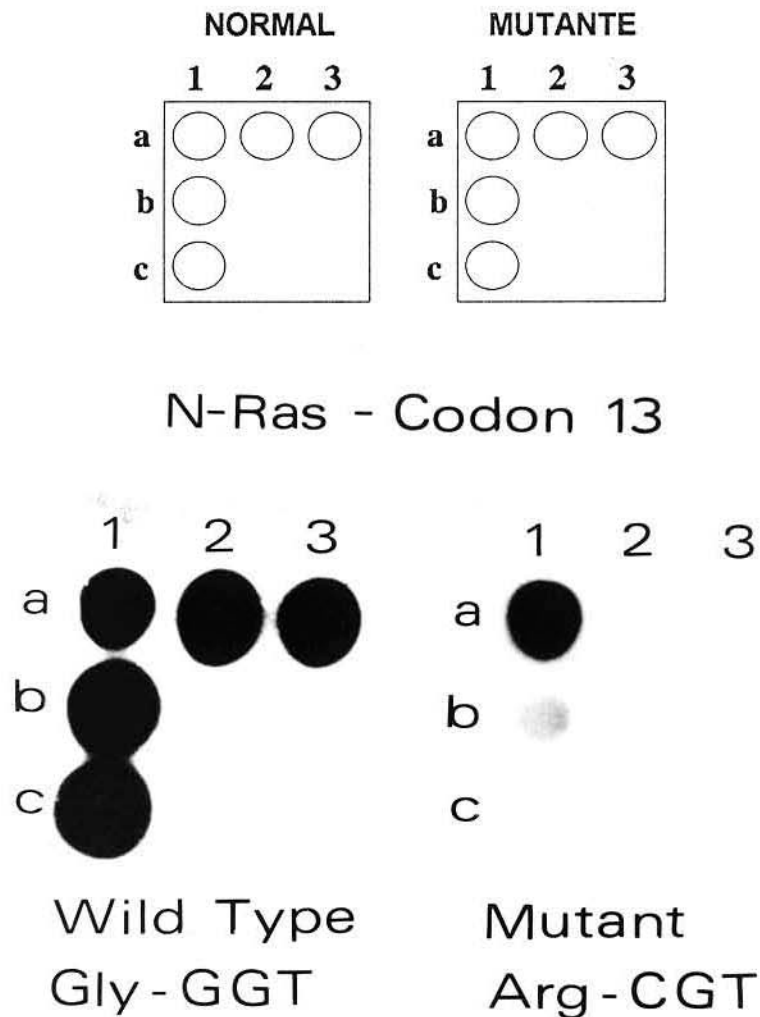


Figura 5: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 4 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Arg) no codon 13: 3a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. Nas posições 1b e 1c mutantes observa-se apenas radiação de fundo quando comparadas à radioatividade nas posições 1b e 1c normais. A única amostra positiva é a 1a (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

Observação: O esquema na parte superior da figura representa os locais de aplicação das amostras em duplicata nos dois filtros analisados.

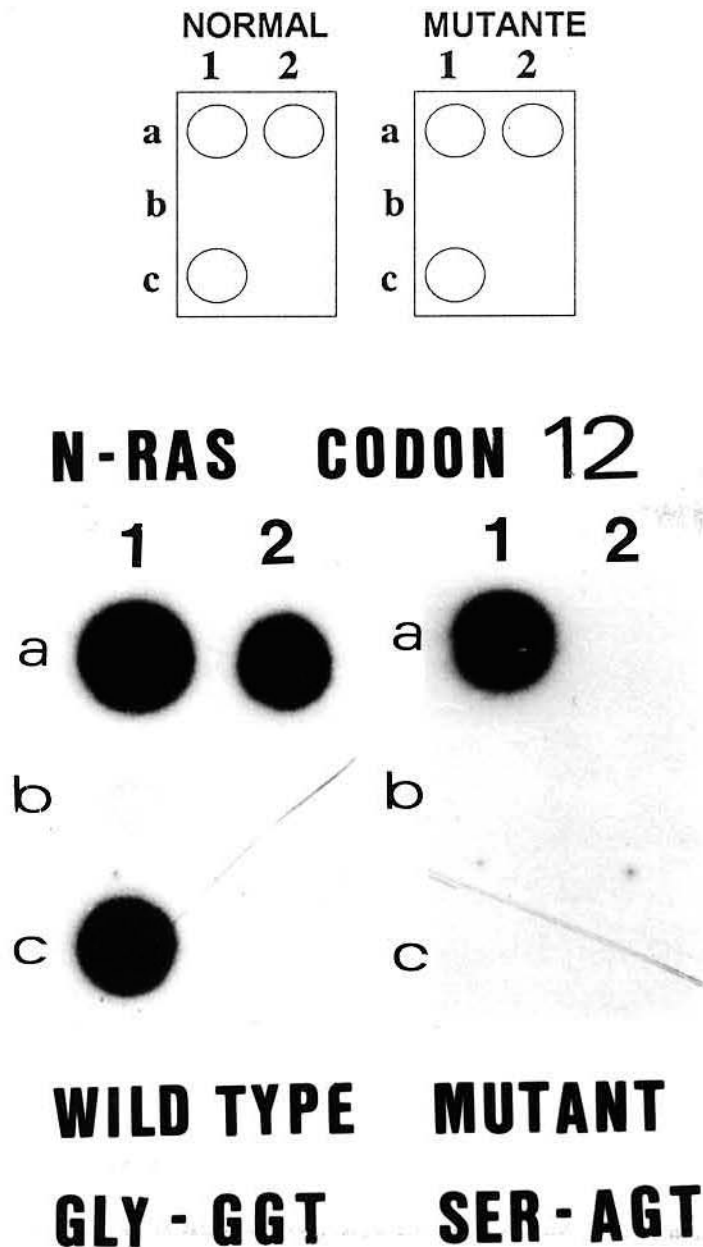


Figura 6: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 2 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Ser) no codon 12: 2a-controle normal; 1a e 1c pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. A única amostra positiva é a 1a (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

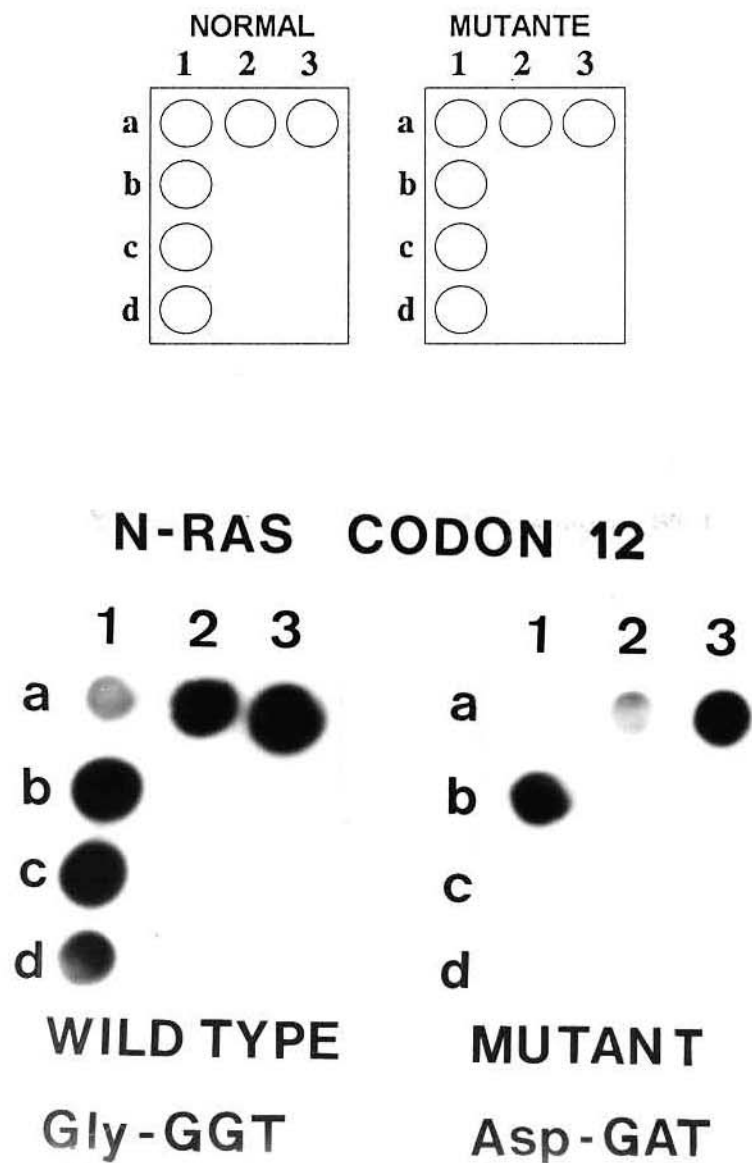


Figura 7: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 5 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Asp) no codon 12: 1d-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. Na posição 2a mutante observa-se apenas radiação de fundo quando comparada à radioatividade na posição 2a normal. As únicas amostras positivas são 1b e 3a (observar intensidades comparáveis de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

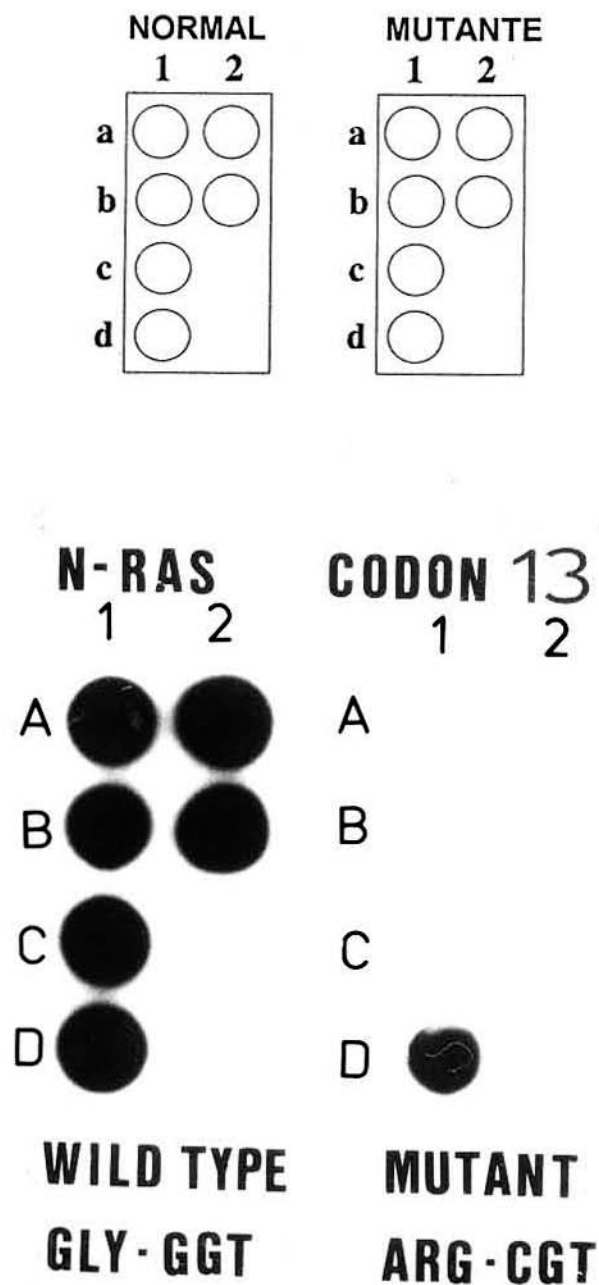


Figura 8: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 5 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Arg) no codon 13: 1b-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. A única amostra positiva é a 1d (observar intensidades comparáveis de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

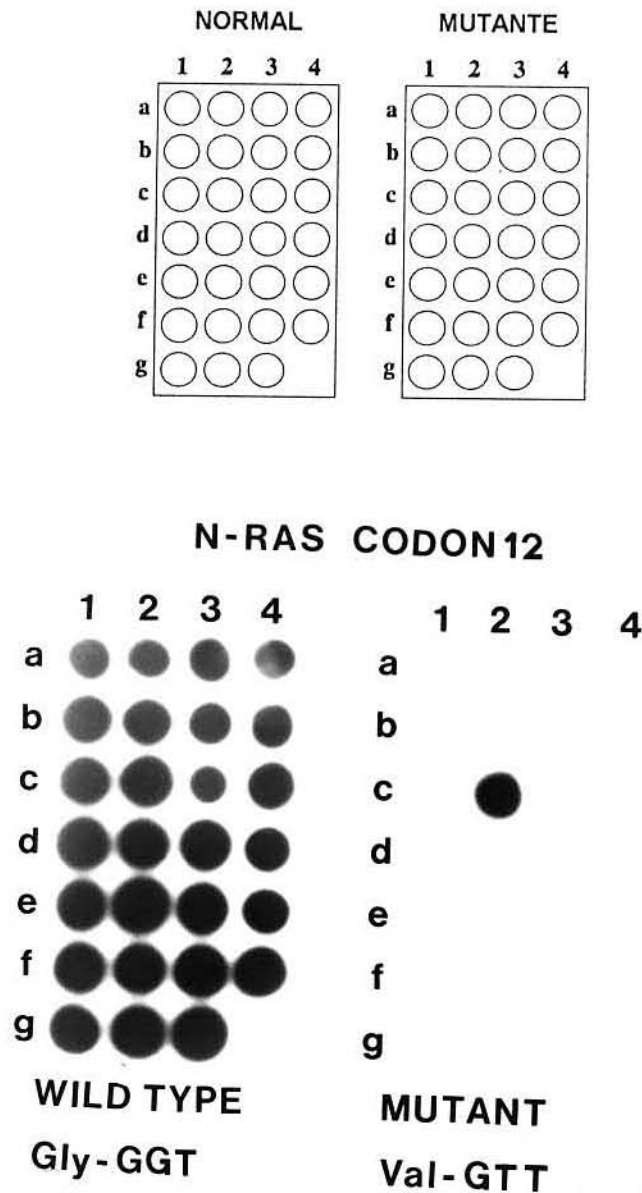


Figura 9: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 26 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Val) no codon 12: 1a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. A única amostra positiva é a 2c (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

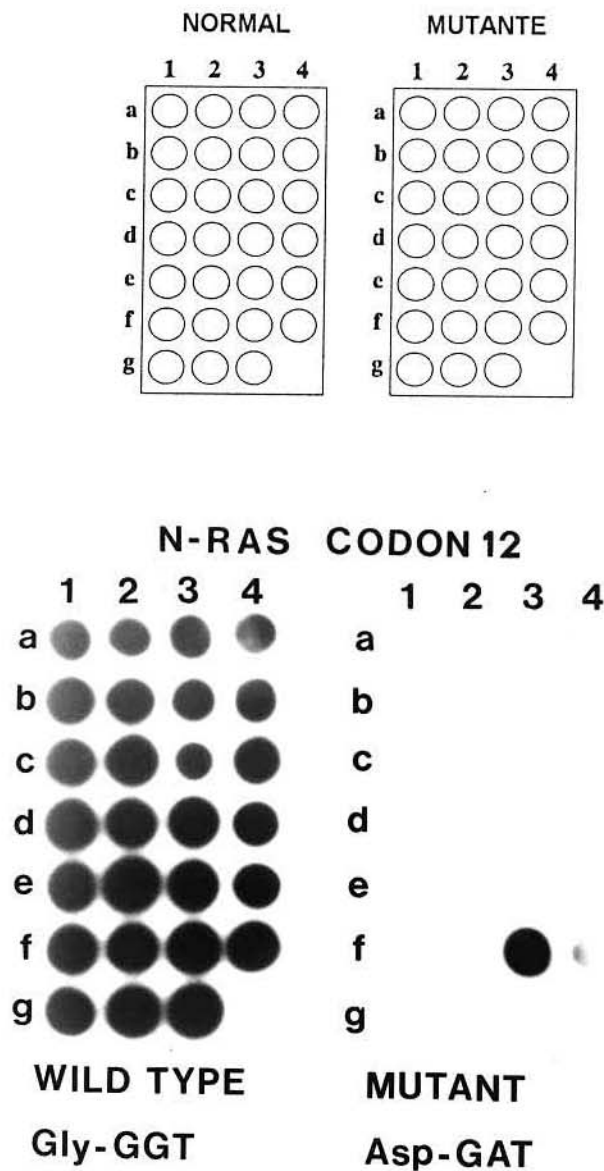


Figura 10: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 26 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Asp) no codon 12: 1a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle apenas com a sonda normal. Na posição 4f mutante observa-se apenas radiação de fundo quando comparada à radioatividade na posição 4f normal. A única amostra positiva é a 3f (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

