

BC/35117
IB/81003



UNICAMP

T/UNICAMP

M491_m

Mônica Barbosa de Melo

**“Mutações nos genes supressores de tumores p53 e
RB1 em leucemias agudas”**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Co-orientadora: Prof. Dra. Irene Lorand Metze

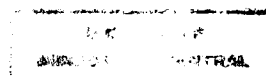
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Mônica Barbosa de Melo
e aprovada por Comissão Julgadora

25/06/98



**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Genética**

**Campinas/SP
1998**



Local e Data: Campinas, 25 de junho de 1998

Banca Examinadora:

Titulares:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (Orientador)


Assinatura

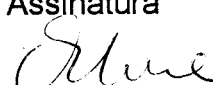
Prof^a. Dra. Sara Teresinha Ollala Saad

Assinatura

Prof^a. Dra. Christine Hackel


Assinatura

Prof. Dr. Vicente Odone Filho

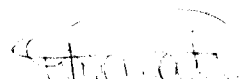

Assinatura

Prof^a. Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille


Assinatura

Suplentes:

Prof^a. Dra. Maria de Fátima Sonati


Assinatura

Prof. Dr. Cármino Antônio de Souza

Assinatura

*Ao Zé, por todo o amor, compreensão e
paciência.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Costa, pelo apoio e incentivo ao longo desses anos.

À Prof. Dra. Nina Ahmad pela convivência agradável durante o ano no Wills Eye Hospital e por ter permitido que parte desse trabalho fosse lá realizado.

Ao Prof Dr. Larry Donoso, por ter aberto as portas do Departamento de Pesquisa do Wills Eye Hospital.

Ao Paul, por essa amizade, pela paciência ao ensinar todos os passos no Wills Eye e pelas infindáveis conversas.

À Prof. Dra. Sara Saad, pelas sugestões no exame prévio e pelas valiosas opiniões no dia a dia.

À Prof. Dra. Christine Hackel, pelas sugestões no exame prévio e por estar sempre pronta a resolver nossos problemas.

À Prof. Dra. Maria de Fátima Sonati, pelo carinho com que sempre me recebeu e pelas cuidadosas sugestões no exame prévio.

À Prof. Dra. Irene Lorand Metze, pelas sugestões nas áreas clínica e estatística.

À Cleide, pela grande ajuda na realização da análise estatística.

À Rosana e à Sandrinha, pela paciência durante a confecção da tese.

À Tereza, Dilmara, Lena, Carlos, Simone, colegas de laboratório já há tanto tempo, pela agradável convivência e por não deixarem nada faltar.

À Silvana, pela amizade, pela disposição para sempre para dar uma “mãozinha” e pelas sempre valiosas sugestões.

À Dani, pela amizade, pela companhia nos almoços e e por estar sempre pronta a ajudar.

Ao Dudu, pela grande ajuda no computador.

À Tita, pela amizade e eterno otimismo.

Aos colegas de laboratório Valder, Katinha, Maluzinha, Vagner, Roberto, Paulo, Elisabeth, Adriana.

Aos novos colegas, Natasha, Rodrigo, Roberta, Valdirene, Marcelo, Arno, Marcos, Alexandra, Juliana, Ângela(s), Fernando.

À Raquel e à Silvana

À Tereza (da PG) por ajudar a manter tudo em ordem.

Ao CNPq, FAPESP e FAEP, pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Cármino Antônio de Souza, por ter aceito participar como suplente da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Vicente Odone Filho e à Prof. Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille por terem aceito o convite para participar da banca examinadora.

À minha mãe, pelo amor sem tamanho, pelo apoio em todas as horas.

Ao Dr. José Martins dos Anjos, pelo eterno incentivo.

Ao Zé, por tudo.

Aos pacientes do ambulatório da Disciplina de Hematologia do HC da UNICAMP.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	iii
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Ciclo celular	6
2. Gene retinoblastoma	8
2.1. localização e estrutura	9
2.2. proteína RB.....	10
2.3. complexo pRB/E2F como modelo de controle da proliferação	11
2.4. regulação da interação pRB/E2F	12
2.5. mutações no gene RB1	16
2.6. mutações no gene RB1 em leucemias.....	17
3. Gene p53	21
3.1. localização e estrutura	22
3.2. proteína p53	22
3.3. propriedades da p53 normal	25
3.4. interrupção do ciclo celular	29
3.5. morte celular programada ou apoptose	31
3.6. mutações no gene p53	33
3.7. mutações no gene p53 em leucemias	35
II. OBJETIVOS	38
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
1. pacientes	41
2. extração de DNA a partir de leucócitos	43
3. PCR-CSGE para rastreamento de mutações no gene RB1	44
4. PCR-SSCP para rastreamento de mutações no gene p53	47
5. sequenciamento	50
6. análise estatística	53

IV. RESULTADOS	54
1. PCR-CSGE/gene RB1	55
2. PCR-SSCP/gene p53	60
3. análise estatística	67
V. DISCUSSÃO	73
VI. CONCLUSÕES	92
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
VIII. ANEXOS	

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela I: Sequências dos “primers” utilizados para o rastreamento dos exons 1 a 27 e região promotora do gene RB1.....	46
Tabela II: Sequência dos “primers” utilizados para o rastreamento dos exons 4 a 10 do gene p53.	50
Tabela III: Amostras com padrão de mobilidade eletroforética alterado no CSGE para o gene RB1	56
Tabela IV: Amostras com padrão de mobilidade eletroforética alterado no SSCP para o gene p53	60
Tabela V: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LMA investigados para a presença de mutações nos genes p53 e RB1.	65
Tabela VI: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LLA investigados para a presença de mutações nos genes p53 e RB1.	66
Tabela VII: Análise descritiva global das variáveis contínuas idade e porcentagem de blastos nos pacientes com LMA e resultado da comparação entre essas variáveis e presença ou ausência de mutação.	69
Tabela VIII: Associação da variável idade após estratificação dos pacientes em $<$ e $\geq$ 60 anos em relação à presença ou ausência de mutação no gene p53.....	69
Tabela IX: Análise descritiva global das variáveis categóricas sexo, raça, resposta à indução de remissão e subtipo FAB nos pacientes com LMA e resultados da associação entre as variáveis e presença ou ausência de mutação.....	69
Tabela X: Análise da sobrevida global dos pacientes com ou sem mutação no gene p53 pelo método de Kaplan-Meyer.....	70

Tabela X: Análise da sobrevida global dos pacientes com ou sem mutação no gene p53 pelo método de Kaplan-Meier.....	70
Tabela XI: Análise da sobrevida global (SG) dos pacientes com ou sem mutação nos genes N-ras ou p53 pelo método de Kaplan-Meier.....	70
Figura 1: Esquema da via de transdução de sinais intracelular.....	05
Figura 2: Estrutura do gene RB1	10
Figura 3: Modelo da interação pRB-E2F.....	15
Figura 4: Mutações presentes em tumores humanos que inativam a função da proteína p53.	24
Figura 5: Mecanismos de supressão de tumores devido à presença de lesões no DNA.	27
Figura 6: Esquema de funcionamento do ciclo celular na ausência de lesões no DNA.....	28
Figura 7: Esquema de funcionamento do ciclo celular na presença de lesões no DNA.	30
Figura 8: Análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 3 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes.	57
Figura 9: Análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 17 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes.	58
Figura 10: Análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 26 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes.	59
Figura 11: Análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 5 do gene p53.	62
Figura 12: Análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 7 do gene p53.	63

Figura 13: Análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 10 do gene p53	64
Figura 14: Curvas de sobrevida global dos pacientes com e sem mutação no gene p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meyer.....	71
Figura 15: Curvas de sobrevida livre de doença dos pacientes com e sem mutação no gene p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meyer	71
Figura 16: Curvas de sobrevida global dos pacientes com e sem mutação nos genes <i>N-ras</i> e p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meyer.....	72
Figura 17: Curvas de sobrevida livre de doença dos pacientes com e sem mutação nos genes <i>N-ras</i> e p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meyer.....	72

RESUMO

A inativação de genes supressores de tumores, cujos produtos exercem uma influência inibitória na progressão do ciclo celular, pode levar ao processo de malignização. Nas LMAs, cuja patogênese ainda não está elucidada, a frequência de mutações no gene p53 varia de 4 a 15% e nas LLAs, de 2 a 24%, em populações provenientes dos EUA e Europa. Com relação ao gene RB1, alguns estudos demonstram que 19-55% dos pacientes com LMA apresentaram diminuição ou ausência da proteína pRB, correlacionando-se em alguns casos com um pior prognóstico da doença. Com o objetivo de investigar a frequência de mutações de ponto nos genes p53 e RB1 em pacientes com LMA e LLA na população brasileira, amostras de DNA de 44 pacientes foram estudadas. Esses mesmos pacientes foram utilizados em estudo anterior para o rastreamento de mutações no oncogene *N-ras*. DNA genômico isolado de pacientes com LMA foi utilizado como molde para a reação de PCR, amplificando-se os exons 4 - 10 do gene p53 e exons 1 a 27, mais a região promotora, do gene RB1. Para o gene p53 utilizou-se o SSCP (single strand conformation polymorphism) como método de rastreamento de mutações e para o gene RB1, utilizou-se o sistema de CSGE (conformation-sensitive gel electrophoresis), o qual tem como princípio básico a detecção de heteroduplexes. Nenhuma mutação foi encontrada no gene RB1; entretanto, vários polimorfismos intrônicos foram observados, indicando que mutações no gene RB1 são um evento raro em leucemias agudas. Mutações no gene p53 foram identificadas em 5 dos 35 pacientes com LMA estudados (14,3%), frequência que se aproxima da relatada em outras populações. A sobrevida global dos pacientes com mutação no gene p53 mostrou-se significativamente menor que nos pacientes sem mutação.

SUMMARY

Inactivation of tumor suppressor genes, whose products exert an inhibitory influence on cell cycle progression, can lead to neoplastic transformation. In AML, the frequency of p53 gene mutations ranges from 4 to 15% and in ALL, from 2 to 24%, in populations from USA and Europe. In the RB1 gene, some reports indicated that 19-55% of AML patients presented low or absent levels of pRB, correlating in some cases with a poor prognosis of the disease. In an attempt to investigate the frequency of point mutations in p53 and RB1 genes in AML and ALL Brazilian patients, we studied DNA samples of 44 patients. These patients were previously investigated for the existence of *N-ras* gene mutations. Genomic DNA isolated from bone marrow aspirates was used as template for the PCR reaction by using oligonucleotide primers to amplify exons 4-10 of the p53 gene and exons 1-27 plus the promoter region of the RB1 gene. Single strand conformation polymorphism (SSCP) was used as the screening method for the p53 gene and conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) system, which is based on heteroduplexes detection, was used for the screening of the RB1 gene. In the samples studied, no point mutation was found in the coding sequence or in the promoter region of the RB1 gene; however, several intronic polymorphisms were identified, indicating that mutations in the RB1 gene are rare in acute leukemias. p53 mutations were identified in bone marrow DNA in 5 of the 35 AML patients (14,3%). This frequency of point mutations in the p53 gene in AML Brazilian patients is close to the results reported for European and North American populations. Also, the overall survival of patients with mutations in the p53 gene was significantly lower than for patients without mutations.

Introdução

A incidência de neoplasias tem aumentado em todas as populações, devido ao incremento no tempo de vida média, à redução da mortalidade por doenças infecciosas ou degenerativas crônicas e a melhores métodos diagnósticos. Nos Estados Unidos há 1,3 milhão de novos casos e 500.000 mortes a cada ano devido ao câncer. Num futuro próximo, as modalidades de tratamento para o câncer tendem a aumentar sua eficácia e especificidade, resultado de inovações tecnológicas, químicas e biológicas. Os avanços da biologia molecular tendem a apontar marcadores prognósticos que possivelmente irão prever quais tratamentos serão efetivos para um determinado tipo de tumor, o que levaria a uma individualização do tratamento. Dificilmente haverá uma terapia simples e universalmente eficaz para todos os tumores; ao contrário, a expectativa é de que existam várias terapias, mais específicas e menos tóxicas (Hellman, 1997).

O câncer resulta do acúmulo, no decorrer do tempo, de um conjunto de alterações genéticas celulares, processo conhecido como “Conceito dos Múltiplos Eventos” (Vogelstein & Kinzler, 1993). Uma vez que uma célula se torna neoplásica, sua evolução pode continuar para a malignização. Alterações genéticas subsequentes são requeridas para conferir propriedades metastáticas à célula tumoral, as quais incluem a habilidade para invadir os tecidos que circundam a célula, entrar na circulação, extravasar e colonizar um segundo sítio (Tlsty *et al*, 1995). O exemplo mais bem estudado é o do câncer de cólon, no qual diferentes genes sofrem mutações em associação com alterações pré-neoplásicas sucessivas no epitélio do intestino, desde o desenvolvimento de pólipos adenomatosos pequenos, a adenomas de tamanho maior e, finalmente, câncer invasivo (Vogelstein *et al*, 1988).

A expansão neoplásica pode resultar da ativação de mecanismos estimulatórios (proto-oncogenes) ou da inativação de mecanismos inibitórios (genes supressores de tumores). Os produtos proteicos de ambas as classes de genes regulam a entrada da célula no ciclo de divisão celular (Weinberg, 1991).

A divisão celular normal é positivamente regulada ou ativada por vias de transdução de sinais, as quais respondem à presença de fatores extracelulares que se ligam a receptores presentes na superfície da célula. Esta via se inicia dentro da membrana celular com as proteínas G, as quais podem se ligar tanto à guanosina trifosfato (GTP), que sinaliza a célula para dividir-se, ou à guanosina difosfato (GDP), que envia sinais à célula para que ela não se divida. As proteínas G por sua vez ativam proteínas quinases, que fosforilam tanto fatores de transcrição como outras proteínas que se ligam a fatores de transcrição, resultando na expressão de uma série de genes que levam a célula a se dividir (Figura 1).

Cada uma das proteínas envolvidas no controle positivo da divisão celular é codificada por um gene, e mutações específicas nesses genes podem contribuir para a divisão celular desregulada. Cópias normais desses genes são conhecidas como proto-oncogenes, os quais, quando sofrem mutações, transformam-se em oncogenes, agindo em um padrão dominante e ganhando uma nova função (Weinberg, 1991; Levine, 1995).

Essa mesma via de transdução de sinais é regulada negativamente pelos produtos de genes supressores de tumores. Mutações nesses genes resultam em perda de função, levando também à divisão celular desregulada. Os genes supressores de tumores mutados são recessivos, sendo necessárias mutações em

ambos os alelos para que haja a perda de função. Os produtos desses genes são necessários para a função celular normal e sua perda de atividade pode levar à formação de tumores. Os dois genes mais bem caracterizados dessa classe são os genes retinoblastoma (RB1) e p53, os quais parecem agir diretamente na regulação negativa da progressão das células através do ciclo celular (Levine, 1995; Lewin, 1994).