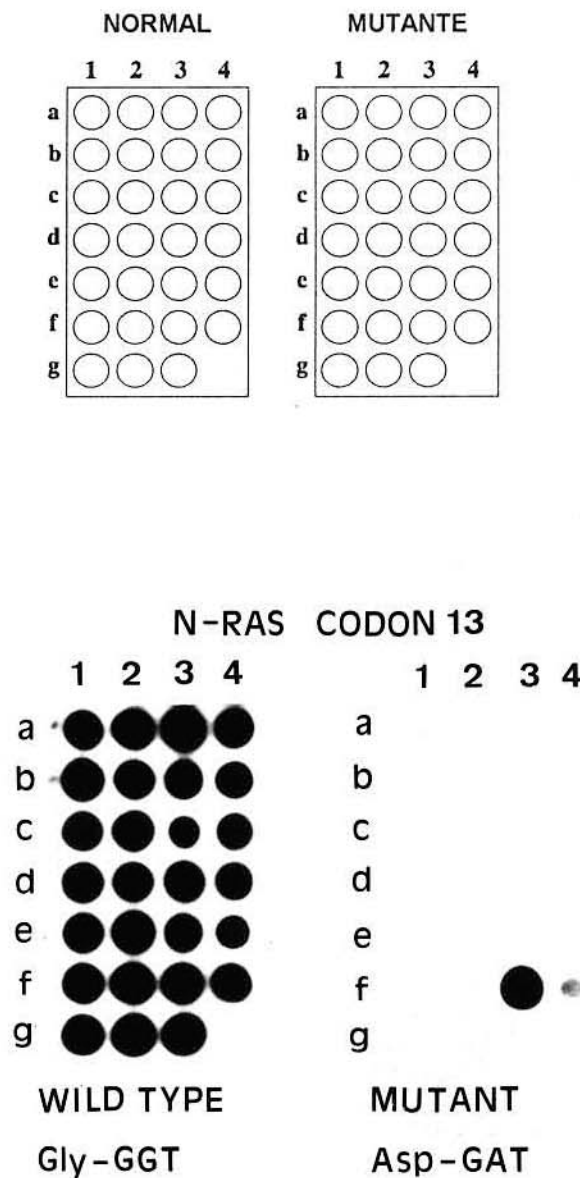


Figura 11: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 26 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codons 12/13), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sonda de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gly) e mutante (Asp) no codon 13: 1a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. Na posição 4f mutante observa-se apenas radiação de fundo quando comparada à radioatividade na posição 4f normal. A única amostra positiva é a 3f (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

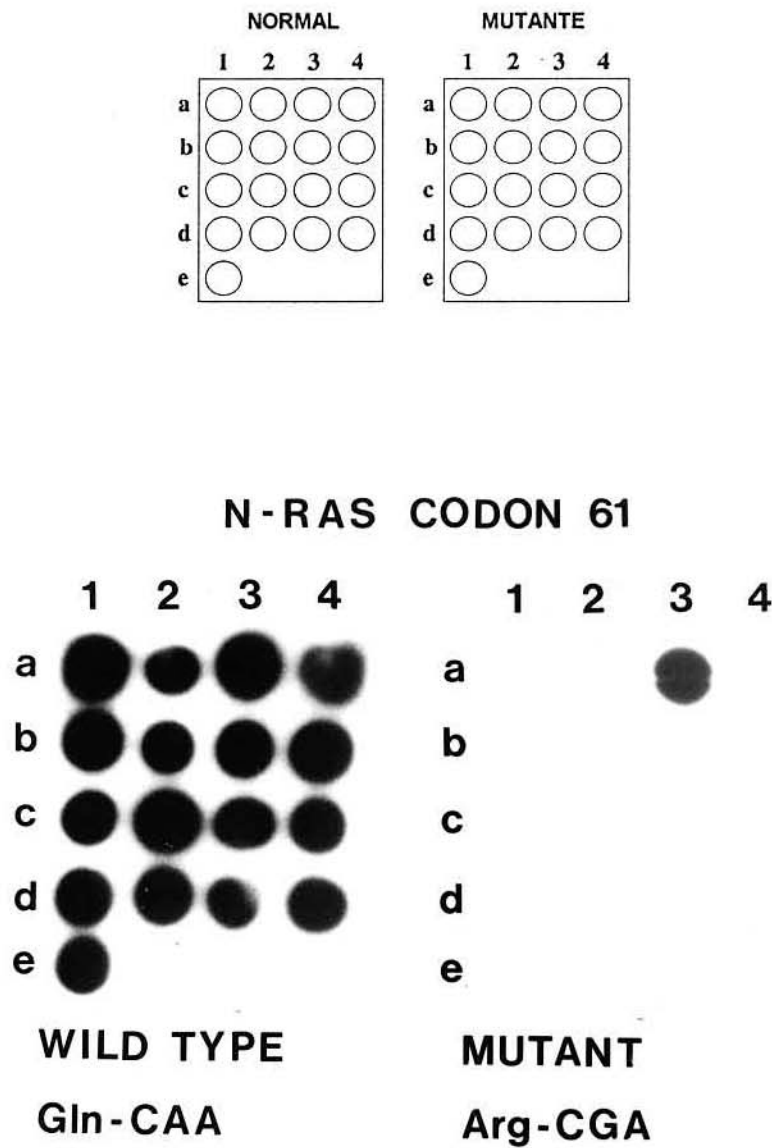


Figura 12: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 16 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codon 61), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (Arg): 1a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. A única amostra positiva é a 3a (observar a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

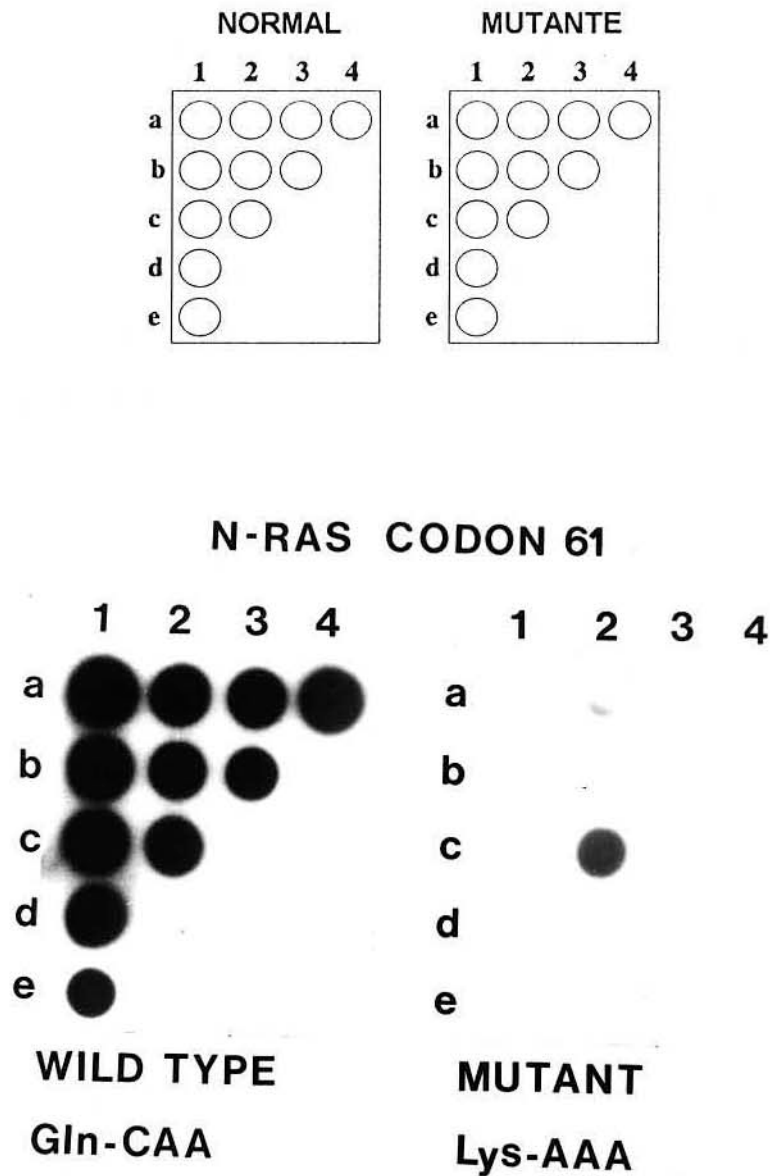


Figura 13: Hibridização alelo-específica. DNA genômico de indivíduo controle normal e de 10 pacientes foram amplificados por PCR, utilizando os "primers" para o oncogene N-Ras (codon 61), fixados em filtros de nylon por "dot blot" e hibridizados com sondas de seqüências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (Lys): 1a-controle normal; as demais amostras são de pacientes. Observar que a reação é positiva no controle somente com a sonda normal. A única amostra positiva é a 2c (observar intensidades comparáveis de radioatividade nas posições hibridizadas com sondas normal e mutante).

Hibridização após eletroforese em agarose e transferência para filtros de nylon ("Southern Blot")

Esse tipo de hibridização foi realizada para confirmar os resultados obtidos pela técnica de "dot blot". Assim, após reamplificação das amostras de DNA, transferência pelo método de "Southern Blot" e hibridização com oligonucleotídeos específicos, a localização das bandas na auto-radiografia foi analisada. Todos os casos mostram hibridização correspondente àquela observada no "dot blot" e na posição esperada para o fragmento amplificado (118 pb). As figuras 14 a 16 mostram os resultados obtidos.

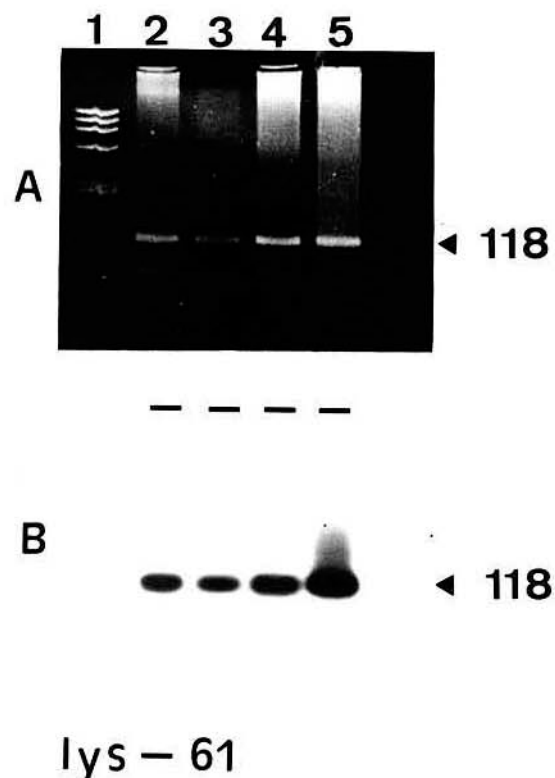


Figura 15: **A.** Eletroforese em agarose 2% de amostras que apresentaram mutação no oncogene N-Ras. Posição 1: Φ X 174 Hae III, posições 2, 3, 4 e 5: Amostras do produto de PCR de paciente com mutação no oncogene N-Ras (as quatro amostras são do paciente número 22, mas obtidas de diferentes reações da PCR). **B.** Auto-radiografia das amostras apresentadas em A, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda mutante alelo-específica para o oncogene N-Ras. Sonda utilizada: lys codon 61 (AAA, número 3 na tabela 4).

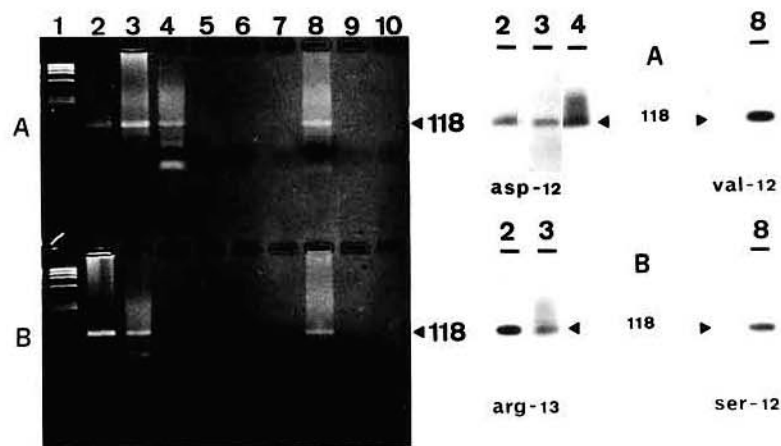


Figura 16: **Esquerda.** Eletroforese em agarose 2% de amostras que apresentaram mutação no oncogene N-Ras. Posições 1A e 1B: Φ X 174 Hae III; posições 2A, 3A, 4A, 8A, 2B, 3B e 8B: amostras do produto da PCR, respectivamente dos pacientes números 12, 21, 14, 37, 13, 1 e 54 com mutação no oncogene N-Ras. Estas amostras foram transferidas para uma membrana de nylon, que foi dividida em 4 porções. Cada porção foi hibridizada com a respectiva sonda mutante.

Direita. Auto-radiografia das amostras representadas à esquerda, transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sondas alelo-específicas para o oncogene N-Ras. 2A, 3A, 4A-sonda utilizada: asp-codon 12 (GAT, número 5 na tabela 2); 8A-sonda utilizada: val-codon 12 (GTT, número 7 na tabela 2); 2B, 3B-sonda utilizada: arg-codon 13 (CGT, número 4 na tabela 3); 8B-sonda utilizada: ser-codon 12 (AGT, número 2 na tabela 2).

Sequenciamento direto do fragmento amplificado

Este tipo de análise foi conduzida em algumas amostras apenas para confirmação adicional da mutação. Como a amostra número 21 apresentou hibridização positiva para duas mutações simultaneamente, foi uma das amostras submetidas ao sequenciamento direto (figuras 10 e 11). As figuras 17 a 19 mostram os casos em que o sequenciamento foi realizado.

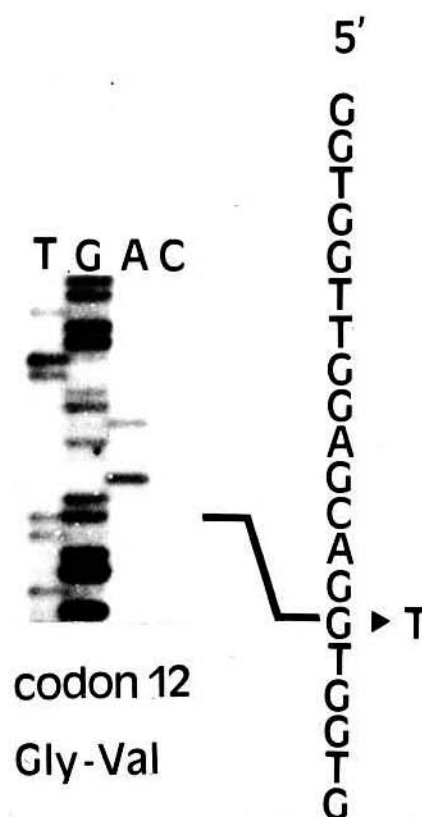


Figura 17: Auto-radiografia do gel de sequenciamento do fragmento de DNA do paciente número 37, amplificado e sequenciado com o "primer" dos codons 12/13 do oncogene N-Ras. A substituição de GGT por GTT no codon 12 do oncogene N-Ras, que resulta na alteração do aminoácido Glicina para Valina está indicada pela seta. (Observar a presença dos 2 nucleotídeos G e T na mesma posição horizontal).

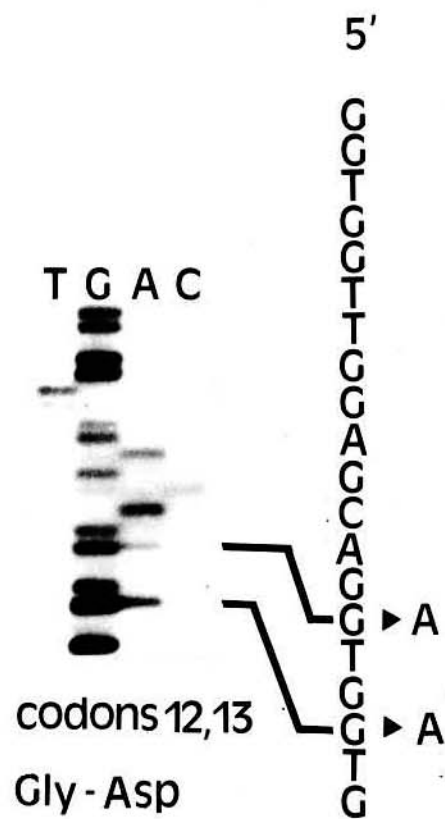


Figura 18: Auto-radiografia do gel de sequenciamento do fragmento de DNA do paciente número 21, amplificado e sequenciado com o "primer" dos codons 12/13 do oncogene N-Ras. As substituições de GGT-GAT tanto no codon 12 como no codon 13 do oncogene N-Ras, que resultam na alteração do aminoácido Glicina para Ácido aspártico estão indicadas pelas setas. (Observar a presença dos 2 nucleotídeos G e A na mesma posição horizontal).

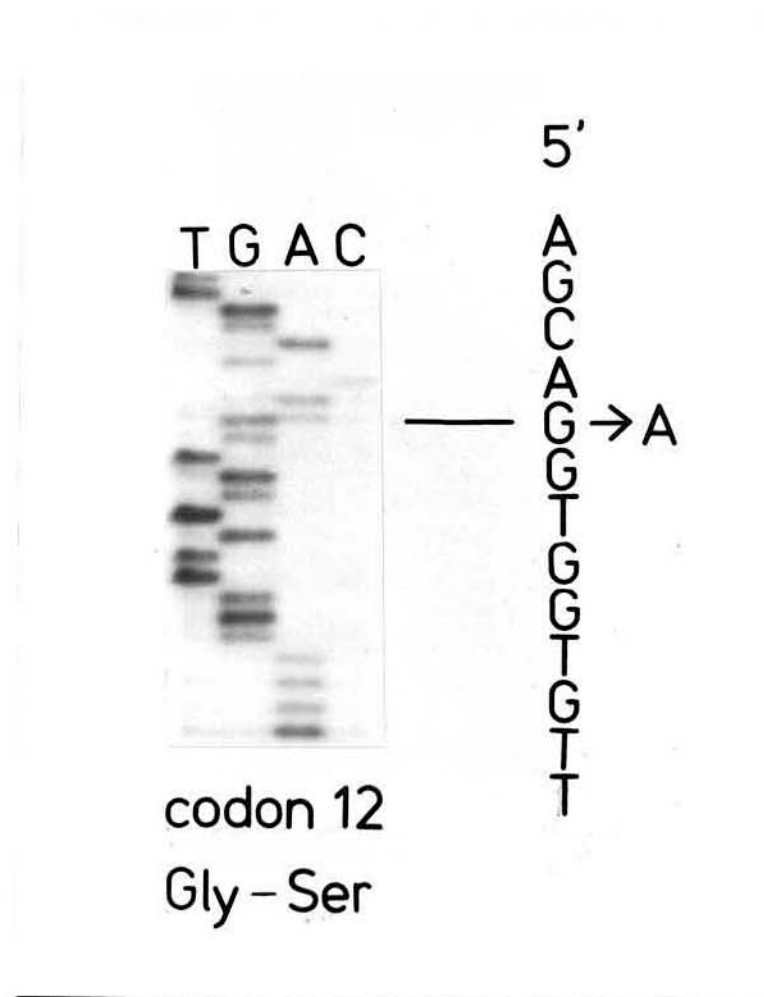


Figura 19: Auto-radiografia do gel de sequenciamento do fragmento de DNA do paciente número 54, amplificado e sequenciado com o "primer" dos codons 12/13 do oncogene N-Ras. A substituição de GGT-AGT no codon 12 do oncogene N-Ras, que resulta na alteração do aminoácido Glicina para Serina está indicada pela seta. (Observar a presença dos 2 nucleotídeos G e A na mesma posição horizontal).

Frequência das mutações

Foram detectadas mutações em 9 pacientes: 8 com LMA e 1 com LMMC. Em um dos 8 pacientes foram observadas duas mutações simultâneas. A frequência de pacientes com LMA que apresentaram mutações no proto-oncogene *N-ras* foi de 20% (8 em 40). Nenhuma mutação foi identificada nos pacientes com LLA. A única amostra de LMMC apresentou mutação no codon 12 com substituição G→A, correspondendo à troca de glicina para serina (GGT-AGT).

Em cinco das dez mutações identificadas ocorreu a mudança do tipo G→A, em quatro delas houve substituição de uma glicina por um ácido aspártico no codon 12 (GGT→GAT) e em 1 houve substituição de glicina para serina (GGT→AGT) no codon 12.

A distribuição das mutações de acordo com a classificação FAB mostrou 25% M1 (2 casos), 37,5% M2 (3 casos) e 37,5% M4 (3 casos). A frequência dos pacientes com mutações analisando-se cada um dos subtipos isoladamente mostrou que entre aqueles classificados como M1, 25% (2 em 8) apresentam mutações, entre os M2, 20% (3 em 15) e entre os M4 43% (3 em 7). Nos pacientes classificados como M5 (4), M6 (1) e M7 (1) não foram observadas mutações.

Os dados clínicos, hematológicos e em relação a mutações no proto-oncogene *Ras* nos pacientes estudados encontram-se nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LMA investigados para mutações no oncogene N-Ras.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	% Blastos na MO	SG (dias)	Subtipo FAB	Mutação codon	Raça	Exposição Substâncias Tóxicas	Resposta à Indução	SLD (dias)	Situação Atual
1	F	81	63,0	16	LMA-M2	gly-arg/13	C	não	óbito	0	óbito
2	M	18	70,0	1	LMA-M1	--	N	não	óbito	0	óbito
3	M	26	100,0	845	LMA-M5	--	C	não	RC	784	VR
4	M	38	54,0	133	LMA-M2	--	C	I	RC	91	óbito
5	M	38	79,0	15	LMA-M3	--	C	sim	óbito	0	óbito
6	F	49	100,0	4	LMA-M5	--	C	sim	óbito	0	óbito
7	M	69	86,0	667	LMA-M1	--	C	não	RC	563	VR
8	F	46	52,5	523	LMA-M5	--	C	não	RC	403	óbito
9	F	28	66,0	396	LMA-M2	--	N	I	RC	45	óbito
10	F	28	41,0	22	LMA-M2	--	C	I	óbito	0	óbito
11	M	69	30,5	132	LMA-M2	--	C	não	DR	0	óbito
12	M	31	66,0	120	LMA-M4	gly-asp/12	N	não	RC	42	óbito
13	M	58	87,0	7	LMA-M4	gly-arg/13	C	não	óbito	0	óbito
14	M	19	87,5	176	LMA-M1	gly-asp/12	C	sim	RC	80	óbito
15	F	72	41,5	123	LMA-M4	--	C	sim	óbito	0	óbito
16	M	17	94,0	645	LMA-M2	--	C	não	RC	334	óbito
17	F	30	68,0	10	LMA-M3	--	C	não	óbito	0	óbito
18	F	50	100,0	20	LMA-M1	--	C	não	óbito	0	óbito
19	M	62	50,0	586	LMA-M2	--	C	sim	RC	467	VD
20	M	60	72,0	4	LMA-M4	--	C	não	óbito	0	óbito
21	F	56	95,0	3	LMA-M1	gly-asp/12 gly-asp/13	C	I	óbito	0	óbito
22	F	25	40,0	46	LMA-M2	gln-lys/61	C	I	óbito	0	óbito
23	M	70	64,0	59	LMA-M4	--	C	não	óbito	0	óbito
24	M	40	35,0	193	LMA-M7	--	C	não	DR	0	óbito
25	F	24	51,0	9	LMA-M2	--	C	não	óbito	0	óbito
26	F	28	40,0	533	LMA-M2	--	C	não	RC	448	óbito
27	M	36	74,0	480	LMA-M2	--	C	I	RC	403	VD
28	M	44	83,0	471	LMA-M3	--	C	sim	RC	432	VR
29	M	55	74,0	181	LMA-M6	--	C	sim	RC	41	óbito
30	M	76	69,0	405	LMA-M1	--	C	I	RC	304	óbito
31	M	30	100,0	397	LMA-M4	--	C	sim	RC	348	VR
32	M	50	94,5	9	LMA-M4	gln-arg/61	C	não	óbito	0	óbito
33	F	50	100,0	11	LMA-M3	--	C	não	óbito	0	óbito
34	F	22	82,0	376	LMA-M5	--	C	não	RC	340	VR
35	M	39	82,5	112	LMA-M1	--	C	não	óbito	0	óbito
36	M	16	83,0	335	LMA-M2	--	C	sim	RC	154	VD
37	F	58	57,0	2	LMA-M2	gly-val/12	C	I	óbito	0	óbito
38	F	54	92,5	80	LMA-M1	--	C	sim	óbito	34	óbito
39	F	48	54,0	160	LMA-M2	--	C	I	DR	0	perda
40	F	56	30,0	396	LMA-M2	--	A	I	RC	263	óbito

SG: Sobrevida Global
SLD: Sobrevida Livre da Doença
RC: Remissão Completa
DR: Doença Refratária

VR: Vivo em Remissão
MO: Medula Óssea
I: Indeterminado
VD: Vivo com doença

C: Caucasóide
N: Negróide
A: Asiática

Tabela 6: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LMMC e LLA investigados para mutações no oncogene N-Ras.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	% Blastos na MO	Sobrevida Global (dias)	Subtipo FAB	Mutação codon
41	F	26	100,0	45	LLA-L2	--
42	F	24	100,0	450	LLA-L2	--
43	M	25	100,0	30	LLA-L3	--
44	F	33	100,0	450	LLA-L2	--
45	M	18	100,0	30	LLA-L2	--
46	F	15	100,0	300	LLA-L2	--
47	F	16	100,0	15	LLA-L2	--
48	M	14	100,0	15	LLA	--
49	M	16	100,0	600	LLA-L2	--
50	M	37	96,0	360	LLA-L2	--
51	F	31	43,0	210	LLA-L2	--
52	F	14	83,5	240	LLA-L2	--
53	M	15	95,0	180	LLA-L2	--
54	M	55	34,5	450	LMMC	gly-ser/12

MO: Medula Óssea

Exposição a prováveis substâncias tóxicas

A tabela 7 representa os possíveis fatores de risco observados nos pacientes aqui estudados segundo os critérios de Taylor e colaboradores (1992). Em 20 pacientes não foi possível a identificação de agentes tóxicos, e 10 foram excluídos porque os dados obtidos foram incompletos.

Tabela 7: Possíveis fatores de risco observados em 10 pacientes.

Fatores de risco	nº de pacientes
• trabalhadores rurais com exposição contínua a agrotóxicos e inseticidas	3
• contato freqüente com derivados de benzeno, como cola de sapateiro, gasolina (químicos, carpinteiros, mecânicos de automóveis)	5*
• contato repetido e freqüente com tinturas de cabelos (cabeleireiras ou pacientes que manipularam tinturas de cabelos)	2

* o paciente com mutação encontra-se incluído nesse grupo.

Análise Estatística

Entre os dois grupos de pacientes, com ou sem mutações no proto-oncogene *N-ras* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando-se as variáveis idade, sexo e raça (tabelas 8 e 9).

A análise de possível associação entre exposição a substâncias tóxicas e a presença de mutações não revelou dados significativos. Entre o grupo de pacientes com mutações, 1 indivíduo (12,5%) apresentou evidências sugestivas de exposição, ao passo que no outro grupo este valor era de 28,1% (tabela 9).

A resposta dos pacientes à terapêutica de indução da remissão (indução da remissão) também não apresentou significância estatística na comparação entre os dois grupos de pacientes (tabela 9).

A sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram significativamente menores em pacientes com mutações no oncogene *N-Ras* do que em pacientes sem mutações. O período médio da SG dos pacientes com LMA com mutações no oncogene *N-Ras* foi de $47,4 \pm 65,4$ dias, comparado com $260,1 \pm 242,4$ dias para os pacientes sem mutação ($p=0,0020$). Na SLD, a média de sobrevida foi de $15,2 \pm 30,0$ dias nos pacientes com mutação comparado com $170,4 \pm 218,4$ dias nos pacientes sem mutação ($p=0,0474$) (figuras 20 e 21) (tabela 8). Estes resultados não foram significativamente alterados quando ambos os grupos foram estratificados por idade maior ou menor que 60 anos. Isto é, mesmo em grupos com idade maior ou menor que 60 anos, as diferenças de SG e SLD foram mantidas entre os grupos com ou sem mutação no oncogene *N-Ras* (figuras 1 e 2, anexo 2).

Também foi realizada a estratificação dos 2 grupos de pacientes (com e sem mutações no oncogene *N-ras*) de acordo com a classificação FAB (subtipos M1, M2 e M4) (figuras 3 a 8, anexo 2).

Tabela 8: Idade, sobrevida global e sobrevida livre de doença nos pacientes com leucemia mielóide aguda estudados nesse trabalho.

Variáveis Contínuas	N-Ras positivo (média ± DP)	N-Ras negativo (média ± DP)	p
Idade (*)	47,2 ± 20,7	43,4 ± 17,5	0,5425
SG (#)	47,4 ± 65,4	260,1 ± 242,4	0,0020
SLD (#)	15,2 ± 30,0	170,4 ± 218,4	0,0474

* = anos

= dias

Tabela 9: Sexo, raça, exposição a substâncias tóxicas e resposta à terapêutica de indução da remissão nos pacientes com leucemia mielóide aguda estudados nesse trabalho.

Variáveis Categóricas		N - Ras positivo		N-Ras negativo		p
		n	FR (%)	n	FR (%)	
Sexo	Masculino	4	50,0	18	56,25	1,000
	Feminino	4	50,0	14	42,75	
Raça	Caucasóide	7	87,5	28	90,6	0,607
	Negróide	1	12,5	2	6,3	
	Asiática	0	0	1	3,1	
Exposição Substâncias Tóxicas	Sim	1	12,5	9	28,1	0,4488
	Não	4	50,0	16	50,0	
	Indeterminado	3	37,5	7	21,9	
Indução da remissão	óbito	6	75,0	13	40,6	0,1018
	doença refratária	0	0,0	3	9,4	
	remissão completa	2	25,0	16	50,0	

FR = frequência relativa

n = frequência absoluta

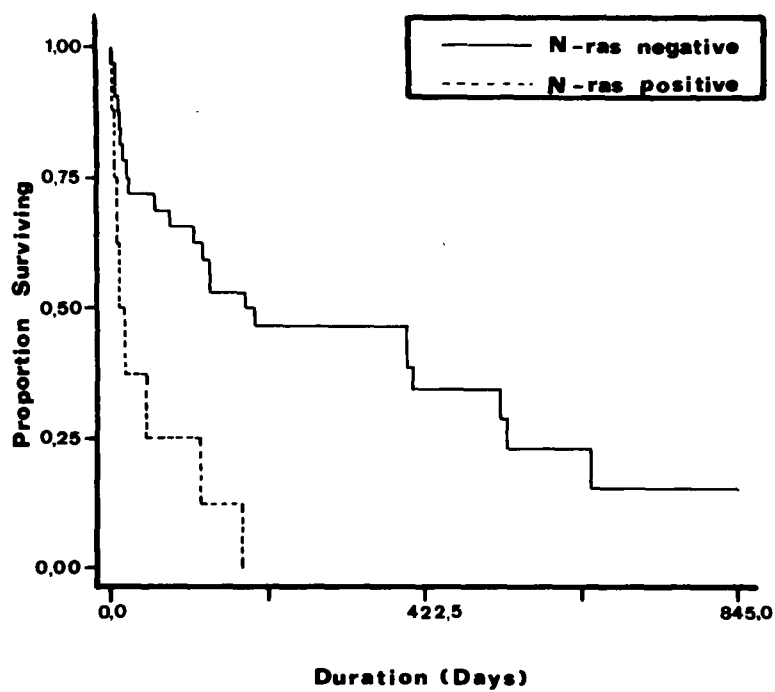


Figura 20: Curva da sobrevida global (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com (n=8) ou sem (n=32) mutações no oncogene *N-ras* ($p=0,0020$).