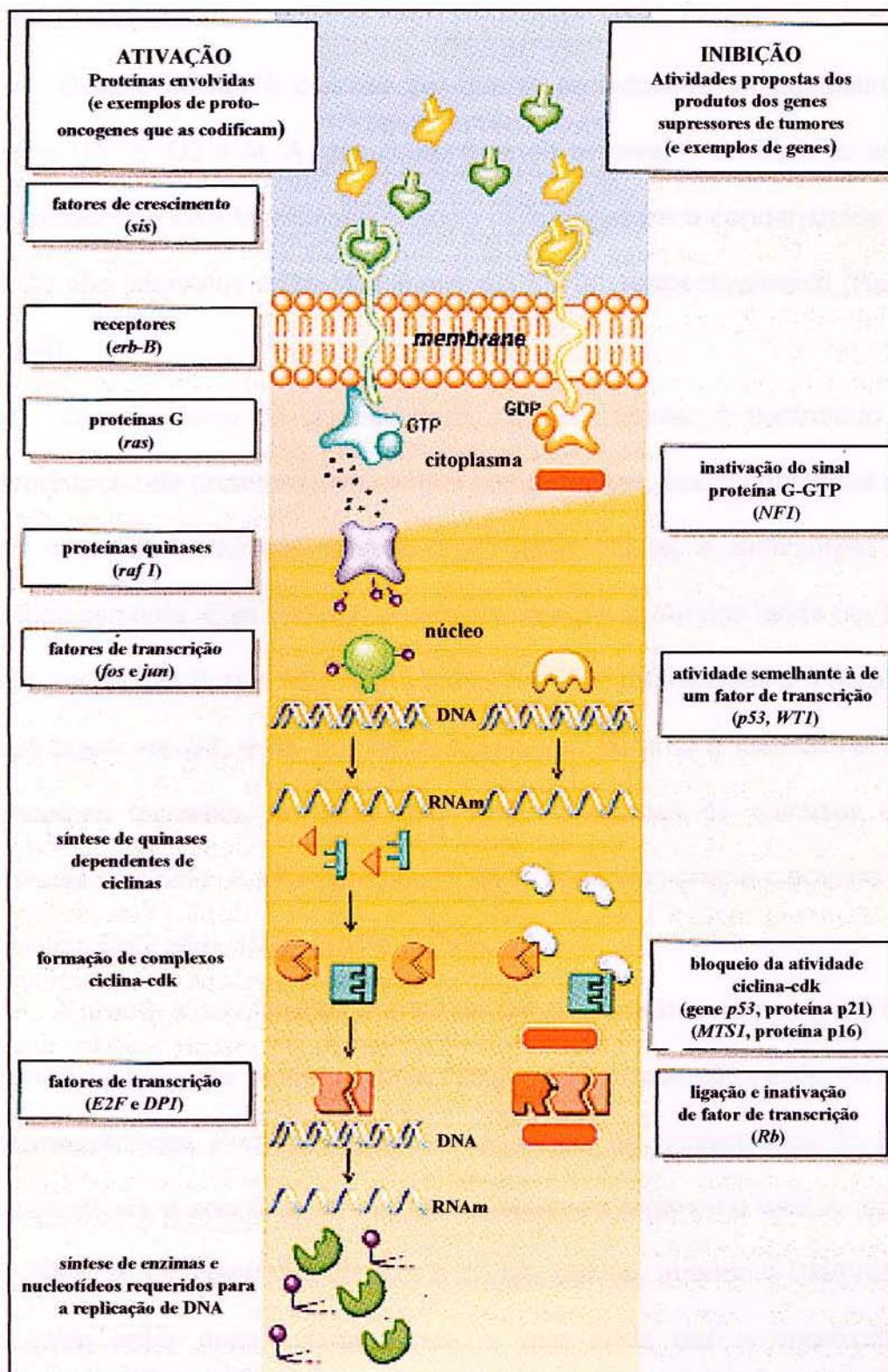


Figura 1. Esquema da via de transdução de sinais intracelular, a qual, estimulada por fatores de crescimento circulantes ou hormônios que se ligam a receptores na superfície da célula, regula a entrada da mesma no ciclo de divisão celular (Levine AJ. Scientific American Science & Medicine 1995;2: 29).

CICLO CELULAR

O ciclo celular é dividido em quatro períodos de tempo distintos, conhecidos como G1, S, G2 e M. A fase S, ou fase de síntese, é o momento em que o DNA é duplicado e a fase M (mitose), quando os cromossomos condensados se separam. G1 e G2 são intervalos entre M e S e entre S e M, respectivamente (Hartwell & Kastan, 1994).

O mecanismo de periodicidade no ciclo celular é controlado pela síntese e degradação de proteínas conhecidas como ciclinas, assim chamadas por aumentarem em quantidade durante uma fase do ciclo celular e diminuírem em outra fase, periodicamente. Elas são agrupadas em categorias denominadas por letras. Exemplos são as ciclinas B, que são acumuladas em G2 e degradadas em M, as ciclinas E e D, que agem em G2, e as ciclinas A, que agem durante a fase S. As ciclinas regulam proteínas quinases, as quais são então chamadas de quinases dependentes de ciclinas ou CDKs. A atividade de um dado complexo ciclina-cdk varia através do ciclo celular (Tlsty *et al*, 1995; Levine, 1995).

Durante a proliferação normal da célula, há três estágios onde a integridade do genoma pode estar comprometida, resultando em mutações espontâneas e alterações cromossômicas. Primeiro, erros na sequência de nucleotídeos do DNA estão mais susceptíveis a acontecerem na fase S, quando o genoma total é replicado antes da divisão celular. Segundo, durante a divisão celular, quando o DNA replicado deve ser dividido entre duas células filhas, o que pode dar a oportunidade para uma segregação cromossômica imprópria, resultando em número de cromossomos

anormal. Terceiro, os próprios mecanismos de reparo do DNA com lesões, podem dar a chance de ocorrerem erros na sequência de nucleotídeos do DNA (Tlsty *et al*, 1995).

É importante na progressão do ciclo celular que uma ordem seja obedecida, ou seja, que a replicação preceda a divisão e também que a replicação tenha sido concluída antes que a divisão comece. Esta ordem é garantida por mecanismos conhecidos como “checkpoints”, ou pontos de checagem, que avaliam onde a célula se encontra no seu ciclo. Há genes que controlam esses pontos, atrasando a progressão do ciclo celular, presumivelmente para permitir o reparo de erros que aconteceram durante a replicação do DNA ou da segregação cromossômica (Hartwell & Weinert, 1989).

Os três “checkpoints” mais bem definidos, as transições G1/S, fase S e G2/M são negativamente regulados em resposta a lesões no DNA. A progressão do ciclo celular pode ser retardada permitindo o reparo de lesões antes de entrar tanto na fase S como na fase M. Todas as células somáticas dispõem de uma variedade de tais “checkpoints” que monitoram o crescimento celular, a replicação do DNA e o reparo do DNA (Tlsty *et al*, 1995; Hartwell & Weinert, 1989).

Os genes supressores de tumores RB1 e p53, cujas estruturas e funções serão pormenorizadas a seguir, estão envolvidos em determinadas etapas do ciclo celular. A ação normal do gene RB1 é regular negativamente a entrada na fase S do ciclo celular, através da ligação a determinados fatores de transcrição os quais permanecem inativos. O gene p53 também é um regulador negativo do ciclo celular, agindo na transição de G1 para a fase S. Na sua ausência não há meios eficientes de parar o ciclo celular em resposta a lesões no DNA, o que aumentaria o risco de

desenvolvimento de câncer devido ao acúmulo de mutações deletérias (Levine, 1995; Weinberg, 1991).

GENE RETINOBLASTOMA (RB1)

Através do estudo de pacientes com retinoblastoma, tumor maligno infantil que afeta 1 em cada 20.000 nascidos vivos, Alfred Knudson em 1971 fez uma proposta sobre a existência dos genes supressores de tumores. Baseado na observação de 48 casos de retinoblastoma e de trabalhos publicados surgiu a hipótese de que o retinoblastoma seria um câncer causado por dois eventos mutacionais ("two-hit hypothesis"). Na forma hereditária da doença, uma mutação seria herdada através de células germinativas e a segunda ocorreria em células somáticas. Na forma não hereditária ou esporádica, ambas as mutações ocorreriam em células somáticas (Knudson, 1971). Essa hipótese foi posteriormente complementada por Comings, especificando que as duas mutações serviriam para inativar ambos os alelos de um único gene, o qual funcionava essencialmente para suprimir a formação do retinoblastoma: o gene RB1 (Comings, 1973).

Quarenta por cento dos casos de retinoblastoma são hereditários, obedecendo a um padrão de herança autossômica dominante com 90% de penetrância. O paciente desenvolve em geral 4 a 5 tumores, bilateralmente, que são diagnosticados por volta dos 15 meses de idade. Pacientes com a forma hereditária estão sob um risco maior que a população em geral de desenvolver neoplasias secundárias, particularmente sarcomas. Em contraste, a forma não hereditária é responsável por aproximadamente 60% dos casos. Os tumores são em geral unilaterais, unifocais e diagnosticados um

pouco mais tarde, com aproximadamente 27 meses de idade (Gallie *et al*, 1992; Cowell & Hogg, 1992).

Localização e estrutura

O gene candidato foi mapeado na região q14 do cromossomo 13 humano (Lalande *et al*, 1984). Uma vez que o defeito bioquímico primário no retinoblastoma era desconhecido, marcadores de DNA específicos para o cromossomo 13 e técnicas de clonagem foram utilizados para identificar o gene RB1 (Friend *et al*, 1986; Lee *et al*, 1987). O gene RB1 tem aproximadamente 200 Kb e é composto por 27 exons que variam de 31 a 1873 pb (Mc Gee *et al*, 1989). Os introns variam em tamanho de 80 a 70.500 pb e os exons estão dispostos em três grupos, separados pelos dois introns maiores (Figura 2). Nas células humanas, o gene codifica um RNA mensageiro de 4.7 Kb o qual é expresso na maioria dos tipos celulares estudados (McGee *et al*, 1989; Lee *et al*, 1988a). A deleção dos exons 13-17 é freqüentemente observada em vários tipos de tumores, incluindo retinoblastoma, câncer de mama e osteosarcoma e a presença de um sítio potencial para recombinação nessa região é investigada. Na região promotora do gene RB1 não há "TATA box" nem "CAAT box", os quais são tipicamente encontrados em promotores de eucariotos. Essa região, contudo, é rica em GC e tem características de ilha CpG (McGee *et al*, 1989; Cowell & Hogg, 1992).

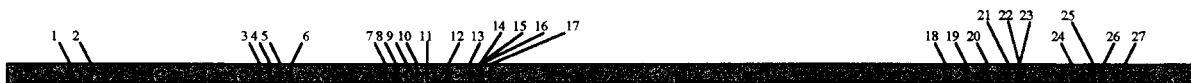


Figura 2. Estrutura do gene RB1. O gene RB1 contém 27 exons dispostos em aproximadamente 200 Kb e codifica um RNA mensageiro de 4,7 Kb (McGee TL, Yandell DW & Dryja TP. *Gene* 1989,80:121).

Proteína RB

O gene RB1 codifica uma fosfoproteína nuclear de 110 Kd (p110 RB) que consiste de 928 aminoácidos e está presente em todos os tecidos humanos examinados até o momento, com exceção de células tumorais nas quais o gene RB1 sofreu mutações (Horowitz *et al*, 1989; Horowitz *et al*, 1990). Nesses tecidos, a proteína pode ser anormal, não existente ou presente em quantidade reduzida. A atividade de muitas proteínas envolvidas na regulação do crescimento, incluindo a pRB, está relacionada, provavelmente, com o seu estado de fosforilação. Sugere-se que a função normal da pRB seja modulada por um mecanismo de fosforilação-desfosforilação e que a fosforilação da pRB seja responsável por sua inativação e conseqüente perda de sua capacidade de supressão (Goodrich *et al*, 1991, Riley *et al*, 1994). A primeira pista sobre a função da pRB veio a partir de estudos de alguns vírus indutores de tumores, como adenovírus, poliovírus e papilomavírus, os quais codificam proteínas que são potentes agentes transformantes quando testados em alguns ensaios oncogênicos. As oncoproteínas virais mais bem caracterizadas dos adenovírus são os produtos da região 1A, conhecidos como E1A. As regiões da E1A necessárias para sua atividade oncogênica correspondem precisamente às regiões

que permitem que ela se ligue a polipeptídeos celulares e uma das proteínas celulares que se ligam à E1A é a proteína pRB (Dyson & Harlow, 1995).

As proteínas E7 do papilomavírus humano e o antígeno T SV 40 ou antígeno “large T” são outras proteínas virais que interagem com a pRB. Assim como a E1A, mutações que destroem a ligação de proteínas virais à pRB também destroem a atividade transformante, estreitando a ligação entre a pRB e o processo de transformação. Uma vez que estudos de tumores humanos mostraram que a perda da pRB funcional estimula a proliferação celular, sugeriu-se que a interação de oncoproteínas virais com a pRB também poderia inativar sua função. Logo, a associação de proteínas virais à pRB mimetizaria a mutação no gene RB1 em células tumorais, promovendo a proliferação (De Caprio *et al*, 1988; Dyson *et al*, 1989). A região à qual as proteínas E1A, E7 e antígenos “large T” se ligam é conhecida como “pocket”, a qual é uma região alvo para mutações no gene RB1. De acordo com o modelo proposto em Sellers & Kaelin Jr (1997) a transformação seria induzida pelas proteínas E1A, E7 e antígeno “large T” através da interferência na função da pRB, talvez competindo com uma proteína celular normal (“X”) na ligação ao “pocket” na pRB. Do mesmo modo, mutações derivadas de tumores, assim como a fosforilação desregulada da pRB, bloqueariam a capacidade do “pocket” da pRB de se ligar à proteína “X”.