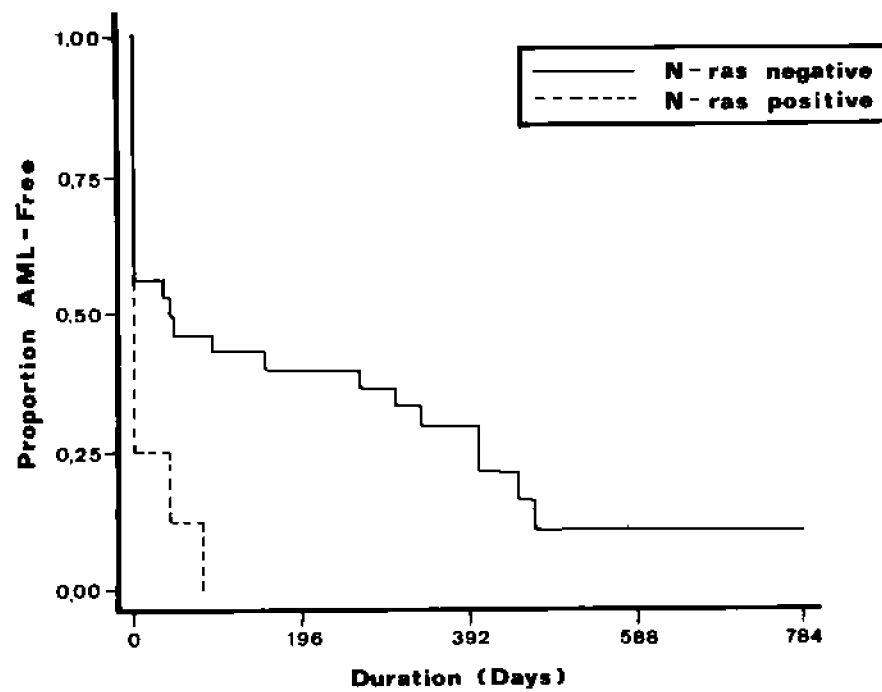


Figura 21: Curva da sobrevida livre de doença (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com (n=8) ou sem (n=32) mutações no oncogene *N-ras* ($p=0,0474$).

DISCUSSÃO

Numerosos estudos com o objetivo de analisar a frequência de mutações no proto-oncogene *N-ras* em leucemias agudas foram realizados em populações da Europa, da América do Norte e em alguns locais da Ásia. A detecção e a estimativa da frequência das mutações nos oncogenes *ras* nas neoplasias é importante sob vários aspectos: pelo possível significado prognóstico ou diagnóstico, para a caracterização dos eventos genéticos envolvidos no desenvolvimento de um determinado tumor, pela potencial utilização como marcadores para a identificação de doença residual e, finalmente porque as mutações nos oncogenes *ras* poderiam ser indicativas do envolvimento de substâncias ou agentes carcinógenos (van Mansfeld & Bos, 1992). A população brasileira apresenta características específicas e únicas tanto em relação a aspectos raciais como àqueles concernentes às condições ambientais a que se encontra submetida (Lorand *et al*, 1984; Martins *et al*, 1993; Costa *et al*, 1994). O presente trabalho representa o primeiro estudo em que a frequência de mutações no oncogene *N-ras* foi analisada na população brasileira.

Conforme referido anteriormente, os estudos iniciais para detecção das mutações dos oncogenes *ras* eram extremamente complexos e demorados, envolvendo a determinação por transfecção de células NIH 3T3, seguida de clonagem e sequenciamento do oncogene. A introdução da técnica de PCR por Saiki e colaboradores (1988) simplificou muito o procedimento para a análise de mutações em doenças hereditárias e em vários tipos de tumores. Deste modo, atualmente é possível estudar o DNA proveniente desde de embriões com horas de vida até de organismos milhões de anos após sua morte. O extraordinário poder dessa técnica revolucionária permite a detecção de defeitos genéticos, de agentes infecciosos e a análise de informações antropológicas e forenses a partir de uma grande variedade de materiais, incluindo um único fio de cabelo, amostras de tecidos fixados em formalina ou parafina, manchas de sangue ou esfregaços de sangue ou medula óssea (Wright & Wynford-Thomas, 1990; van Mansfeld & Bos, 1992; Costa & Costa, 1992).

Nesse estudo a extração de DNA foi levada a efeito tanto a partir de aspirado de medula óssea como de esfregaços de sangue periférico ou medula óssea. Para obtenção de DNA desses esfregaços foi desenvolvido um método próprio de extração de DNA. Esse método é mais simples e rápido do que aqueles descritos anteriormente, pois envolve a precipitação direta do DNA com

etanol após tratamento com guanidina, evitando as extrações com fenol e clorofórmio. Foram utilizadas no estudo lâminas recentes ou arquivadas por mais de um ano, coradas ou não pelo corante de Leishman (Melo *et al*, 1992).

Para a detecção de mutações nas seqüências de nucleotídeos do proto-oncogene *ras* amplificadas pela PCR são utilizados vários métodos, entre os quais podemos citar a hibridização alelo-específica (HAE), clivagem pela RNase ("RNase mismatch cleavage"), polimorfismo de conformação em hélice simples ("single strand conformation polymorphism"-(SSCP)), análise por sequenciamento de DNA, "mutant enriched PCR" e PCR alelo-específica. Dentre esses, os métodos mais freqüentemente empregados são a hibridização alelo-específica e o sequenciamento do DNA (van Mansfeld & Bos, 1992).

A HAE está fundamentada no fato de que um oligonucleotídeo com uma única base discordante apresenta uma ligação mais fraca ao DNA complementar do que um oligonucleotídeo sem nenhuma alteração, isto é, inteiramente complementar. Ao serem realizados os procedimentos de hibridização e posteriores lavagens em temperaturas ao redor da temperatura de dissociação (T_m) do oligonucleotídeo é possível detectar mutações com substituição de apenas 1 base, pois, somente permanecerá ligado ao DNA o oligonucleotídeo perfeitamente complementar, ao passo que aquele com uma base discordante será removido, em razão da "estringência" do procedimento utilizado (van Mansfeld & Bos, 1992). Além disso, este é um método com sensibilidade suficiente para detectar a presença de uma célula mutante em 10 células normais (Cogswell *et al*, 1989). O método de sequenciamento do DNA e "Southern Blot" foram utilizados apenas para a confirmação das mutações detectadas pela HAE. Apesar de ser um método freqüentemente empregado por possibilitar a detecção de mutações desconhecidas, o sequenciamento é menos sensível que a HAE e faculta a detecção de 1 célula mutante em 4 células normais (Cogswell *et al*, 1989).

Embora a HAE seja específica na detecção de mutações não é incomum em nossos resultados, assim como naqueles da literatura, a presença de graus variáveis de radiação de fundo ou "background" em algumas amostras. Este tipo de artefato ocorre ocasionalmente, sendo em geral reduzido e não oferecendo dificuldade na sua diferenciação das amostras positivas. As

hibridizações foram sempre realizadas no mínimo em duplicatas ou triplicatas de maneira que foi possível facilmente confirmar o resultado positivo elevando ligeiramente a temperatura de lavagem o que resulta no desaparecimento ou redução significativa do "background" quando comparado às amostras positivas. Importa ressaltar que em geral nossas amostras foram constituídas predominantemente por células leucêmicas. Desse modo, partindo do pressuposto que a mutação é clonal e todas as células leucêmicas afetadas, a detecção da mutação pelo método empregado nesse trabalho foi inequívoca. Assim, nos casos positivos seria esperado sempre um sinal nítido e comparável em intensidade ao sinal do controle normal como de fato foi encontrado (Senn *et al*, 1988b; Taylor *et al*, 1992). Merece comentário, no entanto, a possibilidade da mutação no oncogene N-*ras* ocorrer como um evento subsequente ao início da leucemia. Nesses casos teríamos algumas subpopulações de células com mutações e outras sem mutação (Bashey *et al*, 1992). Nessa eventualidade, a análise poderia ser mais complexa, e pequenas intensidades de sinal poderiam, após exaustiva análise, ter significado importante. Nos nossos casos, não ocorreu em nenhum procedimento sinal de pequena intensidade que fosse constante em todas as hibridizações. Além disso, os métodos necessários para analisar essa possibilidade fogem dos objetivos desse trabalho. É importante lembrar ainda que, se o objetivo da investigação fosse detectar doença residual, a radiação de fundo poderia ser eliminada pelo controle rigoroso da temperatura de lavagem (nesse caso devem ser preferencialmente utilizadas lavagens com TMAC (cloreto de tetrametilamônio)) (van Mansfeld & Bos, 1992).

Neste trabalho, dos 40 pacientes com LMA, 8 (20%) apresentaram mutações no proto-oncogene N-*ras* nos codons 12, 13 e 61 (tabela 5). Esta frequência não difere significativamente daquelas descritas nos estudos realizados nos EUA e Europa (tabela 10), e sugerem que em relação à frequência de mutações no proto-oncogene N-*ras* a população brasileira não se comporta de maneira diferente daquela estudada no hemisfério Norte, apesar das possíveis diferenças ambientais a que estão expostas, das diferentes origens étnicas e do intenso processo de miscigenação.

Tabela 10: Frequência de mutações no oncogene N-*ras* em pacientes com LMA.

nº de pacientes estudados	% de mutações	referência
18	22,0	Senn <i>et al</i> , 1988a
34	20,6	Farr <i>et al</i> , 1991
55	15,0	Radich <i>et al</i> , 1990
28	21,0	Browett & Norton, 1989
9	11,1	Janssen <i>et al</i> , 1987
30	10,0	Chin <i>et al</i> , 1992
16	25,0	Ahuja <i>et al</i> , 1990
51	19,0	Bartram <i>et al</i> , 1989
37	13,5	Bos <i>et al</i> , 1987a
52	27,0	Farr <i>et al</i> , 1988
40	20,0	este estudo

Foram identificadas 10 mutações de ponto, sendo 9 delas em pacientes com LMA (1 paciente apresentou 2 mutações) e uma no paciente com LMMC. A ocorrência de duas mutações simultâneas em um mesmo proto-oncogene *ras* ou em dois proto-oncogenes *ras* distintos tem sido ocasionalmente descrita. Browett & Norton (1989) observaram 2 mutações envolvendo o oncogene N-*ras* no codon 12 (GGT-CTT) e H-*ras* no codon 61 (CAG-CAC). Taylor e colaboradores (1992) relataram 3 casos de pacientes com 2 mutações em oncogenes *ras* diferentes. Radich *et al* (1990) observaram 1 paciente com duas mutações no oncogene N-*ras*, localizadas nos codons 13 e 61. Padua *et al* (1988) relataram que 2 pacientes apresentaram mutações em 2 genes *ras* diferentes. Bashey *et al* (1992), no entanto, relatam a presença de mutações nos codons 12 e 59 nos oncogenes H-*ras* e K-*ras* e a ocorrência de linhagens celulares que adquiriram mais de uma mutação no oncogene *ras*. O significado do aparecimento de duas mutações simultâneas não está ainda suficientemente esclarecido. Existe a possibilidade que nesses

casos houvesse um efeito potencializador de uma mutação em relação à outra no desenvolvimento do processo neoplásico, embora não exista comprovação experimental para essa hipótese (Bashey *et al*, 1992). As mutações encontradas em nosso estudo foram duas transições G→A, com substituição de glicina por ácido aspártico, uma ocorrendo no codon 12 e a outra no codon 13. O paciente portador dessas duas mutações simultâneas foi classificado como subtipo FAB M1 e morreu durante a terapêutica quimioterápica de indução, com sobrevida global de 3 dias.

Entre as 10 mutações encontradas neste estudo, incluindo as 2 mutações do mesmo paciente, 5 ocorreram com transição G→A. Destas, 4 resultaram na substituição de glicina para ácido aspártico no codon 12 (GGT→GAT) e 1 na substituição de glicina para serina (GGT→AGT) no codon 12. A predominância desse tipo de mutação específica, foi relatada por vários outros investigadores. Radich *et al* (1990) observaram que todas as mutações nos codons 12 e 13 de sua análise (5 em 8) foram transições G→A, com substituição de glicina para ácido aspártico. Os resultados de Farr *et al* (1991) mostraram que a troca de bases mais comum foi G→A (4 em 8). Taylor *et al* (1992) relataram que 8 de 13 mutações nos oncogenes N-*ras* e K-*ras* foram G→A. O significado desse tipo de substituição ainda não está elucidado, porém foi aventada a hipótese do envolvimento de um agente mutagênico específico ou da ocorrência de vantagem seletiva oferecida "in vivo" por essa mutação na proteína N-*ras* (Ahuja *et al*, 1990; Farr *et al*, 1991). Senn e colaboradores (1988a) também encontraram somente mutações GGT→GAT no codon 12, assim como Bos *et al* (1985) no codon 13, sugerindo que possa haver uma preferência na substituição do segundo nucleotídeo do codon da glicina. No estudo realizado por Zarbl *et al* (1985), com a utilização de modelo animal mostrou que a vasta maioria dos carcinomas de mama em ratos continham genes H-*ras* ativados por transições G→A no segundo nucleotídeo do codon 12. Além disso, Quintanilla e colaboradores (1986) mostraram que tumores de pele em camundongos induzidos por dimetil-benzantraceno tinham uma transversão A→T específica no segundo nucleotídeo do codon 61 do proto-oncogene N-*ras*. Estes dados conduziram à especulação de que poderia ocorrer uma reação química que predominantemente resultaria em lesões com especificidade para uma determinada seqüência de DNA ou por uma localização específica no ácido nucleico (Senn *et al*, 1988a).

Os resultados aqui obtidos sugerem uma maior proporção de mutações no subtipo M4 (3 em 7) que nos subtipos M1 (2 em 8) e M2 (3 em 15), embora não alcancem diferenças estatisticamente significativas. Os dados da literatura a esse respeito são discordantes, mas a maioria dos estudos indica resultados comparáveis aos por nós alcançados. Radich *et al* observaram elevada proporção de LMA classificadas como subtipo FAB M4 entre os pacientes com mutações no oncogene *N-ras* (38%) comparadas com os pacientes sem mutações (13%), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Nossos dados, em suporte aos descritos anteriormente, apresentam 37,5% (3 em 8) de LMA classificadas como subtipo M4 dentre os pacientes com mutação e 12,5% (4 em 32) entre os pacientes sem mutação. Além disso, Farr *et al* (1988) observaram alelos mutantes em 1 entre 8 LMA classificadas como subtipo M1, 5 entre 22 LMA classificadas como M2 e 8 entre 22 LMA classificadas como M4 e sugerem que, apesar de não serem restritas a um subtipo morfológico específico, as mutações nos oncogenes *ras* poderiam ocorrer com mais freqüência no subtipo M4 do que nos subtipos M1, M2 ou M5 nas LMA. Em estudo posterior, esses autores relataram não terem encontrado correlação estatisticamente significativa entre a presença de mutação nos oncogenes *ras* e a classificação FAB, com mutações ocorrendo tanto no subtipo M1 como nos subtipos mais diferenciados M4 e M5. Entretanto, observaram uma alta incidência dos oncogenes *ras* ativados no subtipo M5 nas LMA em crianças (4 em 6) (Farr *et al*, 1991). Bos *et al* (1987a) encontraram aproximadamente 40% (5 em 12) de ativação do proto-oncogene *N-ras* em LMA classificados como subtipo M4. Bartram e colaboradores (1989) observaram que 60% das LMA caracterizadas por mutações nos proto-oncogenes *ras* eram classificadas como subtipo M4 (9 em 16). Também investigações levadas a efeito em pacientes com síndrome mielodisplásica (MDS) mostram o envolvimento dos oncogenes *ras* mais freqüente em pacientes que evoluem para leucemias mielóides com diferenciação monoblástica ou monocitóide. Desse modo, Yunis *et al* (1989) relataram que 8 de 11 pacientes com MDS e portadores de mutações *ras* detectadas ao diagnóstico ou durante a evolução da doença, desenvolveram leucemia aguda e destes 6 foram classificados como portadores do subtipo M4 ou M5. Padua *et al* (1988) também observaram uma freqüência aparentemente alta (69%, 11 em 16) de mutações em pacientes com LMMC.

É importante ressaltar, entretanto, que a interpretação dos dados a respeito da possível associação entre subtipos da classificação FAB e presença ou ausência de mutações apresenta sempre limitações importantes, principalmente devido ao pequeno tamanho da amostra na grande maioria dos estudos publicados, o que resulta na possibilidade de que os resultados obtidos poderiam ser modificados se um número suficientemente grande de pacientes fosse estudado.

Taylor *et al* (1992) em um estudo colaborativo nos Estados Unidos analisaram indivíduos com leucemia mielóide aguda e procuraram relacionar a presença de mutações nos oncogenes *ras* e a exposição a agentes químicos possivelmente associados à etiopatogenia das leucemias. Observaram que entre aqueles pacientes com mutações havia uma proporção significativamente maior (60%) de expostos a agentes tóxicos ocupacionais do que entre os pacientes sem mutações (15%). Assim, propuseram a hipótese que pacientes com LMA e oncogenes *ras* ativados poderiam representar um subtipo específico de LMA, associado à exposição a agentes químicos. Esses dados seriam apoiados por estudos experimentais que correlacionam o aparecimento de ativação nos proto-oncogenes *ras* após estímulo por algumas substâncias químicas (Balmain & Pragnell, 1983; Zarbl *et al*, 1985; Kumar *et al*, 1990; Reynolds *et al*, 1990). Além disso, há alguma evidência que no homem, mutações nos proto-oncogenes *ras* em carcinoma de pulmão poderiam estar associadas ao hábito de fumar (Rodenhuis & Slebos, 1992).

Parece razoável supor que a população de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP apresente graus de exposição a agentes tóxicos (agrotóxicos, substâncias químicas, solventes e outros) diferentes, provavelmente maiores, do que daqueles apresentados pelos pacientes estudados nos EUA, uma vez que a população brasileira estaria exposta a condições ambientais diferentes e com muito menor controle que as de outros países do hemisfério Norte (Lorand *et al*, 1984). Em razão desses dados, julgamos apropriado conduzir análise semelhante no conjunto de pacientes aqui estudados. Obviamente, a obtenção dos dados epidemiológicos a partir dos prontuários clínicos não foi possível em grande parte dos pacientes. Assim, os dados foram alcançados entre os pacientes ainda em acompanhamento clínico por entrevista pessoal e nos casos em que os pacientes haviam morrido, a família foi contactada por telefone. Apesar das limitações desse tipo de análise, os dados obtidos foram suficientes para realização de análise estatística

e comparação com o estudo de Taylor e colaboradores (1992). Nossos resultados não mostraram associação entre possível exposição a agentes tóxicos e mutações no proto-oncogene N-*ras*, não confirmando neste grupo de pacientes os dados de Taylor *et al* (1992). Assim, os dados desse trabalho sugerem que no grupo de pacientes aqui estudados as mutações no proto-oncogene N-*ras* não identificaram um subgrupo específico de LMA analisados relativamente a ocupações de risco. Adicionalmente, a frequência global dos pacientes com mutações não foi significativamente diferentes nos estudos anteriores em populações do hemisfério Norte.

Previamente à análise dos aspectos clínicos entre os dois grupos de pacientes com LMA, com ou sem proto-oncogenes ativados, é importante ressaltar que não houve diferenças estatisticamente significativas com relação às variáveis idade, sexo e raça. Resultados semelhantes entre essas variáveis foram também observados por Bartram *et al* (1989).

Poucos trabalhos abordam o estudo de variáveis clínicas em associação com mutações no proto-oncogene N-*ras* nas leucemias agudas (Needleman *et al*, 1986; Senn *et al*, 1988a; Bartram *et al*, 1989; Radich *et al*, 1990; Farr *et al*, 1991). Os resultados não permitem conclusões definitivas, mas aparentemente não mostram diferenças significativas entre os dois grupos de pacientes quando analisadas a taxa de remissão, sobrevida global ou sobrevida livre da doença. Limitações importantes em todos esses estudos, assim como neste trabalho, incluem o pequeno número de pacientes estudados e a dificuldade na análise de todas as múltiplas variáveis envolvidas na evolução clínica. No entanto, apesar destas restrições, esse tipo de análise é importante e deve ser realizada porque permite a comparação entre os diversos grupos de pacientes e poderia contribuir para indicar uma tendência dos resultados que poderia ser estatisticamente comprovada por estudos multicêntricos maiores.

Os dados aqui obtidos em relação à proporção de pacientes que obtiveram remissão clínica e hematológica não mostram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, com ou sem mutações. No entanto, parece existir uma tendência de resposta favorável no grupo sem mutações (50%) quando comparado ao grupo com mutações (25%). Também Needleman e colaboradores (1986) e Browett & Norton (1989) não observaram diferenças na taxa de remissão entre os dois grupos estudados.

A comparação entre a sobrevida global e a sobrevida livre de doença entre os dois grupos de pacientes mostrou resultados extremamente interessantes. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas análises das duas variáveis, indicando maiores valores no grupo de pacientes sem mutações. Esses resultados aparentemente não são alterados quando os pacientes são estratificados por idade em maiores ou menores que 60 anos. Embora exista dificuldade na confirmação de que a existência da mutação poderia ser uma variável independente na indicação do prognóstico, aparentemente, a tendência da curva de sobrevida global e sobrevida livre de doença também não seria modificada quando os dados são estratificados em relação aos subtipos FAB (figuras 1 a 8, anexo 2). Merece menção o fato que em nosso estudo não foi possível a avaliação das anormalidades citogenéticas na maioria dos pacientes analisados. Desse modo, mesmo levando-se em conta todas as limitações já descritas, seria razoável afirmar que nossos dados sugerem uma evolução clínica favorável nos pacientes sem mutação quando comparados com aqueles que apresentam mutação no proto-oncogene *N-ras*.

Em apoio a esta noção, Paquette e colaboradores (1993) estudaram pacientes com MDS e observaram que a sobrevida global para pacientes com mutações foi significativamente menor do que para pacientes sem mutações. Também Yunis *et al* (1989), Padua *et al* (1988) e van Kamp *et al* (1992) observaram pior evolução em pacientes portadores de MDS e com mutações nos proto-oncogenes *ras*. Além disso, Lübbert e colaboradores (1990) observaram pior evolução em pacientes com LLA e mutações no proto-oncogene *N-Ras*, sugerindo que esse fator poderia ser um indicador de mau prognóstico. Ainda, Rodenhuis & Slebos (1992), em trabalho com pacientes portadores de câncer de pulmão, observaram que o grupo com mutações no proto-oncogene *K-ras* evoluiu de maneira significativamente pior do que o grupo sem mutações. Seria possível, como sugerem Needleman *et al* (1986) e Senn *et al* (1988b) que tumores com mutações nos proto-oncogenes *ras* poderiam ser mais agressivos e com maior poder de invasão e potencial metastático.

No entanto, é importante ressaltar que Radich *et al* (1990) ao analisarem um grupo relativamente grande de pacientes com LMA (n=55) não observaram alterações estatisticamente

significativas nos dois grupos de pacientes. Porém, houve uma tendência de os pacientes com mutação apresentarem sobrevida livre de doença maiores que aqueles sem mutação.

A interpretação de todos esses resultados não é conclusiva e indica que devam ser conduzidos estudos multicêntricos com grande número de pacientes para que possa emergir um quadro claro da relevância das mutações no oncogene *N-ras* como indicador de prognóstico na LMA.

O número de pacientes com LLA investigados neste trabalho é extremamente reduzido para permitir uma análise válida e comparação com resultados da literatura, que indicam frequências variáveis de 6 a 18%. A observação de que nenhuma mutação foi detectada sugere uma baixa frequência dessa anomalia, que deve ser comprovada pelo estudo de um número maior de pacientes.

Em seu conjunto os resultados desse trabalho mostraram, pela primeira vez em populações brasileiras, que a frequência de mutações no oncogene *N-ras* é de 20% e não difere significativamente daquela observada em estudos semelhantes realizados no hemisfério Norte. Além disso, os dados aqui obtidos sugerem que a presença de mutações não está associada à exposição a possíveis agentes tóxicos, e poderia indicar um grupo de pacientes com menores sobrevida global e sobrevida livre de doença.

CONCLUSÕES

1. Foi desenvolvido um método próprio de extração de DNA, a partir de lâminas de esfregaços de sangue periférico ou aspirados de medula óssea. Esse método é simples e rápido, envolvendo a precipitação direta do DNA com etanol após tratamento com guanidina, evitando as extrações com fenol e clorofórmio, e facilita o estudo de lâminas arquivadas por mais de um ano, coradas ou não pelo corante de Leishman.
2. A frequência observada de mutações no proto-oncogene *N-ras* em 40 pacientes com LMA foi de 20%. Esta frequência não difere significativamente daquelas descritas nos estudos realizados nos EUA e Europa e sugerem que em relação à frequência de mutações no proto-oncogene *N-ras* a população brasileira não se comportaria de maneira diferente das populações estudadas no hemisfério Norte, apesar das possíveis diferenças ambientais a que estão expostas, das diferentes origens étnicas e do intenso processo de miscigenação. O presente trabalho representa o primeiro estudo em que a frequência de mutações no oncogene *N-ras* foi analisada na população brasileira.
3. Os resultados obtidos nos pacientes com LLA sugerem reduzida frequência de mutações nessa condição, o que deve ser comprovado pelo estudo de um número maior de pacientes.
4. Entre os dois grupos de pacientes, com ou sem mutações no proto-oncogene *N-ras* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando-se as variáveis sexo, idade, raça, exposição a possíveis agentes tóxicos e resposta dos pacientes à terapêutica de indução da remissão. Os dados em relação à exposição a agentes tóxicos sugerem que as mutações nos oncogenes *N-ras* não identificam um grupo específico de pacientes com LMA e expostos a esses agentes.
5. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as variáveis sobrevida global e sobrevida livre de doença nos 2 grupos de pacientes, com ou sem mutações no proto-oncogene *N-ras*. Esses resultados sugerem evolução clínica favorável,

com maiores sobrevida global e sobrevida livre de doença, nos pacientes sem mutação quando comparados com aqueles que apresentaram mutação no proto-oncogene *N-ras*.

RESUMO

As mutações de ponto nos codons 12, 13 e 61 do proto-oncogene *N-ras* são frequentemente associadas às neoplasias humanas. Com o objetivo de determinar a frequência de mutações no proto-oncogene *N-ras* nos codons 12, 13 e 61, foram estudados 53 pacientes com leucemias agudas (40 LMA e 13 LLA) atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP. O DNA foi isolado a partir de sangue periférico, aspirado de medula óssea ou de lâminas arquivadas de esfregaços de sangue periférico ou medula óssea. O oncogene *N-ras* foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O material amplificado foi fixado em filtros de nylon e as mutações identificadas por hibridização alelo-específica (HAE) e confirmadas pelos métodos de "Southern Blot" e sequenciamento direto do fragmento amplificado. Nenhum paciente com LLA apresentou mutação. Os resultados mostraram uma frequência de 20% de mutações entre os pacientes com LMA (8 em 40). Esta frequência não difere significativamente daquelas descritas nos estudos realizados nos EUA e Europa e sugerem que em relação à frequência de mutações no proto-oncogene *N-ras* a população brasileira não se comportaria de maneira diferente das populações estudadas no hemisfério Norte, apesar das possíveis diferenças ambientais a que estão expostas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando-se os 2 grupos de pacientes, com e sem mutações, e as variáveis idade, sexo, raça, exposição a possíveis agentes tóxicos e resposta dos pacientes à terapêutica de indução da remissão. Os dados em relação à exposição a agentes tóxicos sugerem que as mutações nos oncogenes *N-ras* não identificam um grupo específico de pacientes com LMA e expostos a esses agentes. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as variáveis sobrevida global e sobrevida livre de doença nos 2 grupos de pacientes, com ou sem mutações no proto-oncogene *N-ras*. Esses resultados sugerem evolução clínica favorável, com maiores sobrevida global e sobrevida livre de doença, nos pacientes sem mutação quando comparados com aqueles que apresentaram mutação no proto-oncogene *N-ras*.

SUMMARY

Point mutations in the *N-ras* oncogene codons 12, 13 e 61 are frequently associated with human neoplasias. In order to determine the frequency of *N-ras* gene mutations in codons 12, 13 and 61, we studied 53 patients with acute leukemia (40 LMA and 13 LLA) at the University Hospital of Campinas. DNA was isolated from peripheral blood, bone marrow aspirates or archived glass slide smears. *N-ras* oncogene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplified materials were fixed to nylon filters and the mutations identified by allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO) and confirmed by Southern Blot and direct sequencing of the amplified fragment. We found a frequency of 20% of the *N-ras* mutations in the patients with acute myeloid leukemia (8 in 40) which is comparable with the frequencies reported for the Northern American and European populations despite the different environment conditions to which Brazilian population is subjected. None of the 13 patients with acute lymphoblastic leukemia had a *ras* gene mutation. No statistical significances were observed when comparing the 2 groups of patients, with and without mutations, with the variables age, sex, race, occupational or other kinds of exposures to known chemical carcinogens. When comparing the overall survival and AML-free survival with the presence or absence of *N-ras* mutations in the studied patients, it was observed that the 2 variables were significantly shorter in patients with *N-ras* mutations. These data suggest that the *N-ras* mutation may identify a group of AML patients with poor prognosis regarding the overall survival and AML-free survival.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, H.G.; Foti, A.; Bar-Eli, M. & Cline, M.J. The pattern of mutational involvement of Ras genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. **Blood**, **75**(8):1684-1690 (1990).
- Balmain, A. & Pragnell, I.B. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-*ras* oncogene. **Nature**, **303**:72-74 (1983).
- Bar-Eli, M.; Ahuja, H.; Gonzalez-Cadavid, N.; Foti, A. & Cline, M.J. Analysis of N-*ras* exon-1 mutations in myelodysplastic syndromes by polymerase chain reaction and direct sequencing. **Blood**, **73**(1):281-283 (1989).
- Barbacid, M. *ras* genes. **Ann.Rev.Biochem.**, **56**:779-827 (1987).
- Barbacid, M. *ras* oncogenes: their role in neoplasia. **Eur.J.Clin.Inv.**, **20**:225-235 (1990).
- Bartram, C.R.; Ludwig, W.D.; Hiddemann, W.; Lyons, J.; Buschle, M.; Ritter, J.; Harbott, J.; Fröhlich, A. & Janssen, J.W.G. Acute myeloid leukemia: analysis of *ras* gene mutations and clonality defined by polymorphic X-linked loci. **Leukemia**, **3**(4):247-256 (1989).
- Bashey, A.; Gill, R.; Levi, S.; Farr, C.J.; Clutterbuck, R.; Millar, J.L.; Pragnell, I.B. & Marshall, C.J. Mutational activation of the N-*ras* oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-*ras* mutation in AML pathogenesis. **Blood**, **79**(4):981-989 (1992).
- Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.-T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.R. & Sultan, C. Proposals for classification of the acute leukaemias: French-American-British (FAB) Cooperative Group. **Br.J.Haematol.**, **33**:451-458 (1976).
- Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.-T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.R. & Sultan, C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann.Int.Med.**, **103**:460-462 (1985a).
- Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.-T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.R. & Sultan, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann.Int.Med.**, **103**:626-629 (1985b).