Complexo pRB/E2F como modelo de controle da proliferação

Técnicas de clonagem molecular têm sido utilizadas para identificar proteínas celulares que se ligam à pRB. Não se sabe quais interações realmente contribuem

para a supressão pela pRB, entretanto, o modelo mais bem compreendido é a interação da pRB com o fator de transcrição E2F, um fator de transcrição celular que interage com elementos específicos (sítios E2F) no promotor do gene do adenovírus E2. O fator E2F é, provavelmente, o resultado da atividade combinada de uma extensa família de genes, sendo eles: E2F-1, E2F-2, E2F-3, DP-1 e DP-2. A unidade básica do E2F parece ser um heterodímero composto por uma subunidade E2F e uma subunidade DP. No modelo pRB/E2F, a ligação da pRB ao E2F inibe a capacidade do E2F de ativar a transcrição através de elementos específicos de DNA. Sítios de ligação do E2F foram encontrados em vários genes cuja expressão está ligada à proliferação celular. A idéia de que a pRB possa suprimir a transcrição desses genes adapta-se perfeitamente à atividade da pRB como regulador negativo da proliferação celular, o que também pode explicar algumas das propriedades transformantes das oncoproteínas virais que se ligam à pRB. A ligação das proteínas virais à pRB liberaria a inibição transcripcional desses genes promovendo o crescimento celular. Além do E2F, propõe-se que a pRB se ligue a vários outros fatores de transcrição, incluindo c-myc, N-myc, elf 1, PU1, myo D e abl (Dyson & Harlow, 1995).

Regulação da interação pRB/E2F

A fosforilação da pRB parece ser responsável por pelo menos um nível de regulação. Nas células em divisão, o estado de fosforilação da pRB flutua através do ciclo celular. Em células que não estão em divisão e durante o início da fase G1 do ciclo celular, a pRB encontra-se não fosforilada ou pouco fosforilada e nesse estado ela pode ligar-se ao fator E2F. A fosforilação da pRB ocorre à medida que as células

entram na fase S e sugere-se que nesse momento a repressão do E2F seria liberada, permitindo a transcrição de genes envolvidos no processo de proliferação celular. Nesse modelo, a pRB é vista como um intérprete molecular, retransmitindo sinais gerados pela posição da célula no ciclo de divisão e coordenando eventos-chave na transcrição (Dyson & Harlow, 1995; Levine, 1995; Kouzarides, 1995).

Uma cascata de moléculas regulatórias age na transcrição através da regulação da interação pRB/E2F. Como visto anteriormente, a função da pRB é inativada pela fosforilação, assim como por mutações ou ligação de oncoproteínas virais. Desse modo, qualquer anormalidade que leve à uma fosforilação inapropriada da pRB teria o mesmo efeito funcional que uma mutação no que diz respeito à transformação maligna (Sherr, 1996; Sellers & Kaelin Jr, 1997).

Os complexos ciclina-cdk que estão ativos em G1 parecem desempenhar um papel crítico na fosforilação e conseqüentemente na inativação da pRB. Esses complexos consistem das ciclinas da classe D (D1, D2 e D3) ligadas tanto à cdk4 como à cdk6, ciclinas da classe E ligadas à cdk2 e ciclinas da classe A ligadas à cdk2. A presença das ciclinas D está ligada à exposição a fatores de crescimento. Elas podem ligar-se à pRB *in vitro* e *in vivo*, e quando superexpressas em células que contêm a pRB, podem induzir rapidamente a fosforilação da pRB e diminuir o intervalo G1. Contrariamente, a inibição da ciclina D leva à pausa do ciclo celular em G1. Conclui-se que o papel da ciclina D na regulação do ciclo celular é diretamente dependente da pRB (Sherr, 1996; Weinberg, 1995).

A amplificação do gene que codifica a ciclina D1, em particular, parece ter um papel na patogênese de alguns tipos de câncer, indicando que a super produção da

ciclina D1 resultaria na fosforilação constitutiva da pRB e conseqüentemente na atividade desregulada do E2F. Do mesmo modo, têm sido relatados casos de amplificação do gene que codifica a cdk4 em vários tipos de tumores, incluindo glioblastomas e sarcomas. Assim, tanto a ciclina D1 como a cdk4 agem como oncoproteínas, inativando a pRB (Hall & Peters, 1996; Khatib *et al*, 1993; He *et al*, 1994).

As atividades enzimáticas dos complexos ciclina/cdk são controladas por moléculas conhecidas como inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs). Há duas classes de CKIs, sendo uma delas constituída pelas proteínas p15, p16, p17 e p18, que inibem especificamente a atividade da ciclina-quinase tipo D, e a outra, constituída pelas proteínas p21, p27 e p57, que inibem todos os complexos ciclina/cdk da fase G1 (Sherr & Roberts, 1995; Sellers & Kaelin Jr, 1997).

Destas, a mais importante é a p16, que foi clonada como proteína de ligação à ciclina D e como gene supressor de tumores de melanoma (MTS-1). Quando produzida em excesso, a p16 inibe a atividade da ciclina quinase D, resultando no acúmulo da pRB não fosforilada e pausa na fase G1. Logo, a pRB é um alvo crítico da ação da p16. O gene p15 (MTS-2) está localizado próximo ao gene p16 no cromossomo 9 e também pode inibir a atividade da ciclina tipo D proporcionando a pausa em G1 (Koh *et al*, 1995; Sherr & Roberts, 1995; Sellers & Kaelin Jr, 1997).

Como pode ser observado, os produtos de dois oncogenes (ciclina D1 e cdk4) e de dois genes supressores de tumores (pRB e p16) parecem estar funcionalmente ligados em uma via que converge na regulação transcripcional de genes dependentes do E2F. Uma das funções dessa via parece ser a regulação de um ponto crítico em

G1, quando deve ser tomada a decisão de entrar na fase S. A frequência com a qual os componentes dessa via são alterados em tumores sugere que a desregulação dessa via pode ser um pré-requisito para a carcinogênese humana (Sellers & Kaelin Jr, 1997) (Figura 3).

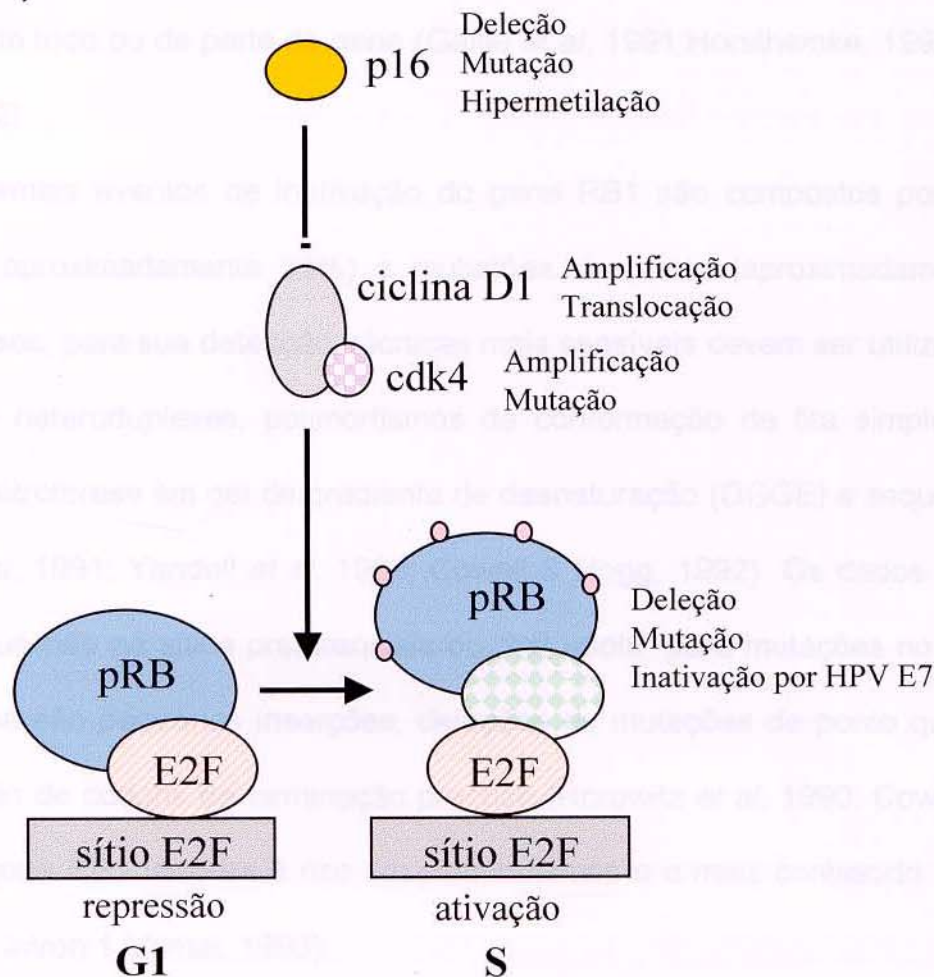


Figura 3. Modelo da interação pRB-E2F, onde as ciclinas D1 e cdk4 podem mediar a fosforilação e, conseqüentemente, a inativação funcional da pRB. Em células que não estão em divisão e durante o início da fase G1 do ciclo celular, a pRB encontra-se não fosforilada ou pouco fosforilada e nesse estado ela pode ligar-se ao fator E2F. A fosforilação da pRB ocorre à medida que as células entram na fase S e sugere-se que nesse momento a repressão do E2F seria liberada, permitindo a transcrição de genes envolvidos no processo de proliferação celular. A proteína p16 pode inibir a atividade enzimática dos complexos ciclina D-cdk4, impedindo a fosforilação da pRB (Sellers WR & Kaelin Jr WG. J. Clin. Oncol. 1997;15:3304).

Mutações no gene RB1

Dados derivados, na sua maioria, de análises empregando o método de “Southern Blot” indicam anormalidades estruturais no gene RB1 em 12 a 30% dos tumores hereditários e esporádicos. A maioria dos casos é de deficiência gênica (deleção) de todo ou de parte do gene (Gallie *et al*, 1991; Horsthemke, 1992; Cowell & Hogg, 1992).

Os demais eventos de inativação do gene RB1 são compostos por pequenas deleções (aproximadamente 35%) e mutações de ponto (aproximadamente 50%). Nesses casos, para sua detecção, técnicas mais sensíveis devem ser utilizadas, como análise de heteroduplexes, polimorfismos de conformação de fita simples de DNA (SSCP), eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) e sequenciamento (Sakai *et al*, 1991; Yandell *et al*, 1989; Cowell & Hogg, 1992). Os dados disponíveis mostram que não há sítios preferenciais ou “hot spots” para mutações no gene RB1, cuja maioria são pequenas inserções, deleções ou mutações de ponto que resultam na formação de codons de terminação precoce (Horowitz *et al*, 1990; Cowell & Hogg, 1992). O gene RB1 também é rico em polimorfismos e o mais conhecido é o sítio de *Bam HI* no intron 1 (Jamal, 1996).

Mutações no gene RB1 foram observadas em outros tumores além do retinoblastoma, incluindo osteosarcomas, carcinoma de bexiga, de próstata, de mama, de pulmão e leucemias (Friend *et al*, 1986; Feugeas *et al*, 1996, Horowitz *et al*, 1990; Bookstein *et al*, 1990; Lee *et al*, 1988b; Pietiläinen *et al*, 1995; Yokota *et al*, 1988; Murakami *et al*, 1991; Jamal *et al*, 1996; Jamal, 1996). Como nos retinoblastomas,

todas essas mutações levam tanto à perda de expressão da proteína pRB como à produção de uma proteína não funcional.

Mutações no gene RB1 em leucemias

O processo normal de hematopoese é controlado pela harmonia entre a auto-renovação balanceada, diferenciação e morte celular programada ou apoptose. Eventos que levem a um desequilíbrio desse processo resultariam na leucemogênese após seleção clonal e expansão de uma célula progenitora hematopoética anormal. Devido a uma série de mutações em oncogenes e genes supressores de tumores, o clone celular maligno parece perder a capacidade de controlar o crescimento celular.

Alterações no gene RB1 podem levar à inativação da proteína pRB. O papel dessas alterações na patogênese das leucemias não está elucidado, apesar de haver fortes evidências indicando que a inativação da pRB possa ser um evento freqüente nesse tipo de neoplasia, estando correlacionada com a evolução da doença e o prognóstico do paciente (Cline, 1994; Jamal, 1996; Hijiya & Gewirtz, 1995).

Uma importante evidência sobre o papel da pRB na hematopoese veio de estudos de “knockout” no gene RB1. Camundongos homozigotos para uma mutação no exon 20 do gene RB1 (RB1 $-/-$) morreram antes do 16º dia de gestação e apresentaram uma interrupção na maturação da linhagem eritróide, além de ausência de diferenciação neuronal e apoptose (Lee *et al*, 1992).

Não são freqüentes os relatos de alterações estruturais no gene RB1 em leucemias, mas alguns dados relativos à presença de rearranjos e grandes deleções no gene RB1 com a utilização da técnica de “Southern blot” sugerem que tais eventos

sejam raros nessa patologia. O estudo realizado por Chen e colaboradores (1990) relata que grandes deleções no gene RB1 foram encontradas em uma porcentagem pequena de pacientes com leucemias primárias. Cheng *et al* (1990) também observaram que apenas 1 de 13 linhagens humanas de leucemia apresentava deleção parcial em homozigose dos exons 18 a 27 do gene RB1. Dados semelhantes foram observados em outro estudo, onde, através de “Southern blot”, não foram detectados grandes rearranjos em 106 pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA). No entanto, foram observados vários polimorfismos (Jamal *et al*, 1996). Contrariamente, Ahuja e colaboradores (1991) estudaram 215 casos de leucemias e linfomas de fenótipos diversos e 15 linhagens celulares de leucemias, e encontraram anormalidades estruturais no gene RB1 em 26 pacientes e 8 de 15 linhagens celulares. Em todos os casos estudados por “immunoblotting” e que apresentavam o gene RB1 estruturalmente alterado não foi possível detectar a proteína pRB. Essas informações ratificam a necessidade de novas análises e, principalmente, de rastreamento de mutações de ponto com a utilização de técnicas mais sensíveis, uma vez que há poucos dados relativos à existência de tais alterações no gene RB1 em leucemias agudas (Jamal, 1996).

Já com relação à expressão da pRB, os dados na literatura são mais freqüentes. Apesar de alguns grupos não terem encontrado correlação entre níveis baixos ou ausentes da pRB e resposta ao tratamento ou evolução clínica da doença (Preudhomme *et al*, 1994; Tang *et al*, 1992; Jamal *et al*, 1996), a maioria dos autores sugere a existência de associação entre alterações na expressão da pRB e mau prognóstico em leucemias agudas (Tang *et al*, 1992; Zhu *et al*, 1994; Ginsberg *et al*,

1991; Kornblau *et al*, 1992; Weide *et al*, 1993; Kornblau *et al*, 1994; Sauerbrey *et al*, 1996; Ahuja *et al*, 1991). Nesses estudos, a frequência de ausência ou diminuição da expressão da pRB varia entre 19-55% dos pacientes analisados com LMA.