- Bishop, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, **64**:235-248 (1991).
- Bos, L.J.; Toksoz, D.; Marshall, C.J.; Verlaan-de Vries, M.; Veeneman, G.H.; van der Eb, A.J.; van Boom, J.H.; Janssen, J.W.G. & Steenvoorden, A.C.M. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-*ras* oncogene in human acute myeloid leukaemia. **Nature**, **315**(27):726-730 (1985).
- Bos, J.L.; Verlaan-de Vries, M.; van der Eb, A.J.; Janssen, J.W.G.; Delwel, R.; Löwenberg, B. & Colly, L.P. Mutations in N-*ras* predominate in acute myeloid leukemia. **Blood**, **69**(4):1237-1241 (1987a).
- Bos, J.L.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Verlaan-de Vries, M.; van Boom, J.H.; van der Eb, A.J. & Vogelstein, B. Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. **Nature**, **327**:293-297 (1987b).
- Bos, J.L. *ras* oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, **49**:4682-4689 (1989).
- Browett, P.J. & Norton, J.D. Analysis of *ras* gene mutations and methylation state in human leukemias. **Oncogene**, **4**:1029-1036 (1989).
- Büchner, T.; Hiddemann, W.; Löffler, G.; Gassmann, W.; Maschmeyer, G.; Heit, W.; Hossfeld, D.; Weh, H.; Ludwig, W.-D.; Thiel, E.; Nowrousian, M.; Aul, C.; Lengfelder, E.; Lathan, B.; Mainzer, K.; Urbanitz, D.; Emmerich, B.; Middelhoff, G.; Donhuijsen-Ant, H.R.; Hellriegel, H.-P. & Heinecke, A. Improved cure rate by very early intensification combined with prolonged maintenance chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia: data from the AML Cooperative Group. **Semin.Hematol.**, **28**(3, Suppl.4):76-79 (1991).
- Casartelli, C. Cancer and cytogenetics. **Rev.Bras.Genet.**, **16**(4):1109-1131 (1993).
- Chang, E.H.; Miller, P.S.; Cushman, C.; Devadas, K.; Pirollo, K.F.; Ts'o, P.O.P. & Yu, Z.P. Antisense inhibition of *ras* p21 expression that is sensitive to a point mutation. **Biochemistry**, **30**(34):8283-8286 (1991).

- Cheson, B.D.; Cassileth, P.A.; Head, D.R.; Schiffer, C.A.; Bennett, J.M.; Bloomfield, C.D.; Brunning, R.; Gale, R.P.; Grever, M.R.; Keating, M.J.; Sawitsky, A.; Stass, S.; Weinstein, H. & Woods, W.G. Report of the National Cancer Institute - Sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. **J.Clin.Oncol.**, **8**(5):813-819, 1990.
- Chin, I.Y.; Koh, C. & Bosco, J.L. *ras* gene mutations in Malaysian leukemia patients. **Acta Haematol.**, **87**:107-108 (1992).
- Cogswell, P.C.; Morgan, R.; Dunn, M.; Neubauer, A.; Nelson, P.; Poland-Johnston, N.K.; Sandberg, A.A. & Liu, E. Mutations of the *ras* protooncogenes in chronic myelogenous leukemia: a high frequency of *ras* mutations in *bcr/abl* rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia. **Blood**, **74**(8):2629-2633 (1989).
- Costa, F.F.; Sonati, M.F. & Zago, M.A. Hemoglobin Stanleyville II (alpha 78 Asu-Lys) is associated with a 3,7 Kb gene deletion. **Hum. Gen.**, **86**:312-320 (1991).
- Costa, F.F.; Figueiredo, M.S.; Sonati, M.F.; Kimura, E.M. & Martins, C.S.B. The IVS 1-110 and codon 39 beta thalassemia mutations in association with alpha thal 2 (-37 Kb) and Hb Hasharon in a Brazilian patient. **Hemoglobin**, **16**:525-528 (1992).
- Costa, F.F. & Costa S.C.B. Reações em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. **Rev.Bras.Reumatol.**, **32**:142-146 (1992).
- Costa, F.F.; Arruda, V.R.; Gonçalves, M.S.; Miranda, S.R.P.; Carvalho, M.H.; Sonati, M.F. & Saad, S.T.O. β^S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. **Am.J.Haematol.**, **45**(1):96-97 (1994).
- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. **Practical Haematology**. 6^a edição, Churchill, New York.
- Deng, G.; Liu, X. & Wang, J. Correlation of mutations of oncogene C-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. **Oncogene Res.**, **6**:33-38 (1991).
- Egan, S.E. & Weinberg, R.A. The pathway to signal achievement. **Nature**, **365**:781-783 (1993).
- Farr, C.; Gill, R.; Katz, F.; Gibbons, B. & Marshall, C. Analysis of *ras* gene mutations in childhood myeloid leukaemia. **Br.J.Haematol.**, **77**:323-327 (1991).

- Farr, C.J.; Saiki, R.K.; Erlich, H.A.; McCormick, F. & Marshall, C.J. Analysis of *ras* gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **85**:1629-1633 (1988).
- Fisher, R.A. **Statistical methods for research workers**. Oliver & Boyd (eds). Edinburgh (1934).
- Forrester, K.; Almoguera, C.; Han, K.; Grizzle, W.E. & Perucho, M. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. **Nature**, **327**:298-303 (1987).
- Gehan, E.A. A generalized two sample wilcoxon test for doubly-censored data. **Biometrika**, **52**:650-653 (1965a).
- Gehan, E.A. A generalized wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. **Biometrika**, **52**:203-223 (1965b).
- Grand, R.J.A. & Owen, D. The biochemistry of *ras* p21. **Biochem.J.**, **279**:609-631 (1991).
- Hall, A. & Brown, R. Human *N-ras*: cDNA cloning and gene structure. **Nucl.Acids Res.**, **13**(14):5255-5268 (1985).
- Harvey, J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. **Nature**, **204**:1104-1105 (1964).
- Haubruck, H. & McCormick, F. *ras* p21: effects and regulation. **Biochim.Biophys.Acta**, **1072**:215-229 (1991).
- Hirsch-Ginsberg, C.; LeMaistre, A.C.; Kantarjian, H.; Talpaz, M.; Cork, A.; Freireich, E.J.; Trujillo, J.M.; Lee, M.S. & Stass, S.A. *ras* mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. **Blood**, **76**(6):1214-1219 (1990).
- Hoelzer, D.; Thiel, E.; Löffler, H.; Bodenstein, H.; Plaumann, L; Büchner, T.; Urbanitz, D; Koch, P.; Heimpel, H; Engelhardt, R; Müller, U; Wendt, F.-C.; Sodomann, H; Rühl, H; Herrmann, F; Kaboth, W; Dietzfelbinger, H; Pralle, H; Lunscken, Ch; Hellriegel, K.-P; Spors, S; Nowrousian, RM; Fischer, J; Fülle, H; Mitrou, PS.; Pfreundschuh, M.; Görg, Ch; Emmerich, B; Queisser, W; Meyer, P; Labedzki, L.; Essers, U.; König, H; Mainzer, K.;

- Herrmann, R.; Messerer, D. & Zwingers, T. Intensified therapy in acute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. **Blood**, **64**(1):38-47 (1984).
- Janssen, J.W.G.; Steenvoorden, A.C.M.; Lyons, J.; Anger, B.; Böhlke, J.U.; Bos, J.L.; Seliger, H. & Bartram, C.R. *ras* gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **84**:9228-9232 (1987).
- Jeanpierre, M. A rapid method for the purification of DNA from blood. **Nucl. Acids Res.**, **15**(22):9611 (1987).
- Kaelin Jr., W.G. Molecular insights into cancer biology from RB and P53. In: **Educational book. 29th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology** - May 16-18 (1993), Orlando-Flórida.
- Kaplan, E.L. & Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J.Am.Statist.Ass.**, **53**:457-481 (1958).
- Kastan, M.B.; Strauss, L.C. & Civin, C.I. The role of hematopoietic growth factors and oncogenes in leukemogenesis. **Am.J.Pediatric.Hematol.Oncol.**, **11**(3):249-267 (1989).
- Kirsten, W.H. & Mayer, L.A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. **J.Natl.Cancer Inst.**, **39**:311-335 (1967).
- Kumar, R.; Sukumar, S. & Barbacid, M. Activation of *ras* oncogenes preceding the onset of neoplasia. **Science**, **248**:1101-1104 (1990).
- Lemoine, N.R.; Mayall, E.S.; Wyllie, F.S.; Farr, C.J.; Hughes, D.; Padua, R.A.; Thurston, V.; Williams, E.D. & Wynford-Thomas, D. Activated *ras* oncogenes in human thyroid cancers. **Cancer Res.**, **48**:4459-4463 (1988).
- Lister, T.A.; Rohatiner, A.Z.S.; Bassan, R.; Gregory, W.; Willis, L.; Barnett, M.J.; Waxman, J.; Richards, M.A.; Ganesan, T.S.; Tucker, J.; Malik, S.; Biruls, R. & Amess, J. Conventional dose cytosine arabinoside in combination chemotherapy for acute myelogenous leukemia. **Semin.Hematol.**, **14**(2):53-54 (1987).
- Lorand, I.G.H.; Souza, C.A. & Costa, F.F. Hematological toxicity associated with agricultural chemicals. **Lancet**, **1**:404 (1984).

- Lubbert, M.; Mirro, J. Jr.; Miller, C.W.; Kahan, J.; Isaac, G.; Kitchingman, G.; Mertelsmann, R.; Herrmann, F.; McCormick, F. & Koeffler, H.P. N-Ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlate with a poor prognosis. **Blood**, 75(5):1163-1169 (1990).
- 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(6):1707-1712 (1988).
- Mann, H.B. & Whitney, D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Ann.math.Statist.**, 18: 50-60 (1947).
- Martins, C.S.B.; Ramalho, A.S.; Sonati, M.F.; Gonçalves, M.S. and Costa, F.F. Molecular characterization of β Thalassemia heterozygotes in Brazil. **J.Med.Genet.**, 30(9):797-798 (1993).
- McCormick, F. The world according to GAP. **Oncogene**, 5:1281-1283 (1990).
- McKenzie, S.J. Diagnostic utility of oncogenes and their products in human cancer. **Biochim.Biophys.Acta**, 1072:193-214 (1991).
- Melo, M.B.; Sales, T.S.I.; Lorand-Metze, I. & Costa, F.F. Rapid method for isolation of DNA from glass slide smears for PCR. **Acta Haematol.**, 87:214-215 (1992).
- Minden, M.D. Oncogenes. In: Tannock, I.F. & Hill, R.P. (eds). **The basic science of oncology**, Pergamon Press, New York (1987).
- Namba, H.; Gutman, R.A.; Matsuo, K.; Alvarez, A. & Fagin, J.A. H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. **J.Clin.Endocrinol. & Metab.**, 71:223-229 (1990).
- Needleman, S.W.; Kraus, M.H.; Srivastava, S.K.; Levine, P.H. & Aaronson, S.A. High frequency of N-ras activation in acute myelogenous leukemia. **Blood**, 67(3):753-757 (1986).
- Neri, A.; Knowles, D.M.; Greco, A.; McCormick, F. & Dalla-Favera, R. Analysis of ras oncogene mutations in human lymphoid malignancies. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 85:9268-9272 (1988).

- Padua, R.A.; Carter, G.; Hughes, D.; Gow, J.; Farr, C.; Oscier, D.; McCormick, F. & Jacobs, A. *ras* mutations in myelodysplasia detected by amplification, oligonucleotide hybridization, and transformation. **Leukemia**, **2**(8):503-510 (1988).
- Paquette, R.L.; Landaw, E.M.; Pierre, R.V.; Kahan, J.; Lübbert, M.; Lazcano, O.; Isaac, G.; McCormick, F. & Koeffler, H.P. N-*ras* mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. **Blood**, **82**(2):590-599 (1993).
- Quintanilla, M.; Brown, K.; Ramsden, M. & Balmain, A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-*ras* during mouse skin carcinogenesis. **Nature**, **322**:78 (1986).
- Radich, J.P.; Kopecky, K.J.; Willman, C.L.; Weick, J.; Head, D.; Appelbaun, F. & Collins, S.J. N-*ras* mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. **Blood**, **76**(4):801-807 (1990).
- Rawn, J.D. **Biochemistry**. Neil Patterson Publishers. Burlington, North Carolina USA (1989).
- Reynolds, S.H.; Patterson, R.M.; Mennear, J.H.; Maronpot, R.R. & Anderson, M.W. *ras* gene activation in rat tumors induced by benzidine congeners and derived dyes. **Cancer Res.**, **50**:266-272 (1990).
- Rodenhuis, S.; Slebos, R.J.; Boot, A.J.M.; Evers, S.G.; Mooi, W.j.; Wagenaar, S.Sc.; van Bodegon, P.Ch. & Bos, J.L. Incidence and possible clinical significance of K-*ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. **Cancer Res.**, **48**:5738-5741 (1988).
- Rodenhuis, S.; Bos, J.L.; Slater, R.M.; Behrendt, H.; van't Veer, M. & Smets, L.A. Absence of oncogene amplifications and occasional activation of N-*ras* in lymphoblastic leukemia of childhood. **Blood**, **67**:1698-1704 (1986).
- Rodenhuis, S. & Slebos, R.J.C. Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. **Cancer Res.**, (suppl) **52**:2665-2669 (1992).
- Rosenberg, N & Krontiris, T.G The molecular basis of neoplasia. In: **Hematology. Basic principles and practice**. Hoffman, R.; Benz Jr., E.J.; Shatill, S.J.; Furie, B.; Cohen, H.J. (eds). Churchill Livingstone, New York (1991).
- Rous, P. The challenge to man of the neoplastic cell. **Science**, **157**:24-28 (1967).

- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higushi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**:487-491 (1988).
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual** (ed 2). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
- Sandler, D.P. & Collman, G.W. Cytogenetic and Environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults. **Am.J.Epidemiol.**, **126**:1017-1032 (1987).
- Senn, H.P.; Tran-Thang, Ch.; Wodnar-Filipowicz, A.; Jiricny, J.; Fopp, M.; Gratwohl, A.; Signer, E.; Weber, W. & Moroni, Ch. Mutation analysis of the N-*ras* proto-oncogene in active and remission phase of human acute leukemias. **Int.J.Cancer**, **41**:59-64 (1988a).
- Senn, H.P.; Jiricny, J.; Fopp, M.; Schmid, L. & Moroni, Ch. Relapse cell population differs from acute onset clone as shown by absence of the initially activated N-*ras* oncogene in a patient with acute myelomonocytic leukemia. **Blood**, **72**(3):931-935 (1988b).
- Smit, V.T.H.B.M.; Boot, A.J.M.; Smits, A.M.M.; Fleuren, G.J.; Cornelisse, C.J. & Bos, J.L. Kras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. **Nucl.Acids.Res.**, **16**(16):7773-7783 (1988).
- Sonati, M.F.; Miranda, S.R.P.; Kimura, E.M.; Saad, S.T.O. & Costa, F.F. Rapid identification of the association of Hemoglobin DPunjab and Hemoglobin S (HbDPunjab/HbS) by the polymerase chain reaction. **Rev.Bras.Genética**, **16**(4):1103-1108 (1993).
- Stamatoyannopoulos, G.; Nienhuis, A.W.; Leder, P. & Majerus, P.W. **The molecular basis of blood diseases**. W.B. Saunders, Philadelphia (1987).
- Sugimura, T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. **Science**, **258**:603-607 (1992).
- Susuki, Y.; Orita, M.; Shiraishi, M.; Hayashi, K. & Sekiya, T. Detection of *ras* gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. **Oncogene**, **5**:1037-1043 (1990).
- Taylor, J.A.; Sandler, D.P.; Bloomfield, C.D.; Shore, D.L.; Ball, E.D.; Neubauer, A.; McIntyre, O.R. & Liu, E. *ras* oncogene activation and occupational exposures in acute myeloid leukemia. **J.Nat.Cancer.Inst.**, **84**:1626-1632 (1992).

- Toksoz, D.; Farr, C.J. & Marshall, C.J. *ras* genes and acute myeloid leukaemia. **Br.J.Haematol.**, 71:1-6 (1989).
- Trahey, M.; McCormick, F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-*ras* p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. **Science**, 238:542-545 (1987).
- van Kamp, H.; Pijper, C.; Verlaan-de Vries, M.; Bos, J.L.; Leeksa, C.H.W.; Kerkhofs, H.; Willemze, R.; Fibbe, W.E. & Landegent, J.E. Longitudinal analysis of point mutations of the N-*ras* proto-oncogene in patients with myelodysplasia using archived blood smears. **Blood**, 79(5):1266-1270 (1992).
- van Mansfeld, A.D.M. & Bos, J.L. PCR-based approaches for detection of mutated *ras* genes. **PCR Methods and Applications**, 1:211-216 (1992).
- Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.M. & Bos, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N.Eng.J.Med.**, 319:525-532 (1988).
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends Genet.**, 9(4):138-141 (1993).
- Wahlin, A.; Hörnsten, P. & Jonsson, H. Remission rate and survival in acute myeloid leukemia: impact of selection and chemotherapy. **Eur.J.Haematol.**, 46:240-247 (1991).
- Waller, C.A. & MacLennan, I.C.M. Analysis of lymphocytes in blood and tissue. In: **Thompson, Techniques in clinical immunology**: pp. 170-195 - Blackwell Scientific Publications, Oxford (1977).
- Weinberg, R.A. *ras* oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. **Blood**, 64(6):1143-1145 (1984).
- Weinberg, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, 49:3713-3721 (1989).
- Wilcoxon, F. Individual comparison by ranking methods. **Biometrics**, 1:80-83 (1945).
- Williams, W.J.; Beutler, E.; Erslev, A.J. & Lichtman, M.A. **Hematology**. 4^a edição. McGraw-Hill. Pub. Company, New York (1990).

- Wright, P.A. & Wynford-Thomas, D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, **162**:99-117 (1990).
- Yunis, J.J.; Boot, A.J.M.; Mayer, M.G. & Bos, J.L. Mechanisms of *ras* mutation in myelodysplastic syndrome. **Oncogene**, **4**:609-614 (1989).
- Zarbl, H.; Sukumar, S.; Arthur, A.V.; Martin-Zanca, D. & Barbacid, M. Direct mutagenesis of Ha-*ras*-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. **Nature**, **315**:382-385 (1985).

ANEXOS

ANEXO 1

Tratamento quimioterápico de pacientes com LMA

O tratamento quimioterápico foi realizado considerando 2 grupos de pacientes, aqueles com idade menor que 60 anos e aqueles com idade maior que 60 anos e constou de três fases distintas: indução, consolidação e manutenção da remissão.

Pacientes com idade menor do que 60 anos:

Foram tratados durante a indução da remissão de acordo com o protocolo do grupo cooperativo LMA TAD-9 modificado (Büchner *et al*, 1991), de acordo com as dosagens descritas abaixo:

- citosina arabinosídeo: 100 mg/m²/dia intra-venosa (IV) contínuo nos dias 1 e 2;
- citosina arabinosídeo: 100 mg/m² IV a cada 12 horas nos dias 3 a 8;
- daunorrubicina: 60 mg/m²/dia IV nos dias 3 a 5;
- thioguanina: 100 mg/m² via oral (VO) a cada 12 horas nos dias 3 a 9.

Foram considerados como portadores de doença refratária os pacientes que não obtiveram remissão completa após a administração de 2 ciclos de TAD 9.

Os pacientes que obtiveram remissão completa receberam como esquema de consolidação da remissão um ciclo de citosina-arabinosídeo em altas doses e daunorrubicina, de acordo com as dosagens descritas abaixo:

- citosina-arabinosídeo: 2g/m² IV a cada 12 horas durante os dias 1 a 4;
- daunorrubicina: 45 mg/m²/dia IV nos dias 5 a 7.

Após a recuperação medular, um ciclo de TAD-7:

- citosina-arabinosídeo: 100 mg/m² IV a cada 12 horas nos dias 1 a 7;
- daunorrubicina: 45 mg/m²/dia IV nos dias 5 a 7;
- thioguanina: 100 mg/m² a cada 12 horas nos dias 1 a 7.

Os pacientes que se mantiveram em remissão completa foram tratados de acordo com o protocolo estabelecido para a manutenção da remissão durante 24 meses. Consta de ciclos mensais de citosina-arabinosídeo combinada alternadamente com a daunorrubicina, a tioguanina ou a ciclofosfamida, de acordo com as dosagens descritas abaixo:

Manutenção I:

citosina-arabinosídeo: 100 mg/m² subcutâneo (SC) a cada 12 horas nos dias 1 a 5

daunorrubicina: 45 mg/m²/dia IV nos dias 3 e 4

Manutenção II:

citosina arabinosídeo: como na manutenção I

tioguanina: 200 mg/m²/dia VO nos dias 1 a 5

Manutenção III:

citosina-arabinosídeo: como na manutenção I

ciclofosfamida: 1g/m²/dia IV no dia 3

Pacientes com idade igual ou maior do que 60 anos

Foram tratados durante a indução da remissão de acordo com a descrição de Wahlin *et al* (1991).

Receberam como esquema quimioterápico de indução da remissão, 3 ciclos de citosina arabinosídeo com baixas doses (10 mg/m² SC a cada 12 horas) durante 21 dias, com intervalo de 7 dias entre eles. Foram considerados como portadores de doença refratária, os pacientes que não obtiveram remissão completa após a administração dos 3 ciclos de citosina-arabinosídeo em baixas doses. Os pacientes que obtiveram remissão completa receberam como esquema de consolidação da remissão um único ciclo de citosina-arabinosídeo (100 mg/m² IV a cada 12 horas nos dias 1 a

7) e daunorrubicina ($45 \text{ mg/m}^2/\text{dia IV}$ nos dias 5 a 7). Os pacientes que se mantiveram em remissão completa foram tratados de acordo com o protocolo estabelecido para a manutenção da remissão com duração de 24 meses. Consta de ciclos mensais de citosina-arabinosídeo combinada alternadamente com a daunorrubicina, a tioguanina ou a ciclofosfamida, de acordo com as dosagens descritas abaixo:

Manutenção I:

citosina-arabinosídeo: $100 \text{ mg/m}^2/\text{dia SC}$ nos dias 1 a 5

daunorrubicina: $30 \text{ mg/m}^2/\text{dia IV}$ nos dias 3 e 4

Manutenção II:

citosina-arabinosídeo - como na manutenção I

tioguanina: $100 \text{ mg/m}^2/\text{dia VO}$ nos dias 1 a 5

Manutenção III:

citosina-arabinosídeo - como na manutenção I

ciclofosfamida: $100 \text{ mg/m}^2/\text{dia IV}$ no dia 3

Tratamento quimioterápico de pacientes com LLA

O tratamento quimioterápico constou de três fases distintas: indução, consolidação e profilaxia do sistema nervoso central e manutenção da remissão.

Os pacientes receberam como indução da remissão os quimioterápicos em dosagens e períodos de administração conforme descrito abaixo:

-prednisona: 60 mg/m²/dia VO do dia 1 ao 26, dividido em três doses.

-vincristina: 1,5 mg/m²/dia EV (máximo de 2 mg) nos dias 1, 8, 15 e 22

-l-asparaginase: 5000 U/m²/dia IM do dia 1 ao 14

Os pacientes que obtiveram remissão completa receberam como consolidação da remissão os quimioterápicos em dosagens e períodos de administração conforme descrito abaixo:

-ciclofosfamida: 650 mg/m² IV, nos dias 29, 43 e 57 (máximo de 1000 mg).

-citosina-arabinosídeo: 75 mg/m²/dia IV durante 4 dias consecutivos, iniciando nos dias 31, 38, 45 e 52.

-6 mercaptopurina: 60 mg/m²/dia VO do dia 29 até 56

Receberam como profilaxia do sistema nervoso central a administração intratecal de metotrexate (10 mg/m² nos dias 31, 36, 45 e 52) e a radioterapia craniana (2400 r, dividido em doses, do dia 29 ao 56)

A manutenção da remissão foi realizada durante a décima e a décima oitava semanas e constou da administração dos quimioterápicos em dosagens e períodos conforme descrito abaixo:

-6 mercaptopurina: 60 mg/m² VO diariamente.

-methotrexate: 20 mg/m²/dia VO 1 vez por semana.

Os pacientes que se mantiveram em remissão completa receberam novamente os esquemas de indução, consolidação e manutenção da remissão, conforme as descrições abaixo:

Indução da remissão (realizada durante as semanas 20 a 25)

- dexametasona: $10 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ VO, do dia 1 ao 28, dividido em 3 doses.
- vincristina: $1,5 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV (máximo de 2 mg) nos dias 1, 8, 15 e 22.
- adriamicina: $25 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV nos dias 1, 8, 15 e 22.

Consolidação da remissão (realizada durante as semanas 26 e 27):

- ciclifosfamida $650 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV, no dia 29 (máximo de 1000 mg).
- citosina-arabinosídeo: $75 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV (1 só injeção nos dias 31 a 34 e 38 a 41).
- tioguanina: $60 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ VO do dia 29 ao 42.

ANEXO 2

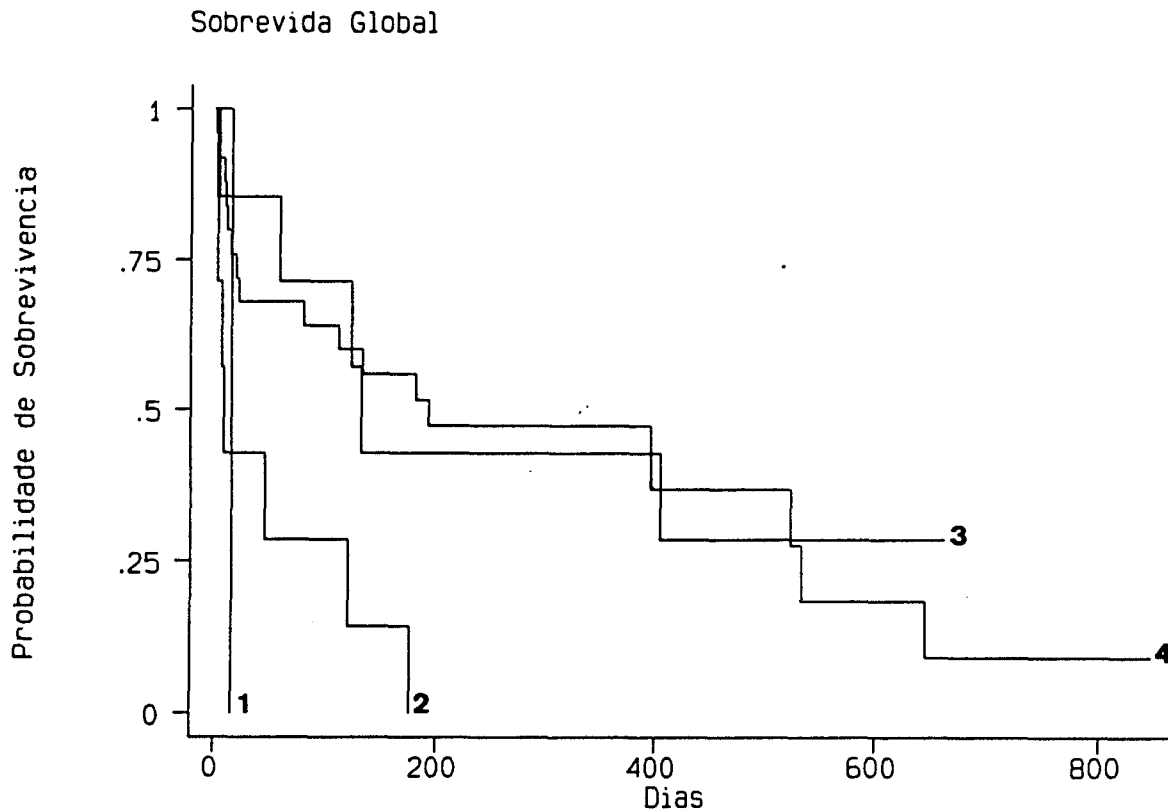


Figura 1: Curva da sobrevida global (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados por idade (acima de 60 anos e abaixo de 60 anos).

1. *N-ras* +; idade > 60 anos
2. *N-ras* +; idade < 60 anos
3. *N-ras* -; idade > 60 anos
4. *N-ras* -; idade < 60 anos

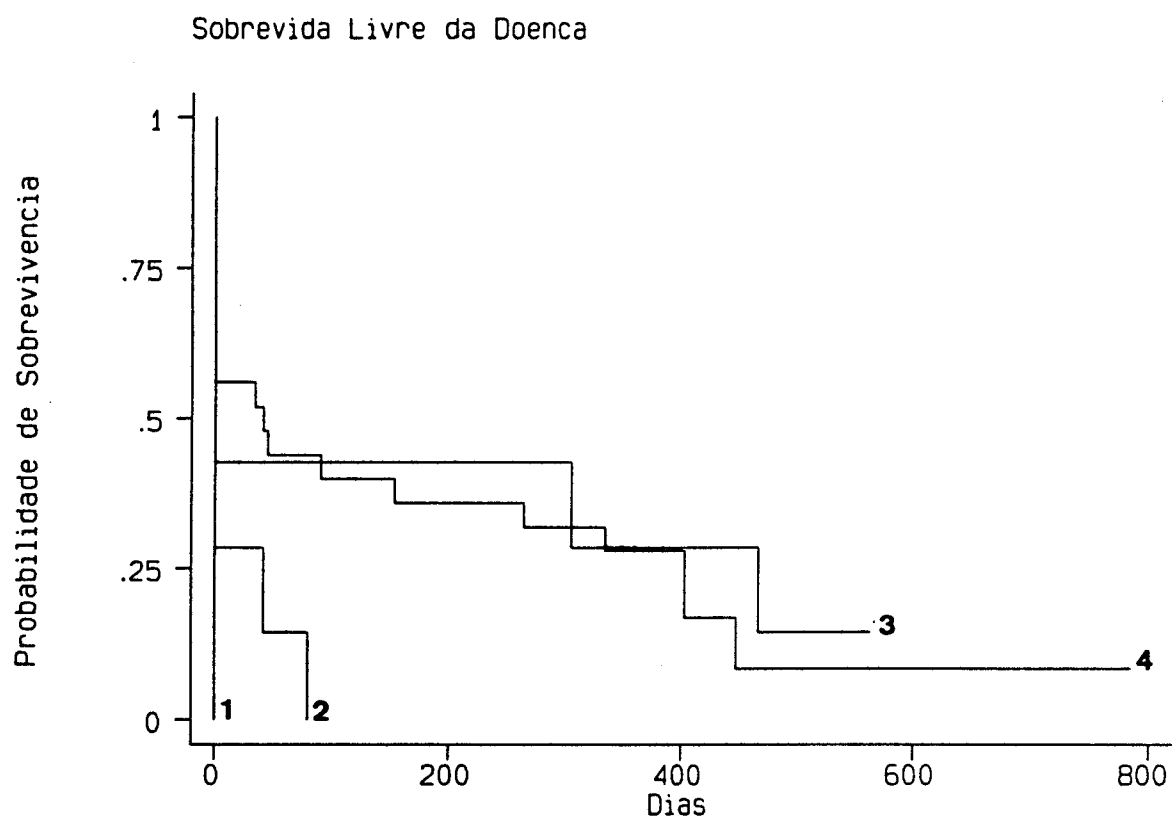


Figura 2: Curva da sobrevida livre de doença (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados por idade (acima de 60 anos e abaixo de 60 anos).