No trabalho realizado por Tang e colaboradores (1992) 28% (5 em 18) dos pacientes com leucemia mielóide aguda e nenhum (0 em 7) dos com leucemia linfóide aguda (LLA) apresentaram expressão alterada da pRB. As análises por “Southern blot” indicaram que não havia alterações grosseiras no gene. Nesse estudo não houve associação entre prognóstico clínico e alteração na expressão da proteína. O estudo de Jamal *et al* (1996) envolvendo 86 casos de LMA revelou que 20 casos (23%) mostravam níveis não detectáveis da pRB e a análise por “Southern blot” não detectou rearranjos grosseiros no gene. Também nesse caso, não houve diferença significativa na frequência de alcance da remissão completa ou do tempo de sobrevida entre os pacientes com níveis normais ou não da pRB.

Já outros trabalhos demonstram correlação entre alteração na expressão da pRB e evolução clínica, como o de Kornblau *et al* (1994) que analisaram 113 pacientes com LMA e detectaram níveis da pRB mais baixos que o normal em células de 22 pacientes (19%). A sobrevida média desses pacientes foi significativamente menor do que a observada em pacientes com níveis normais ou elevados da proteína, 12 semanas versus 40 semanas ($p=0,02$). Também a frequência de indução da remissão foi de 36% em pacientes com níveis baixos da proteína se comparado com 68% no outro grupo ($p = 0,01$). Um outro estudo realizado pelo mesmo grupo, em 43 pacientes com LMA, mostrou níveis baixos da pRB em 13 amostras (30%) através de técnicas de “Western blot” e análise imunoquímica. Dentre os 20 pacientes recentemente

diagnosticados, a média de sobrevida foi de 39 dias para aqueles com níveis baixos de expressão da pRB, comparada com 333 dias para aqueles com altos níveis de expressão da pRB ($p \leq 0,02$) (Kornblau *et al*, 1992). Weide *et al* (1993) observaram níveis ausentes ou diminuídos da pRB em 11 de 20 pacientes estudados com leucemias mielomonocíticas e monoblásticas. Tal fato foi correlacionado com aumento na contagem de leucócitos e ocorrência de leucemia extramedular. Também o estudo realizado por Ginsberg e colaboradores (1991) sugere que a inativação do gene RB1 pode estar associada a um largo espectro de neoplasmas linfóides e que a perda da função supressora do gene RB1 poderia influenciar na patogênese e progressão de linfomas e leucemias. Em 1996, Sauerbrey *et al* observaram que a baixa expressão da pRB parece indicar prognóstico não favorável nas LLAs infantis, tanto nas recentemente diagnosticadas como em recaída. Relataram também que a expressão da pRB nas recaídas de LLA é significativamente menor que ao diagnóstico. O grupo de Ahuja, em 1991, relatou que anormalidades estruturais no gene RB1 com ausência de expressão da pRB foram freqüentes em todos os tipos de leucemia aguda, mas particularmente comuns nas leucemias mielóides de subtipos M4 e M5 com diferenciação monocítica (incidência de 27%) e em leucemias positivas para o cromossomo Philadelphia de fenótipo linfóide (incidência de 11 a 29%), o que sugere o possível envolvimento do gene RB1 na evolução das leucemias agudas humanas.

Dada a discordância existente entre os dados referentes à expressão da pRB e à existência de rearranjos, grandes deleções ou mutações de ponto no gene RB1, faz-se necessário o rastreamento de mutações de ponto neste gene a fim de que se

chegue mais próximo da elucidação do papel do mesmo no processo de leucemogênese.

GENE p53

As origens da descoberta do gene p53 são provenientes de estudos bioquímicos realizados em 1979, nos quais foi observado que uma proteína de 53 kD (p53) poderia ser imunoprecipitada juntamente com um antígeno tumorigênico viral, o antígeno T SV 40. Posteriormente mostrou-se que a p53, localizada em grande parte no núcleo celular, também era capaz de ligação a outras proteínas virais, como o antígeno E1B do adenovírus tipo 5, o antígeno 5 nuclear do vírus Epstein-Barr e o antígeno E6 do vírus do papiloma humano (Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979; Diamandis, 1995). A ligação da p53 a proteínas virais forneceu a primeira pista sobre sua importância, pois a inativação pela ligação a essas proteínas, permitiria que a célula entrasse em uma via que levaria à tumorigênese induzida por vírus. Subseqüentemente, vários clones de DNA do gene p53 foram isolados e observou-se que os mesmos eram capazes de imortalizar células de curta duração (Jenkins *et al*, 1984) e de cooperar com o oncogene *ras* na transformação de células em cultura (Parada *et al*, 1984).

Estes fatos levaram o gene p53 a ser considerado um oncogene. Somente em 1989 descobriu-se que todos os clones do p53 analisados eram mutantes, além de observar-se que a sua forma normal era capaz de suprimir a transformação celular iniciada por outros oncogenes. A partir de então, o gene p53 foi denominado um gene

supressor de tumores. Mutações de ponto e/ou deleções no mesmo são comuns em mais de 50% das neoplasias humanas (Fung & Fisher, 1995; Bosari & Viale, 1995).

Localização e estrutura

O gene p53 humano está localizado no cromossomo 17p13 e é um dos alvos mais freqüentes para alterações em tumores humanos (Hollstein *et al*, 1991). É extremamente conservado em diversos organismos como Xenopus laevis, aves, camundongos e humanos, sugerindo que a proteína codificada desempenhe um papel crítico na célula (Prokocimer & Rotter, 1994). O gene compreende 20 Kb de DNA, consistindo de 11 exons, sendo que o primeiro não é codificador e encontra-se separado do grupo de 10 exons por um intron de 10 Kb (Lamb & Crawford, 1986). Os exons 2, 4, 5, 7 e 8 codificam 5 grupos de seqüências de aminoácidos muito conservados durante a evolução (domínios conservados I - V), localizados entre os resíduos 13 e 19, 117 e 142, 171 e 181, 236 e 258 e 270 e 288, respectivamente. O RNA mensageiro tem 2,6 Kb e contém uma grande região não codificadora 3' que provavelmente está envolvida na estabilização da molécula (Prokocimer & Rotter, 1994).

Proteína p53

A proteína p53, com 53 kD, tem 393 aminoácidos e pode ser subdividida funcionalmente em quatro unidades distintas e separáveis: um domínio de transativação nos resíduos 1-43; um domínio de ligação ao DNA nos resíduos 100-300; um domínio de oligomerização nos resíduos 320-360 e um domínio de localização nuclear

com atividade de ligação ao DNA não específica entre os resíduos 330-393 (Lee & Bernstein, 1995). A análise da estrutura da p53 por cristalografia confirma que a região central, aproximadamente entre os codons 100 e 300 está diretamente envolvida no contato com DNA em vários pontos específicos, incluindo os codons 248 e 273, ambos sítios preferenciais para mutações. A ligação ao DNA mostrou-se dependente da integridade do terminal C e o terminal ácido N contém a região ativa de transcrição (Elledge & Lee, 1995; Prokocimer & Rotter, 1994) (Figura 4).

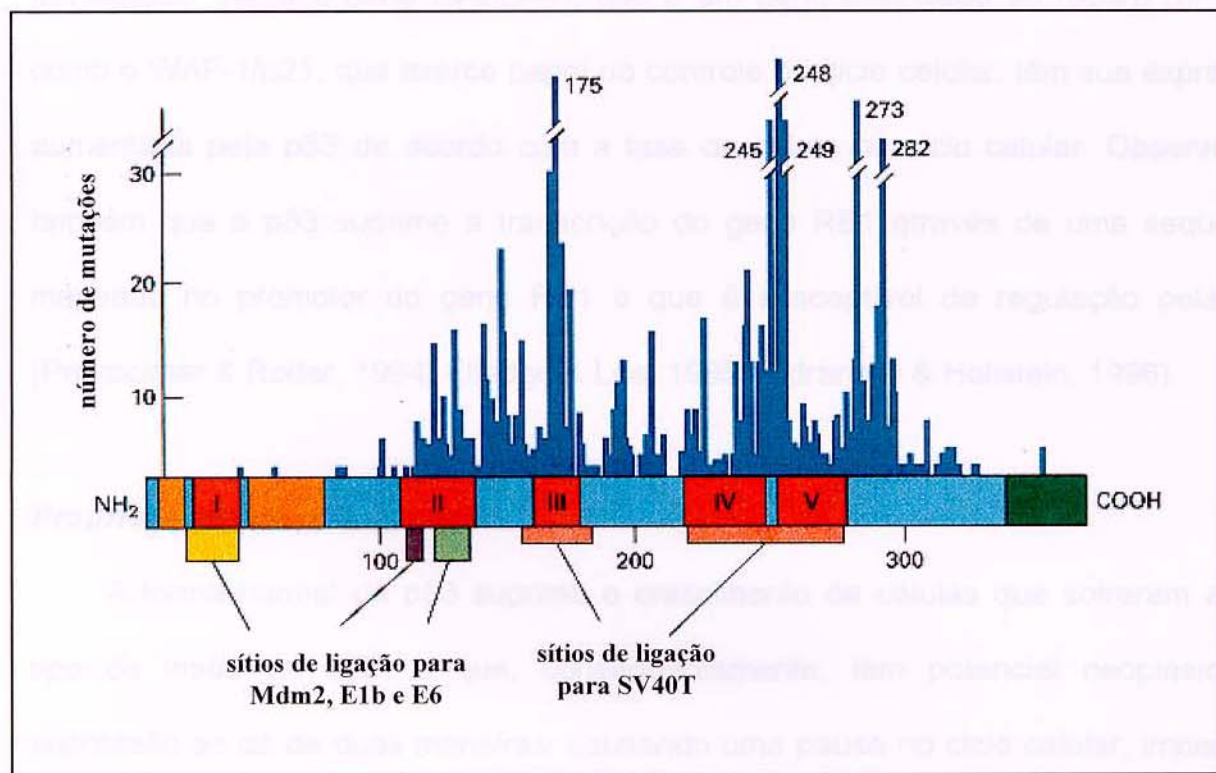


Figura 4. Mutações presentes em tumores humanos que inativam a função da proteína p53. Os sítios preferenciais para mutações são evidentes em sítios como o aminoácido 248. A porção central da proteína é requerida para a ligação do DNA e a maioria das mutações elimina essa capacidade de ligação. O mapa estrutural da proteína inclui 5 domínios evolutivamente conservados (vermelho), regiões de transativação (laranja) e uma região de oligomerização (verde). A proteína Mdm2 se liga ao sítio indicado e inativa a p53. Proteínas virais também a inativam ligando-se aos sítios indicados (E1b - adenovírus tipo 5 e E6 - papilomavírus) (Harris CC. Science 1993;262:1980).

A p53 é um fator de transcrição e seu domínio transcripcional está mapeado nos 40 primeiros aminoácidos da posição N-terminal. Vários genes são possíveis alvos específicos para a proteína p53. Em alguns deles, como c-fos e c-jun, a p53 diminui a expressão gênica. Em outros, como MCK e mdm2, a p53 aumenta a expressão gênica. A p53 também regula negativamente a transcrição de genes com promotores iniciados por sequência TATA, provavelmente, se ligando a proteínas da maquinaria basal de transcrição. Tanto o gene GADD-45, que é um gene associado ao reparo de DNA, como o WAF-1/p21, que exerce papel no controle do ciclo celular, têm sua expressão aumentada pela p53 de acordo com a fase da célula no ciclo celular. Observou-se também que a p53 suprime a transcrição do gene RB1 através de uma sequência mapeada no promotor do gene RB1 e que é susceptível de regulação pela p53 (Prokocimer & Rotter, 1994; Elledge & Lee, 1995; Sidransky & Hollstein, 1996).

Propriedades da p53 normal

A forma normal da p53 suprime o crescimento de células que sofreram algum tipo de lesão de DNA e que, conseqüentemente, têm potencial neoplásico. A supressão se dá de duas maneiras: causando uma pausa no ciclo celular, impedindo a transição das células da fase G1 para a fase S, ou promovendo a saída da célula por completo do ciclo celular (morte celular programada ou apoptose) (Figura 5). Desse modo, tanto a integridade genômica pode ser restaurada pelo reparo do DNA através de uma parada transitória do ciclo celular ou, quando a lesão persiste, as células podem ser permanentemente eliminadas da população por apoptose (Diamandis , 1995). Essas funções regulatórias são provavelmente mediadas por

interações da proteína p53 com seqüências específicas de DNA, o que pode permitir a regulação transcricional de outros genes ou, talvez, através do início da replicação do DNA. Alguns genes importantes na supressão do crescimento mediada pela p53 e que são seus alvos diretos incluem: GADD45, mdm-2 e WAF1/Cip1 (Chang *et al*, 1995).

Durante a fase G1, as ciclinas E e D são acumuladas e formam complexos com as cdk2 e cdk4 recentemente sintetizadas, respectivamente. Com o aumento dos complexos ciclina-cdk, ocorre a fosforilação da pRB, ativando os fatores de transcrição E2F-DP1 e, conseqüentemente, resultando na expressão de genes da fase S (Levine, 1995) (Figura 6).

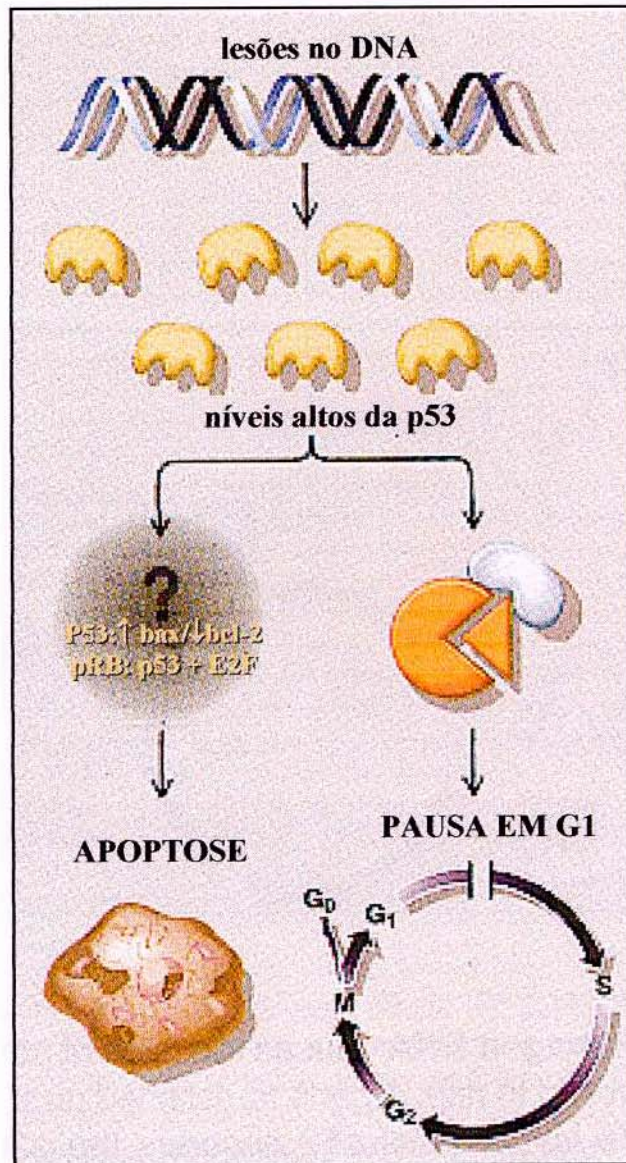


Figura 5. Mecanismos de supressão de tumores devido à presença de lesões no DNA. Os níveis da p53 elevam-se na existência de lesões no DNA e suprimem a formação de tumores de duas maneiras. Eles iniciam a apoptose por intermédio de mecanismos ainda não bem compreendidos (ativação da expressão do gene bax e concomitante diminuição da produção do gene bcl-2 pela p53 ou através da cooperação da p53 com o fator de transcrição E2F, agindo, provavelmente, na via dependente da pRB) ou fazem com que a célula permaneça na fase G₁ do ciclo celular induzindo a formação de proteínas que se ligam a quinases dependentes de ciclinas (modificado de: Levine AJ. Scientific American Science & Medicine 1995;2:34).

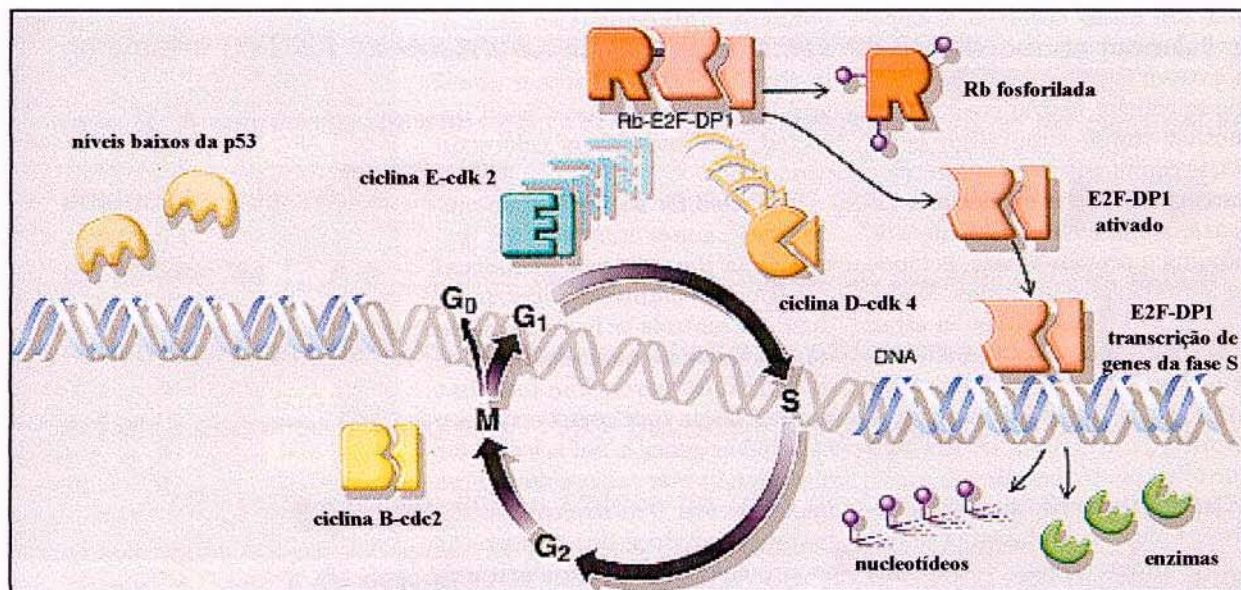


Figura 6. Esquema de funcionamento do ciclo celular na ausência de lesões no DNA. Durante a fase G1, as ciclinas E e D acumulam e formam complexos com as cdk2 e cdk4 recentemente sintetizadas, respectivamente. Como os níveis desses complexos ciclina-cdk aumentam, a pRB é fosforilada, ativando o fator de transcrição E2F-DP1 e resultando na expressão de genes da fase S (Levine AJ. Scientific American Science & Medicine 1995;2:32).

Interrupção do ciclo celular

Quando ocorre uma lesão no DNA, há um acúmulo da p53 que, por sua vez, promove a expressão de um outro gene, WAF1/Cip1. O produto desse gene é a proteína p21, que se liga ao complexo ciclina/quinases dependentes de ciclinas (CDK), inibindo sua atividade e impedindo a fosforilação da proteína pRB. A pRB não fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F requerido na produção da maquinaria de síntese de DNA, bloqueando o ciclo celular antes da passagem da fase G1 para a fase S. A regulação da transição G1/S é um “checkpoint” crítico no ciclo celular e é potencialmente inibido pela p21. Dessa maneira, o ciclo celular é interrompido antes da síntese de DNA e a célula tem a oportunidade de reparar o DNA lesado. Se o reparo não ocorre de forma correta, a presença da p53 normal pode, alternativamente, induzir a apoptose (Chang *et al*, 1995; Sidransky & Hollstein, 1996) (Figura 7).

A p21 pode interferir com a síntese de DNA diretamente, através da ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA ou “proliferating cell nuclear antigen”), fator essencial na replicação do DNA ou impedindo que o PCNA ative a DNA polimerase delta, uma das principais polimerases. Logo, se a lesão no DNA ocorrer antes da fase S, a WAF1/Cip1 impede as células de começar a replicação do DNA inibindo os complexos ciclina-CDK, enquanto que, se o DNA é lesado durante a fase S, a WAF1/Cip1 é capaz de parar o processo de replicação ligando-se ao PCNA (Chang *et al*, 1995).

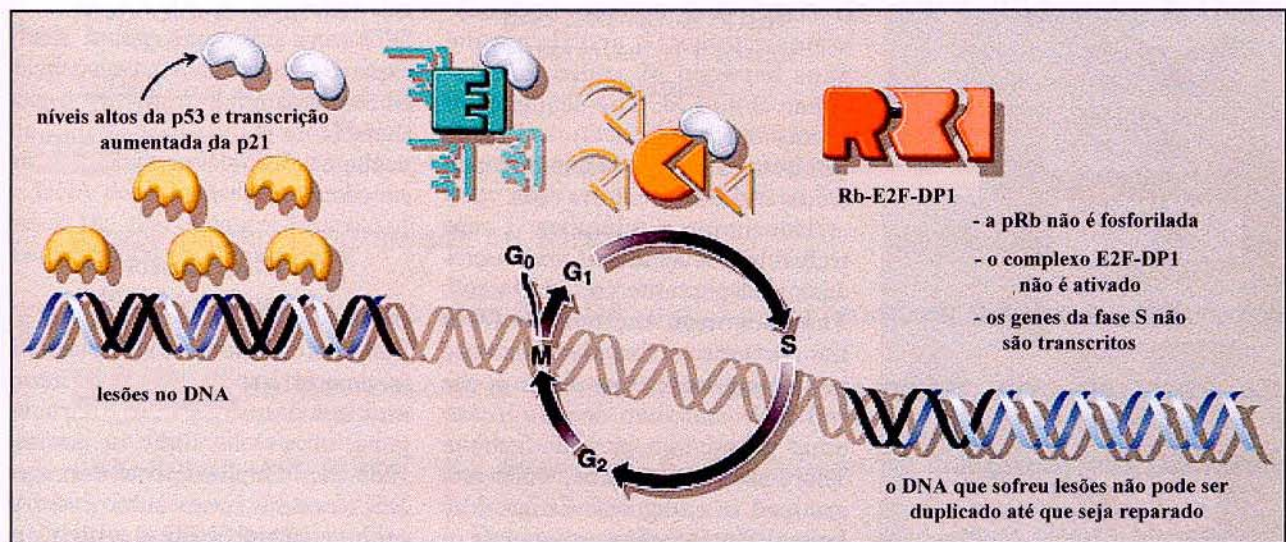


Figura 7. Esquema de funcionamento do ciclo celular na presença de lesões no DNA. As lesões no DNA fazem com que o nível da p53 aumente. Um gene transcrito sob a influência da p53 codifica a proteína p21, a qual, através da ligação a quinases dependentes de ciclinas, bloqueia a fosforilação da pRB. O reparo das lesões no DNA faz com que os níveis da p53 e da p21 voltem ao normal (Levine AJ. Scientific American Science & Medicine 1995;2:33).

Um segundo gene sob o controle da transcrição pela p53 e que afeta a cinética do ciclo celular é o GADD45 (growth arrest DNA damage), o qual codifica uma proteína que também inibe a síntese de DNA ligando-se ao PCNA. O proto-oncogene mdm-2 é mais um dos genes que têm sítios para ligação da p53 e contribui para o controle do ciclo celular. A proteína mdm-2 se liga ao domínio promotor da transcrição no terminal N da p53, inibindo sua atividade. Há ainda outros genes regulados pela p53 que não afetam diretamente a resposta ao crescimento, mas que modulam a resposta a agentes terapêuticos, como é o caso do mdr-1 (Sidransky & Hollstein, 1996).

Morte celular programada ou apoptose

Como resposta a lesões no DNA, a p53 pode promover a saída do ciclo celular e desintegração cromossômica por um processo enzimático ativo de morte celular (apoptose), cujo mecanismo ainda não é completamente compreendido (Sidransky & Hollstein, 1996).

A apoptose é uma via única de morte celular, também descrita como suicídio celular. Durante a apoptose, as células diminuem o volume, o citoesqueleto se quebra, os cromossomos se condensam e, finalmente, o DNA é clivado em pequenos fragmentos de 200 pb. A indução da apoptose em células de mamíferos não ocorre apenas como parte integral do processo de desenvolvimento, mas também como resposta ao estímulo por esteróides, infecção viral e exposição à carcinógenos ambientais. Muitas células de mamíferos entram em apoptose após exposição a doses baixas de radiação γ (Lee & Bernstein, 1995).

A regulação da apoptose pode ser feita por um reostato celular envolvendo um balanço entre os produtos dos genes bcl-2 e bax. A p53 pode agir diretamente nessa decisão através da ativação da expressão do gene bax e concomitante diminuição da produção do bcl-2. A mudança da proporção bax:bcl-2 predispõe a célula à apoptose. A cooperação da p53 com E2F também pode ser importante na apoptose, agindo, provavelmente, na via dependente da pRB.

A via de apoptose dependente da p53 pode regular o crescimento de células tumorais de maneira crítica: células sem a pRB entram em apoptose sob influência da p53, enquanto que a perda subsequente da p53 permite o aparecimento de tumores agressivos e de proliferação rápida. Alguns tumores que perderam a p53 ou em que o gene p53 sofreu mutações tornaram-se resistentes à radioterapia, provavelmente, porque eles não mais entram em apoptose, de maneira que a escolha da terapia a ser empregada depende da situação da p53. A sobrevivência da célula é, portanto, função do nível de lesão do DNA, eficiência do reparo do DNA e mudanças genéticas na célula-alvo tais como o acúmulo do E2F ou perda do gene RB e níveis da p53 (Cox & Lane, 1995).

A escolha da via a ser utilizada pela célula, se interrupção do ciclo celular ou apoptose é uma incógnita, sugerindo-se que o nível e a persistência da lesão no DNA influenciem na escolha da mesma. Na ausência da p53 funcional, a seleção de células que carregam DNA alterado é favorável. Em células que expressam a p53 mutante ou naquelas em que a p53 está ausente, a p53 não exerce suas funções normais. Sob essas circunstâncias, as células não param na fase G1 para permitir o reparo do DNA e nem entram na via de apoptose, permitindo, conseqüentemente, que as células

entrem na fase S ou fase de replicação do DNA portando lesões. O acúmulo de DNA alterado pode levar à aquisição do fenótipo maligno (Chang *et al*, 1995; Fung & Fisher, 1995).

Mutações no gene p53

As mutações no gene p53 em neoplasias estão distribuídas ao longo do gene e são, na sua maioria, mutações “missense”, levando à substituição de aminoácidos na proteína normal. Ocorrem predominantemente nos exons 5 a 8, mas também têm sido descritas no exon 4, em geral em células da linhagem germinativa de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada por um risco elevado de câncer de mama precoce, sarcomas na infância e outras neoplasias. As mutações geralmente conduzem à síntese de proteína mutante com estabilidade celular muito aumentada, que se acumula dentro da célula e alcança níveis de 10 a 100 vezes maiores que o da proteína normal e com meia-vida que sofre um incremento de minutos para horas (Diamandis, 1995).

O espectro de mutações no gene p53 está relacionado com a etiologia e patogênese do câncer. A exposição à luz ultravioleta, por exemplo, está correlacionada com mutações do tipo transição em sítios de dipirimidina, isto é, CC para TT. A exposição à aflatoxina B1 está correlacionada com transversões G:C para T:A, que levam à substituição de uma serina no codon 249 em carcinoma de fígado, e a exposição à fumaça do cigarro está correlacionada com transversões G:C para T:A em câncer de pulmão, esôfago e cabeça e pescoço (Hollstein *et al*, 1991; Chang *et al*, 1995). Sugere-se que o conhecimento do sítio e natureza das mutações em alguns

tumores seja importante na eliminação de certos agentes possíveis causadores do tumor e que possam ajudar a identificar certos carcinógenos, possibilitando a definição de mecanismos responsáveis por lesões genéticas no DNA (Chang *et al*, 1995).

Como consequência da perda da função supressora da p53, quimio/radio resistência ou pela aquisição de propriedades oncogênicas observadas em células contendo o gene p53 mutante, a presença de mutações tem sido associada com pior prognóstico em alguns tumores, incluindo tumores cerebrais, câncer de bexiga, de mama, de estômago, cabeça e pescoço, melanomas, câncer de ovário, de próstata, de tireóide e tumor de Wilms (Velculescu & El-Deiry, 1996). Também foi observada associação entre presença de mutações no p53 e diminuição da sobrevida em pacientes com vários tipos de neoplasias, agindo como fator prognóstico independente.

Kovach e colaboradores (1996) estudaram pacientes com câncer de mama e concluíram que mutações no gene p53 estão associadas a pior prognóstico. Essa associação pode ser devido ao aumento da capacidade de proliferação das células tumorais com a proteína p53 mutante e/ou pela maior resistência de tais células à inibição do crescimento por agentes quimioterapêuticos. Outro tipo de câncer, o carcinoma coloretal, que parece originar-se a partir de um adenoma, apresenta alterações no gene p53, as quais, sugere-se, estariam envolvidas justamente na transformação do adenoma para o carcinoma focal (Ohue *et al*, 1994). Estudo realizado por McManus e colaboradores, em 1994, confirma dados prévios associando mutações no gene p53 ao desenvolvimento do câncer de ovário. Os dados sugerem

que a mutação no p53 possa ocorrer na transição do início da malignização para a invasividade, antes da metástase, em alguns cânceres de ovário. Essa investigação demonstra a associação entre a expressão da p53, mutação e deleção alélica no câncer de ovário.