1. N-*ras* +; idade > 60 anos
2. N-*ras* +; idade < 60 anos
3. N-*ras* -; idade > 60 anos
4. N-*ras* -; idade < 60 anos

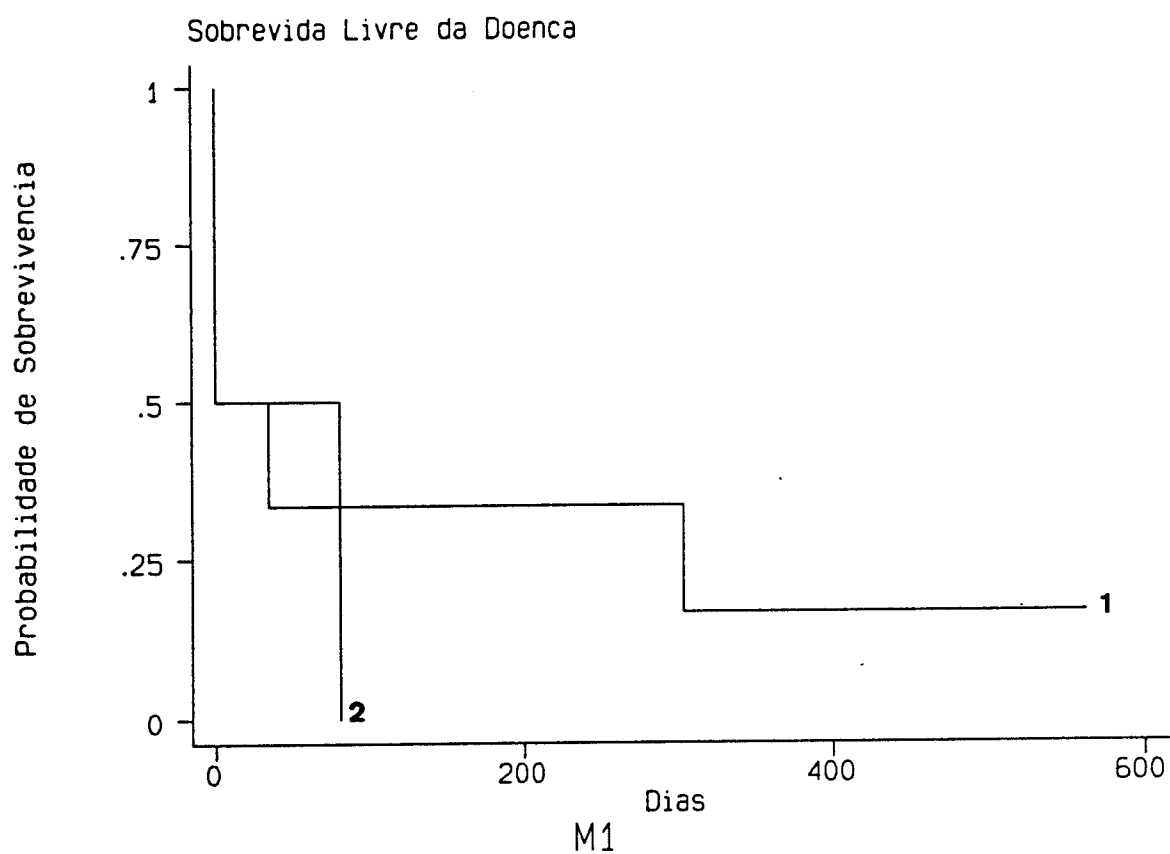


Figura 4: Curva da sobrevida livre da doença (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados segundo o subtipo FAB M1.

1. sem mutação no oncogene *N-ras*

2. com mutação no oncogene *N-ras*

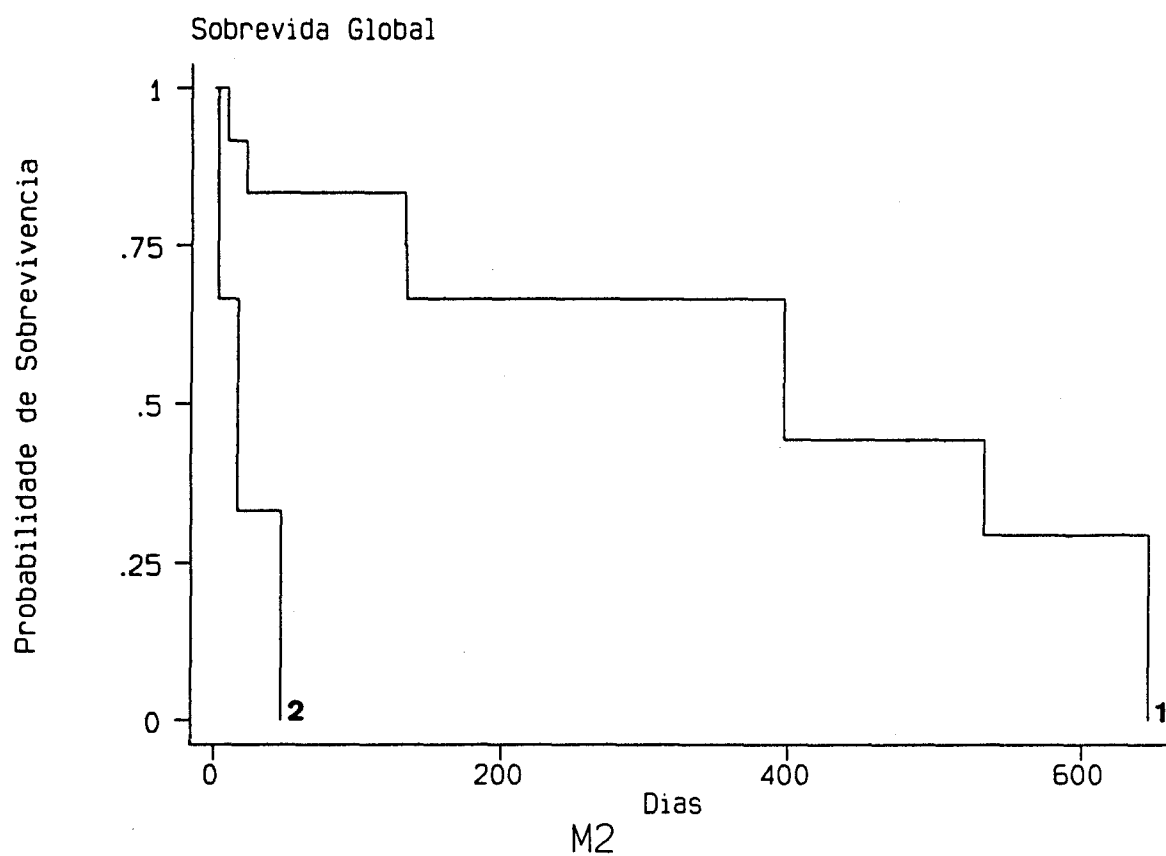


Figura 5: Curva da sobrevida global (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados segundo o subtipo FAB M2.

1. sem mutação no oncogene *N-ras*

2. com mutação no oncogene *N-ras*

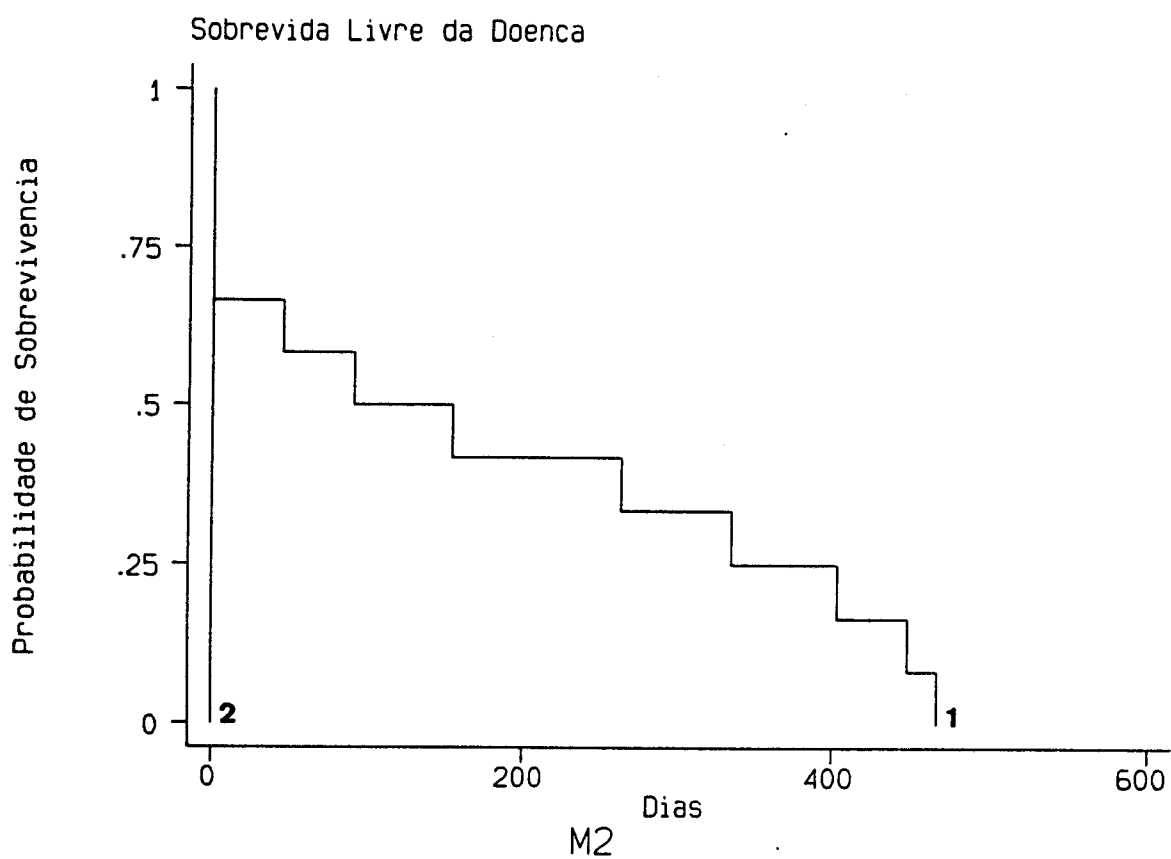


Figura 6: Curva da sobrevida livre da doença (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados segundo o subtipo FAB M2.

1. sem mutação no oncogene *N-ras*
2. com mutação no oncogene *N-ras*

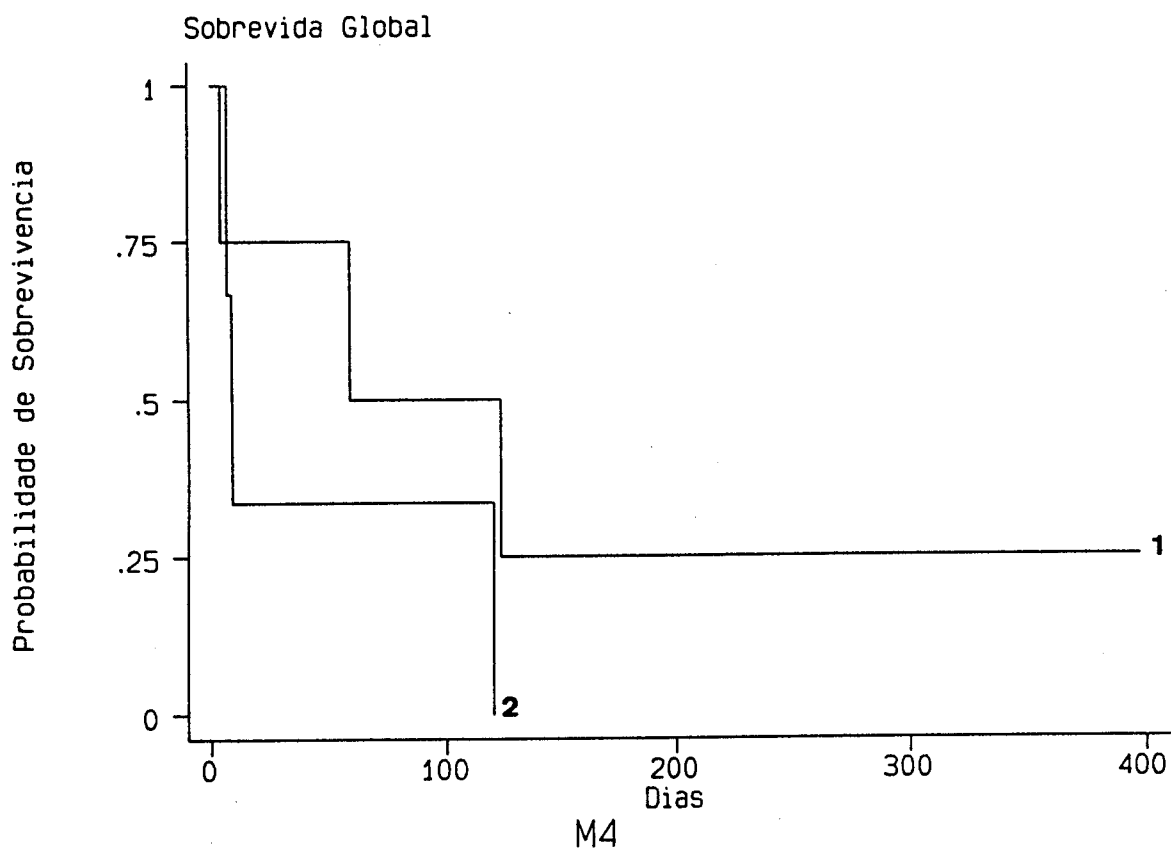


Figura 7: Curva da sobrevida global (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados segundo o subtipo FAB M4.

1. sem mutação no oncogene *N-ras*

2. com mutação no oncogene *N-ras*

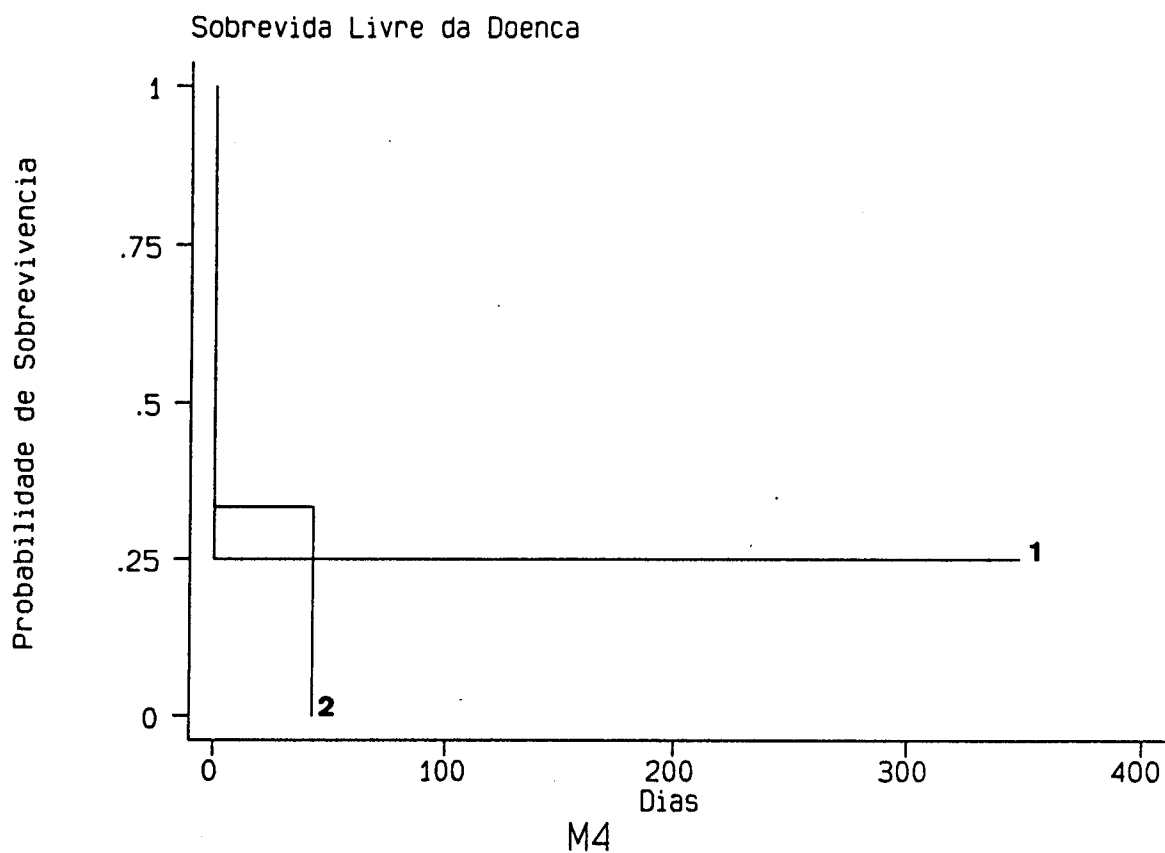


Figura 8: Curva da sobrevida livre da doença (método de Kaplan-Meier) dos pacientes com ou sem mutações no oncogene *N-ras*, estratificados segundo o subtipo FAB M4.

1. sem mutação no oncogene *N-ras*

2. com mutação no oncogene *N-ras*