Outros dados consistentes têm correlacionado a perda de função da p53 com diminuição da sobrevida em pacientes com carcinoma de pulmão: a presença de uma mutação do tipo “missense” no tumor (ou aumento da expressão da proteína como indicativo de mutação) é um fator prognóstico independente e desfavorável (Quinlan *et al*, 1992).

Mutações no gene p53 em leucemias

As mutações no gene p53 são mais freqüentes em crises blásticas na linhagem mielóide (leucemia mielóide crônica (LMC) e leucemia mielóide aguda) que na linhagem linfóide (leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia linfóide aguda) (Imamura *et al*, 1994). Essas mutações estão freqüentemente associadas a alterações no cromossomo 17, em LMC, síndrome mielodisplásica (MDS) e LMA. Em geral, um dos braços curtos do cromossomo 17 (17p) é perdido, ou por formação de um isocromossomo 17q [i(17q)] ou por translocação não balanceada. Parece não haver efeitos adversos dessas anormalidades cromossômicas na sobrevida dos pacientes; entretanto, vários estudos mostram que alterações no gene p53 são indicadoras de mau prognóstico nas leucemias (Guinn & Padua, 1997; Imamura *et al*, 1994).

Aproximadamente 3% dos pacientes com LLA são portadores de alterações no gene p53, que variam com a severidade do subtipo da doença. É o caso da LLA L3 e

da LLA-T em recaída, onde 50 e 30% dos casos apresentam mutações, respectivamente (Guinn & Padua, 1997). A maioria das alterações em LLA são transições G:C para A:T e ocorrem em dinucleotídeos CpG. Esse padrão de mutação resulta, provavelmente, de desaminação espontânea em 5-metilcitosina, sugerindo que, em LLA e neoplasias hematológicas em geral, as mutações no p53 podem não ser induzidas por carcinógenos exógenos.

As células leucêmicas apresentam mutações no p53 em aproximadamente 15% dos indivíduos com LLC. Uma minoria dos casos de LLC são propensos à síndrome de Richter, uma desordem linfoproliferativa agressiva, dos quais 40% têm uma mutação no p53 nas células mais malignas. Alterações no p53 também estão associadas com transformação de LLC para um linfoma muito agressivo (Imamura *et al*, 1994).

Pacientes com LMC em crise blástica apresentam uma freqüência de alterações no gene p53 que varia de 15 a 30%, havendo associação entre a evolução da LMC da fase crônica para a crise blástica com um possível aumento da instabilidade genética (Guinn & Padua, 1997).

Em síndromes mielodisplásicas (MDS) e em leucemia mielóide aguda, as mutações no gene p53 foram observadas com freqüência variando em torno de 5 a 15%, respectivamente. Várias investigações mostram alta freqüência de mutações relacionadas com os subtipos FAB de piores prognósticos nas MDS, e progressão da doença em LMA. Outros trabalhos apontam para possível correlação entre a presença de mutações no gene p53 e/ou expressão alterada da proteína e a evolução da doença em pacientes com LMA. Fenaux *et al*, 1992a observaram freqüência de 7% de

mutações no gene p53, que pode estar associada à idade avançada e mau prognóstico. Hu *et al*, 1992 sugerem que a inativação funcional do gene p53 por mutações de ponto possa ser um dos mecanismos envolvendo a progressão da doença em LMA. Do mesmo modo, os estudos de Fenaux *et al* (1991) e Kurosawa *et al* (1995) indicam que, em alguns casos estudados, as mutações no gene p53 podem estar envolvidas na progressão e prognóstico da doença. Os dados de Wattel e colaboradores (1994) sugerem que mutações no gene p53 poderiam ser forte indicador prognóstico de resposta à quimioterapia e sobrevida em LMA, MDS e LLC. Em MDS, os resultados são semelhantes, havendo por parte de vários autores concordância no papel das alterações no gene p53 na evolução da doença e transformação para LMA (Mori *et al*, 1995; Sugimoto *et al*, 1993; Ludwig *et al*, 1992). Alguns autores, no entanto, relatam que mutações no gene p53 não desempenhariam papel crítico na evolução e prognóstico das LMA e MDS (Tsuchita *et al*, 1992; Pignon *et al*, 1994).

Como pôde ser observado, um considerável conjunto de dados aponta para um possível papel dos genes supressores de tumores na evolução das leucemias agudas. Uma vez que na população brasileira existe muito menor controle de exposição a inseticidas e pesticidas que em outros países do hemisfério Norte (Lorand *et al*, 1984) e devido às suas características próprias dado o elevado grau de miscigenação, torna-se importante o estudo da frequência e tipo de mutação nos genes RB1 e p53, além da análise da possível correlação entre a presença de mutações e a evolução clínica dos pacientes.

Objetivos

1. Estimar a frequência e os tipos de mutações nos exons 4 a 10 do gene p53 em pacientes portadores de leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda atendidos no ambulatório da Disciplina de Hematologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.
2. Estimar a frequência e os tipos de mutações nos exons 1 a 27 e região promotora do gene RB1 nos mesmos pacientes
3. Estudar a correlação entre a existência de mutações e a evolução clínica das leucemias, assim como a possibilidade de cooperação entre as mutações nos genes p53 e RB1 no processo de tumorigênese.

Casuística e Métodos

Pacientes

Foram estudados 35 pacientes portadores de leucemia mielóide aguda e 9 pacientes portadores de leucemia linfóide aguda, escolhidos aleatoriamente, atendidos no ambulatório da Disciplina de Hematologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, no período de 08/01/90 a 31/08/94. O diagnóstico das leucemias foi levado a efeito por meio das características clínicas e do estudo citológico, citoquímico e citogenético da medula óssea, realizado em esfregaços obtidos por aspiração medular e corados pelo Leishman e pelas seguintes reações citoquímicas: "Sudan Black" ou peroxidase, ácido periódico Schiff e alfa-naftil acetato esterase (Dacie & Lewis, 1984). Em casos recentes, o diagnóstico foi feito por meio de imunofenotipagem realizada de acordo com os métodos descritos por Waller & MacLennan (1977). A classificação das leucemias agudas em LMA e LLA 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 são os 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 porcentagem de células blásticas (sem características neoplásicas) inferior a 5%.

O critério básico de recidiva hematológica foi a porcentagem 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).

Para os cálculos da sobrevida global e da sobrevida livre de 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.

Os protocolos utilizados para a quimioterapia dos pacientes com LMA e LLA encontram-se pormenorizados no Anexo I.

Extração de DNA a partir de leucócitos

Foram colhidos 2 a 5 ml de aspirado de medula óssea ou 10 a 20 ml de sangue periférico 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 0,3 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, uréia 7M e dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% (10% do volume final da solução), 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 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 (3X o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada e estéril, e teve sua concentração estimada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm (Sambrook *et al*, 1989).

PCR-CSGE para rastreamento de mutações no gene RB1:

O método de “conformation-sensitive gel electrophoresis” (CSGE), conforme descrito por Ganguly e colaboradores (1993) e posteriormente modificado por Williams *et al* (1995), foi utilizado para o rastreamento de mutações no gene RB1, visto que, neste caso, os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al*, 1988) para os diferentes exons variam de 215 a 570 pares de bases. O princípio de tal método é a detecção de pequenas alterações, como inserções, deleções e mutações de ponto em heteroduplexes de DNA. O CSGE utiliza um sistema de solventes desnaturantes que parecem amplificar a tendência dessas mutações a produzir mudanças conformacionais e, conseqüentemente, aumentar a migração diferencial dos heteroduplexes e homoduplexes de DNA durante a eletroforese. Este procedimento pode ser aplicado a qualquer produto de PCR de 200-800 pb e não requer equipamentos especiais ou preparação das amostras.

A PCR para a amplificação dos diferentes exons do gene RB1 foi realizada com a utilização de 0.5µg de DNA genômico, 20 pmoles de cada “primer” (Shimizu *et al*, 1994) (os “primers” foram desenhados flanqueando os exons e aproximadamente 50 pares de bases de cada intron adjacente), 200µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂ e 2,5 unidades de Taq polimerase em um volume final de 100µl. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (a temperatura específica dos “primers” encontra-se na tabela I) e extensão (72°C) em aparelho ciclador de temperatura “DNA Thermal Cycler” (Perkin Elmer Cetus). O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos. As seqüências dos “primers”, tamanho do

fragmento amplificado e respectivas temperaturas de anelamento encontram-se na tabela I. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta.

Para o CSGE foi utilizado um aparato padrão para sequenciamento de DNA, com placas de vidro de 37,5X45,0 cm e um pente de 36 poços de 1mm de espessura. Uma solução estoque de 39,6g de acrilamida (Sigma) e 0,4g de 1,4-Bis(acryloyl)-piperazina (BAP; Fluka) foi preparada em 100 ml de água destilada e usada para preparar um gel de poliacrilamida 10%, contendo etileno glicol 10% (vol/vol) (Sigma) e formamida 15% (wt/vol) (GIBCO/BRL) em tampão Tris-Taurina-EDTA 0.5X (TTE 1X é igual a Tris 89mM/ tampão taurina 15 mM/ EDTA 0,5 mM, pH 9,0; United States Biochemical). O tampão de corrida foi TTE 0,25X na parte superior e TTE 1X na parte inferior.

Antes da eletroforese, 20µl de cada amostra foram aquecidos a 98°C por 5 minutos, seguido de incubação a 68°C por 1 hora para formação de heteroduplexes. Misturou-se 5µl da amostra com 5µl de etileno glicol 20% (vol/vol), formamida 30% (wt/vol) contendo xileno cianol e azul de bromofenol 0,25% cada. Foi realizada uma pré-corrida a 300V por 15 minutos e as amostras foram submetidas a eletroforese a 300V por 16 horas. Após a eletroforese, uma das placas de vidro foi removida e o gel na segunda placa foi corado com brometo de etídeo 1 µg/ml, por 10 minutos, e em seguida descorado com água deionizada por 10 minutos. As bandas foram visualizadas com um equipamento manual de luz ultravioleta e a região de interesse cortada e levada para o transiluminador, onde foi fotografada.

Tabela I: Sequências dos “primers”, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento dos exons 1 a 27 e região promotora do gene RB1.

Exon	Sequência	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Promotor	S - 5'-GATCCCCAAAAGGCCAGCAAGTGTCT-3' AS - 5'-TCAACGTCCCCTGAGAAAAACCGGA-3'	62	570
1	S - 5'-TCTCAGGGGACGTTGAAA-3' AS - 5'-TGTCAGTTGAAGCCGAGA-3'	48	475
2	S - 5'-AAGTGTAATGTTTTCTAAG-3' AS - 5'-TAGCAGAGGTAAATTTCTC-3'	48	431
3	S - 5'-AACATAGTATCCAGTGTGT-3' AS - 5'-GGCAGTTCACTATTTGGTCC-3'	52	319
4	S - 5'-GTAGTGATTGATGTAGAGC-3' AS - 5'-ACATTAAAAGGGACAAGTCT-3'	50	346
5	S - 5'-GAAGATGAATAAAGCATGAG-3' AS - 5'-CCTGCTATAATCGATCAAAC-3'	52	226
6	S - 5'-TGCACAAAAAGAAACACCCA-3' AS - 5'-GCAGAGAATGAGGGAGGAGT-3'	52	280
7	S - 5'-CTACCCTGCGATTTCTCTC-3' AS - 5'-GGTACCCACTAGACATTCAA-3'	52	259
8	S - 5'-TGTTATCCTTCTAATGAAAC-3' AS - 5'-TTAGGGAGAAGTTACATCTA-3'	52	347
9	S - 5'-ACTGCATGGGGGATTGACAC-3' AS - 5'-CCTCCCTCCACAGTCTCAA-3'	55	241
10	S - 5'-ATCTGTGCCTCTGTGTGCTG-3' AS - 5'-GTCACTAAGCTAAAGACTAT-3'	52	269
11	S - 5'-AAGCAGCAGCTGGGTCAATC-3' AS - 5'-GTGTGATCCACCACCTGG-3'	62	378
12	S - 5'-ACCACAGTCTTATTTGAGGG-3' AS - 5'-GTTAGATAGGAGATTAGTAT-3'	52	341
13	S - 5'-CCTCGACATTGATTTCTGTT-3' AS - 5'-GCATACACAGGCAGCAGGGA-3'	50	296
14	S - 5'-AAACAGTGAGACTCCATCTC-3' AS - 5'-AGGATGATCTTGATGCCTTG-3'	56	270
15/16	S - 5'-CAACAGAGCAAGACACCATC-3' AS - 5'-CTCCTTAACCTCACACTATC-3'	56	405
17	S - 5'-CCTTTCTACTGTTTTCTTTG-3' AS - 5'-GGGCTATAGACTGAAATAAC-3'	50	436
18	S - 5'-ACTTTTAAATTGCCACTGTC-3' AS - 5'-GTTACATTGCACTTATGCTT-3'	50	319
19	S - 5'-CAAGATGTATCTGGGTGTAC-3' AS - 5'-GACTTGCCAGTAATGTACC-3'	50	350
20	S - 5'-AGAGGTTTCTGTTAAATG-3' AS - 5'-AGAAGGTGAAGTGCTTGAT-3'	50	295
21	S - 5'-CTCTGTAGATTAAACCTTTC-3' AS - 5'-AAGGTCAGACAGAATATATG-3'	45	330
22	S - 5'-ATATGTGCTTCTTACCAGTC-3' AS - 5'-AAGGGCTTCGAGGAATGTGAG-3'	52	385
23	S - 5'-CAAAAGTATCCTTTGATTGG-3' AS - 5'-CAAAATAATCCCCCTCTCAT-3'	52	364
24	S - 5'-CAGTGGTCTAGGGTAGAGG-3' AS - 5'-GCCTGGATGAGGTGTTTGA-3'	52	275
25	S - 5'-GAAGTTATTACCTTTGCCTG-3' AS - 5'-GGATTCCCAGATGACCATC-3'	52	310
26	S - 5'-TAGCATAAAGTAAGTCATCG-3' AS - 5'-CGAAAAGACTTCTGCACTG-3'	52	215
27	S - 5'-TTTGCAAGGTCCTGAGCGCC-3' AS - 5'-CCAGAGGTGTACACAGTGC-3'	52	226

S: "sense"

AS: "anti-sense"

pb: pares de bases

PCR-SSCP para rastreamento de mutações no gene p53:

O rastreamento dos exons 4 a 10 do gene p53 foi realizado pelo método de polimorfismo de conformação de fita simples de DNA (SSCP), conforme originalmente descrito por Orita e colaboradores (1989 a e b), uma vez que os produtos da PCR são, em sua maioria, menores que 200 pares de bases. Após padronização de 2 métodos de SSCP (radioativo e não-radioativo), optou-se pelo uso do método não radioativo, com a utilização do equipamento "PhastSystem" - Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

A PCR para amplificação dos exons 4 a 10 do gene p53 foi realizada com a utilização de 0,5 µg de DNA genômico, 20 pmoles de cada "primer" (Clontech - Palo Alto, CA), 200 µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM e 2,5 unidades de Taq polimerase (Gibco-BRL) em um volume final de 100 µl. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (as temperaturas utilizadas para cada "primer" encontram-se na tabela II), e extensão (72°C) em aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer Cetus). O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 2.0%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. A seqüência dos "primers", temperatura de anelamento e tamanho do fragmento amplificado estão descritos na tabela II.

À uma alíquota de 2 µl do produto da reação foram adicionados 2 µl de uma solução contendo formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,1% e xileno cianol 0,1%. Esta mistura foi desnaturada a 95°C por 5 minutos, mantida em

gelo até o momento da aplicação e 0,3 µl foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 20% homogêneo (exons 5 a 10) ou gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (exon 4) de tamanho 43 x 50 x 0,45 mm, em tampão 0,112 M acetato e 0,112 M Tris, pH 6,4. A corrida foi realizada em tampão L-Alanina 0,88 M, Tris 0,25 M em agarose 3% IEF (isoeletrofocalização), pH 8,8. As condições da corrida , baseadas nos dados de Mohabeer e colaboradores, 1991, foram:

Exons 5, 6, 7, 8 e 9:

(1) Pré-corrida: 400 V; 5,0 mA; 1,0 W; 15°C; 10 Vh;

(2) Aplicação das amostras: 25 V; 5,0 mA; 1,0 W; 15°C; 2 Vh;

(3) Corrida:

exons 5, 6, 7 e 9: 150V; 5,0 mA; 1,0 W; 15°C; 150 Vh

exon 8: 150V; 5,0 mA; 1,0 W; 15°C; 200 Vh

Exons 4 e 10:

(1) Pré-corrida: 400 V; 5,0 mA; 1,0 W; 4°C; 10 Vh

(2) Aplicação das amostras: 25 V; 5,0 mA; 1,0 W; 4°C; 2 Vh

(3) Corrida:

exon 4: 400 V; 5,0 mA; 1,0 W; 4°C; 470 Vh

exon 10: 90 V; 5,0 mA; 1,0 W; 4°C; 200 Vh

Diferentes condições de temperatura, voltagem e relação voltagem/hora foram testadas para cada exon. As condições relatadas acima foram as que possibilitaram melhor padrão de migração eletroforética no SSCP.

A coloração dos géis foi realizada no equipamento PhastSystem seguindo as seguintes etapas:

1. Ácido tricloroacético 20% por 5 minutos a 26°C;
2. Glutaraldeído 5% por 5 minutos a 50°C;
3. Água deionizada por 2 minutos a 50°C(2X);
4. Nitrato de prata 0.4% por 8 minutos a 40°C;
5. Água deionizada por 30 segundos a 30°C (2X)
6. Carbonato de sódio 2.5%, contendo formaldeído 0.01% por 30 segundos a 30°C, seguida por outra incubação por 5 minutos a 30°C;
7. Ácido Acético 5% por 2 minutos a 50°C;
8. Glicerol 13% por 3 minutos a 50°C.

Um outro método de coloração pela prata foi utilizado em alguns casos, como descrito a seguir:

1. Etanol 10%, ácido acético 0,5% por 1,5 minuto a 40°C;
2. Nitrato de prata 0,2% em etanol 10% e ácido acético 0,5% por 8 minutos a 40°C;
3. Água deionizada por 0,2 minuto a 20°C (2X);
4. Hidróxido de sódio 2% com 100 µl de formaldeído por 5 minutos a 20°C;
5. Etanol 10%, ácido acético 0,5% por 2 minutos a 40°C;
6. Glicerol 10% por 5 minutos a 40°C.

Tabela II: Seqüência dos “primers” (Clontech-Palo Alto, CA), tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento utilizados para o rastreamento dos exons 4 a 10 do gene p53.

Exon	Seqüência	Tamanho do Fragmento (pb)	T.A. (°C)
4	S - 5'-CAC CCA TCT ACA GTC CCC CTT GC-3' AS - 5'-CTC AGG GCA ACT GAC CGT GCA AG-3'	307	58
5	S - 5'-CTC TTC CTA CAG TAC TCC CCT GC-3' AS - 5'-GCC CCA GCT GCT CAC CAT CGC TA-3'	211	58
6	S - 5'-GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC-3' AS - 5'-GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC-3'	185	60
7	S - 5'-GTG TTA TCT CCT AGG TTG GCT CTG-3' AS - 5'-CAA GTG GCT CCT GAC CTG GAG TC-3'	139	62
8	S - 5'-ACC TGA TTT CCT TAC TGC CTC GGG C-3' AS - 5'-GTC CTG CTT GCT TAC CTC GCT TAG T-3'	200	59
9	S - 5'-GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC-3' AS - 5'-CCC AAG ACT TAG TAC CTG AAG GGT G-3'	102	60
10	S - 5'-TGT TGC TGC AGA TCC GTG GGC GT-3' AS - 5'-GAG GTC ACT CAC CTG GAG TGA GC-3'	131	60

S: “sense” AS: “anti-sense” T.A.: Temperatura de anelamento pb: pares de bases

Sequenciamento

Para a confirmação das alterações de mobilidade eletroforética encontradas tanto no gene p53 como no gene RB1 utilizou-se o “T7 Sequenase PCR Product Sequencing Kit” ou “Thermosequenase™ Cycle Sequencing Kit” (Amershan Life Science, Inc., Cleveland, Ohio), seguindo-se as instruções do fabricante, como será descrito a seguir. Os “primers” utilizados foram os mesmos da reação de PCR.

“T7 Sequenase PCR Product Sequencing Kit”:

1. 5µl do produto da reação de PCR foram tratados com 1 µl de exonuclease I (10 U/µl) e 1 µl de fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl). A mistura foi incubada a

37°C por 15 minutos, seguidos de 15 minutos a 80°C, para a inativação das enzimas.

2. Em geral foram utilizados 2 µl do DNA tratado enzimaticamente, adicionando-se 1 µl do “primer”, a uma concentração de 5-10 pmol/µl e água deionizada estéril para completar o volume final de 10 µl. Após a desnaturação por 3 minutos a 100°C, a mistura foi transferida para um banho de gelo com etanol absoluto, onde permaneceu por 5 minutos. À esta mistura adicionou-se 2 µl de tampão para sequenase 10X, 1µl de ditionitrito (DTT), 2 µl da mistura de marcação diluída 1:5, 0,5 µl de α^{35} S-dATP (12,5 mCi/ml) e 2 µl de Sequenase polimerase, perfazendo um total de 17,5 µl.

A reação foi mantida por 5 minutos a 20°C. A seguir, à uma temperatura de 37°C, 3,5 µl da reação foram acrescentados aos tubos Eppendorf, previamente identificados e pré-aquecidos, contendo 2,5 µl dos dNTPs com cada um dos didesoxirribonucleotídeos de terminação (ddGTP, ddATP, ddTTP ou ddCTP). Os tubos foram mantidos a 37°C por mais 10 minutos, interrompendo-se a reação com a adição de 4 µl de “stop solution” (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%) em cada um dos 4 tubos (G, A, T e C).

“Thermosequenase™ Cycle Sequencing Kit”:

1. 5µl do produto da reação de PCR foram tratados com 1 µl de exonuclease I (100 U/µl) e 1 µl de fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl). A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos, seguidos de 15 minutos a 80°C, para a inativação das enzimas.

2. Desse total, 2 μ l foram utilizados para a reação de sequenciamento, acrescentando-se 10,5 μ l de água deionizada estéril, 2 μ l de tampão para Thermosequenase 10X, 1 μ l do “primer” marcado previamente com $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP e 2 μ l da enzima Thermosequenase, obtendo-se um volume total de 17,5 μ l.
3. 5 μ l da mistura acima foram adicionados aos tubos previamente identificados e contendo 4 μ l de cada uma das misturas de terminação (G, A, T e C). Acrescentou-se 1 gota de óleo mineral e as amostras foram submetidas a uma nova reação de PCR, utilizando-se as temperaturas de anelamento do PCR original. Após 30 ciclos a reação foi interrompida com a adição de 4 μ l de “stop solution” (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%).

Reação de marcação do “primer”: em um tubo Eppendorf colocou-se 1,1 μ l de água deionizada estéril, 0,6 μ l de tampão para T4 quinase 10X, 0,5 μ l do “primer” (20 pmol), 1 μ l de $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP (10,0 mCi/ml) e 3 μ l de T4 Polinucleotídeo Quinase (10 U/ μ l). A reação foi incubada por 10 minutos a 37°C e por 5 minutos a 95°C.

4 μ l do produto da reação de sequenciamento foram desnaturados a 94°C por 2 minutos e aplicados em gel de poliacrilamida 6% em tampão Tris-Taurina-EDTA (TTE) 0,8X e uréia 7 M, em placas de 33x40 cm, com gradiente de espessura de 0,25 a 0,75 mm. A eletroforese foi realizada a 75 W por 2 a 3 horas à 50°C, de acordo com o tamanho do fragmento, utilizando-se como tampão de corrida TTE 0,8X. (TTE 1X é igual a Tris 89mM/ tampão taurina 15 mM/ EDTA 0,5 mM, pH 9,0; United States Biochemical).

Secou-se o gel à 80°C por 1 hora em aparelho Bio-Rad modelo 583 e procedeu-se com a exposição do mesmo em cassete com filme de raio X, por 16 horas, à temperatura ambiente.

Análise Estatística

Dentre os 35 pacientes com LMA, as seguintes variáveis foram comparadas com relação à presença ou ausência de mutações no gene p53: idade, raça, sexo, porcentagem de blastos na medula, resposta à terapêutica de indução da remissão, subtipo FAB, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).

Para a investigação de possível diferença entre a presença ou ausência de mutação em relação às variáveis contínuas idade e porcentagem de blastos na medula foi utilizado o teste de Wilcoxon (Mann-Whitney). Já para o estudo das variáveis categóricas raça, sexo, resposta à terapêutica de indução da remissão, subtipo FAB e para a estratificação dos pacientes por idade ($<$ e $\geq$ 60 anos) e por porcentagem de blastos ($<$ e $\geq$ 60%), foi utilizado o teste exato de Fisher (Conover, 1971). As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Para as estimativas das curvas de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meyer. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Log-Rank (Collett, 1994).

Os subtipos FAB foram agrupados em M1 + M2 e M4 + M5, que são subtipos sem e com componente monocítico, respectivamente. Uma vez que havia apenas um paciente de subtipo M3 e dois de subtipo M7, estes casos não entraram na análise.

Para a análise estatística foram utilizados os programas SAS versão 6.12 e SPSS versão 6.0.

Resultados

PCR-CSGE/gene RB1

A análise do gene RB1 por PCR/CSGE foi realizada em amostras de DNA extraídas de 44 pacientes (35 portadores de LMA e 9 portadores de LLA), rastreando-se a região promotora e os exons 1 a 27 do gene RB1. Não foram observadas mutações no gene RB1. Contudo, observou-se alterações no padrão de mobilidade eletroforética nos introns 2, 3, 4, 11, 17, 23 e 25, todas confirmadas por sequenciamento como sendo prováveis polimorfismos, distantes da fronteira intron/exon do gene e, aparentemente, não relacionados com a doença. Para os polimorfismos dos introns 3 (alteração 1) e 17 foi realizado o rastreamento de 50 indivíduos caucasóides sem a doença, não relacionados entre si, encontrando-se uma frequência de ambos os polimorfismos semelhante à relatada em pacientes com leucemia. A tabela III resume as alterações de mobilidade eletroforética encontradas no gene RB1 com as respectivas confirmações por sequenciamento.

Tabela III: Amostras com padrão de mobilidade eletroforética alterado no CSGE para o gene RB1.

Intron	Número de Pacientes	Confirmações por Sequenciamento	Frequência alélica	FOH
2	3 (het.)	alt.: T→C, a 75 pb da extremidade 3' do exon 2	T:97%, C:3%	7%
3	alt.1:15 (14 het.; 1 hom.); alt.2: 1 (het.)	alt. 1: G→A, a 43 pb da extremidade 3' do exon 3 (Yandell & Dryja, 1989) alt. 2: A→G, a 12 pb da extremidade 3' do exon 3 (Blanquet <i>et al</i> , 1995)	C:82%, T:18% T:99%, C:1%	32% 2%
4	4 (het.)	alt.:G→T, a 23 pb da extremidade 3' do exon 4 (Blanquet <i>et al</i> , 1992)	G:95%, T:5%	9%
11	4 (het.)	alt.: T→G, a 72 pb da extremidade 5' do exon 12	T:95%, G:5%	9%
17	16 (het.)	alt.: inserção de 2 pb, a 80 pb da extremidade 3' do exon 17	1 base: 82%, inserção: 18%	36%
23	1 (het.)	alt.: T→C, a 78 pb da extremidade 5' do exon 24	T:99%, C:1%	2%
25	12 (11 het.; 1 hom.)	alt.: T→A, a 10 pb da extremidade 5' do exon 26 (Yandell & Dryja, 1989)	T:85%, C:15%	25%

pb: pares de bases alt.: alteração het.: heterozigoto hom.: homozigoto
FOH: frequência observada de heterozigotos

O paciente que apresentou a alteração 2 no intron 3, apresentou, simultaneamente, a alteração 1 em heterozigose.

As figuras 8 a 10 exemplificam a técnica de CSGE e os respectivos sequenciamentos dos introns 3, 17 e 25.

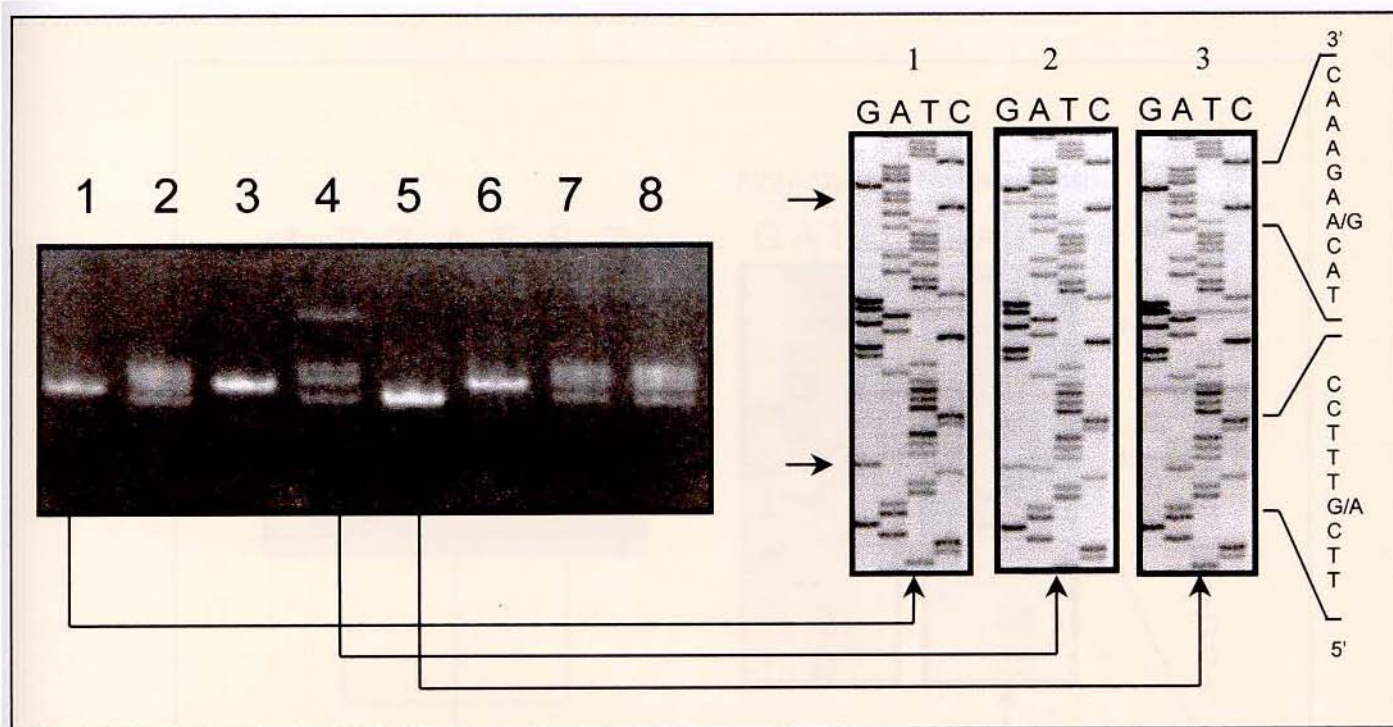


Figura 8: À esquerda, análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 3 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes. 1. DNA de controle normal; 2-8. DNAs de pacientes com leucemia aguda. As amostras 2, 4, 5, 7 e 8 apresentaram mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. À direita, sequenciamento direto do produto do PCR de indivíduo controle e de indivíduos que apresentaram padrão de mobilidade eletroforética alterado no CSGE. 1. controle (amostra 1 do CSGE). 2. indivíduo heterozigoto para a substituição G→A, localizado a 43 pb da extremidade 3' do exon 3 (intron 3) (alteração 1) e heterozigoto para a substituição A→G, localizada a 12 pb da extremidade 3' do exon 3 (intron 3) (alteração 2) (amostra 4 do CSGE). 3. indivíduo homozigoto para a substituição G→A (alteração 1) (amostra 5 do CSGE). As amostras 2, 7 e 8 são heterozigotas apenas para a alteração 1. A foto representa o sequenciamento da fita "anti-sense".

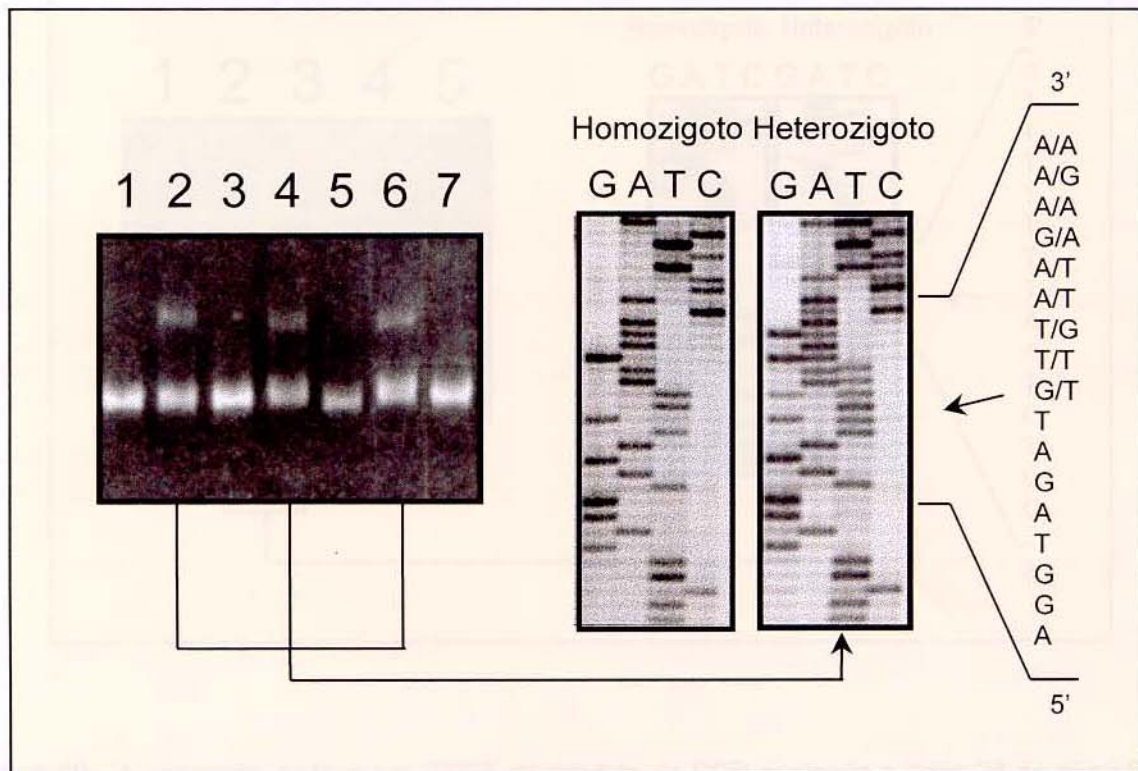


Figura 9: `A esquerda, análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 17 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes. 1. DNA de controle normal; 2-7. DNAs de pacientes com leucemia aguda. As amostras 2, 4 e 6 apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. `A direita, sequenciamento direto do produto do PCR de indivíduo controle e de indivíduo heterozigoto para uma inserção de 2 pb no intron 17 do gene RB1. A seta indica o local onde ocorreu a inserção, a 81pb da extremidade 3' do exon 17, causando a presença de bandas duplas acima da alteração. A foto representa o sequenciamento da fita "anti-sense".

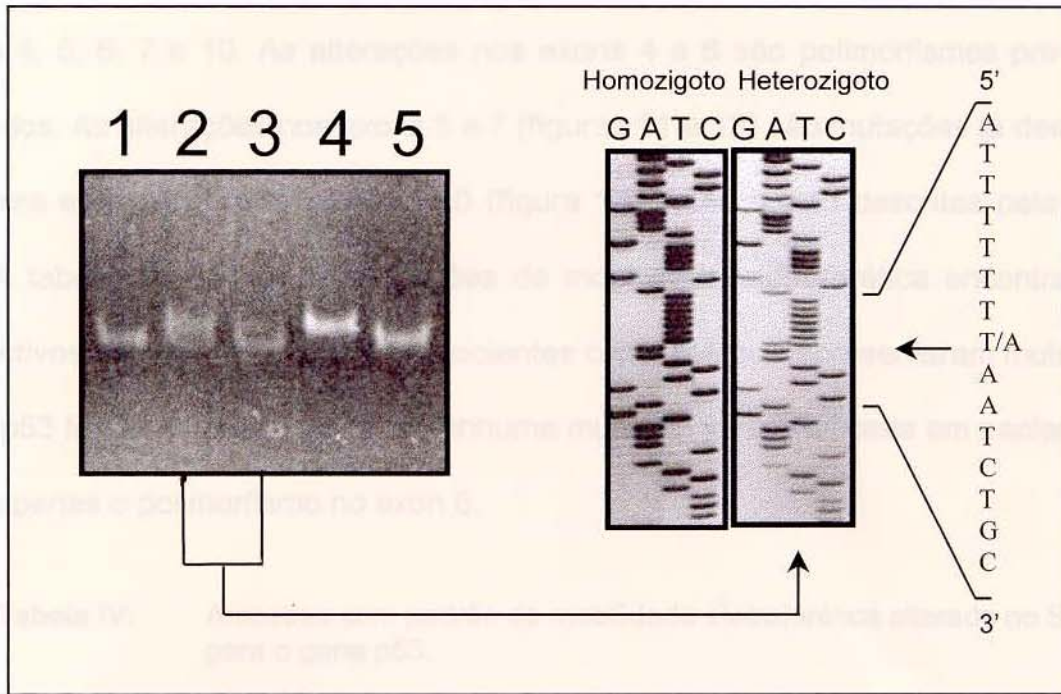


Figura 10: `A esquerda, análise por CSGE do produto do PCR contendo o exon 26 do gene RB1 e regiões intrônicas adjacentes. 1. DNA de controle normal; 2-5. DNAs de pacientes com leucemia aguda. As amostras 2, 3 e 4 apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. `A direita, sequenciamento direto do produto do PCR de indivíduo controle e de indivíduo heterozigoto para a substituição T→A localizada a 10 pb da extensão 5' do exon 26 (intron 25) (amostras 2 e 3 do CSGE). As setas indicam o local onde ocorreu a alteração. A amostra número 4 do CSGE apresenta a mesma alteração, em homozigose, segundo análise por sequenciamento (dados não apresentados). A foto representa o sequenciamento da fita "sense".

PCR-SSCP/gene p53

A análise por PCR-SSCP foi realizada em amostras de DNA extraídas de 44 pacientes (35 portadores de LMA e 9 portadores de LLA), rastreando-se os exons 4 a 10 do gene p53. Observou-se alteração no padrão de mobilidade eletroforética nos exons 4, 5, 6, 7 e 10. As alterações nos exons 4 e 6 são polimorfismos previamente relatados. As alterações nos exons 5 e 7 (figuras 11 e 12) são mutações já descritas na literatura e as alterações no exon 10 (figura 13) estão sendo descritas pela primeira vez. A tabela IV resume as alterações de mobilidade eletroforética encontradas nos respectivos exons. A frequência de pacientes com LMA que apresentaram mutações no gene p53 foi de 14,3% (5 em 35). Nenhuma mutação foi identificada em pacientes com LLA, apenas o polimorfismo no exon 6.

Tabela IV: Amostras com padrão de mobilidade eletroforética alterado no SSCP para o gene p53.

Exon	Número de Pacientes	Confirmações por Sequenciamento
exon 4 (polimorfismo)	6	codon 72 (CCC→CGC)/Pro→Arg (Buchman <i>et al</i> , 1988)
exon 5	1	codon 141 (TGC→TGA)/Cys→stop codon paciente n° 30 - tabela V (Liang <i>et al</i> , 1995)
exon 6 (polimorfismo)	1	codon 213 (CGA→CGG)/polimorfismo (Bathia <i>et al</i> , 1992)
exon 7	1	codon 245 (GGC→AGC)/Gly→Ser paciente n° 1 tabela V (Hu <i>et al</i> , 1992)
	1	codon 248 (CGG→CAG)/Arg→Gln paciente n° 12 - tabela V (Chang <i>et al</i> , 1992)
exon 10	1	codon 337 (CGC→CAC)/Arg→His paciente n° 35 - tabela V
	1	codon 350 (CTC→ATC)/Leu→Ile paciente n° 33 - tabela V

Os dados clínicos, hematológicos e das mutações no gene p53 nos pacientes estudados encontram-se nas tabelas V e VI. Uma vez que os mesmos pacientes estudados foram previamente submetidos ao rastreamento de mutações no oncogene N-ras (Melo *et al*, 1997), as tabelas apresentam os dados referentes à presença de mutações no mesmo, com o intuito de se investigar possível associação entre mutações nos genes p53 e N-ras.

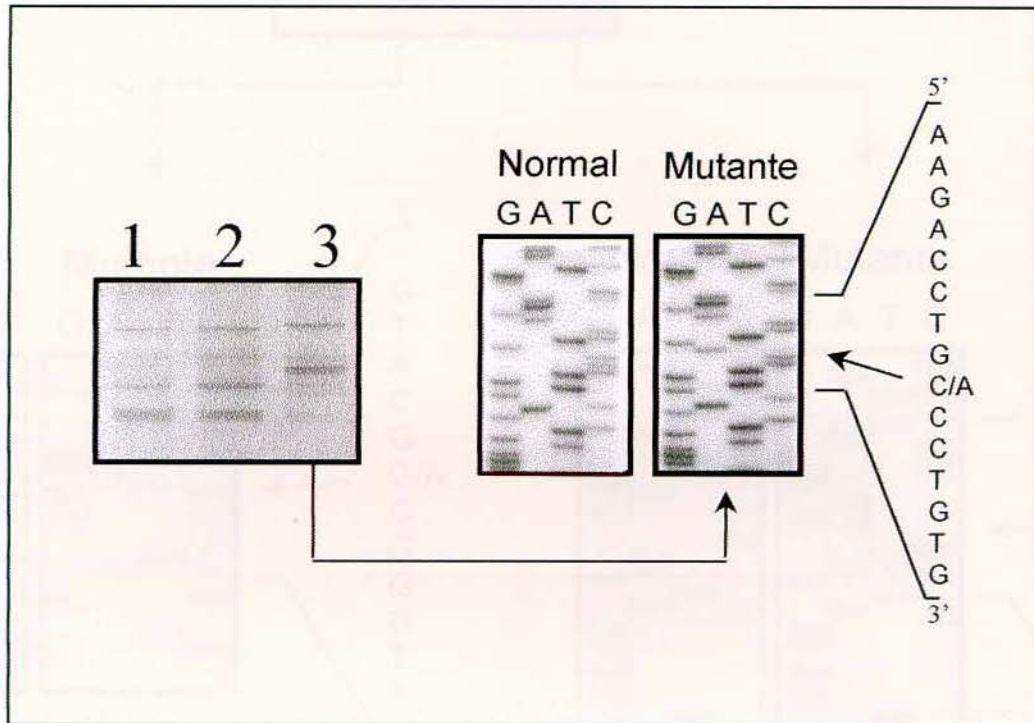


Figura 11: À esquerda, análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 5 do gene p53. 1. DNA de controle normal; 2 e 3. DNAs de pacientes com leucemia aguda. A amostra de número 3 apresenta mobilidade eletroforética alterada quando comparada com o controle. À direita, análise por sequenciamento de DNA do exon 5 do gene p53 (correspondente ao paciente número 3 do SSCP). O resultado é consistente com uma mutação de ponto no codon 141 levando à troca do aminoácido cisteína por um codon de terminação (TGC→TGA) em homozigose. A seta indica o local onde ocorreu a mutação. A foto representa o sequenciamento da fita "sense".

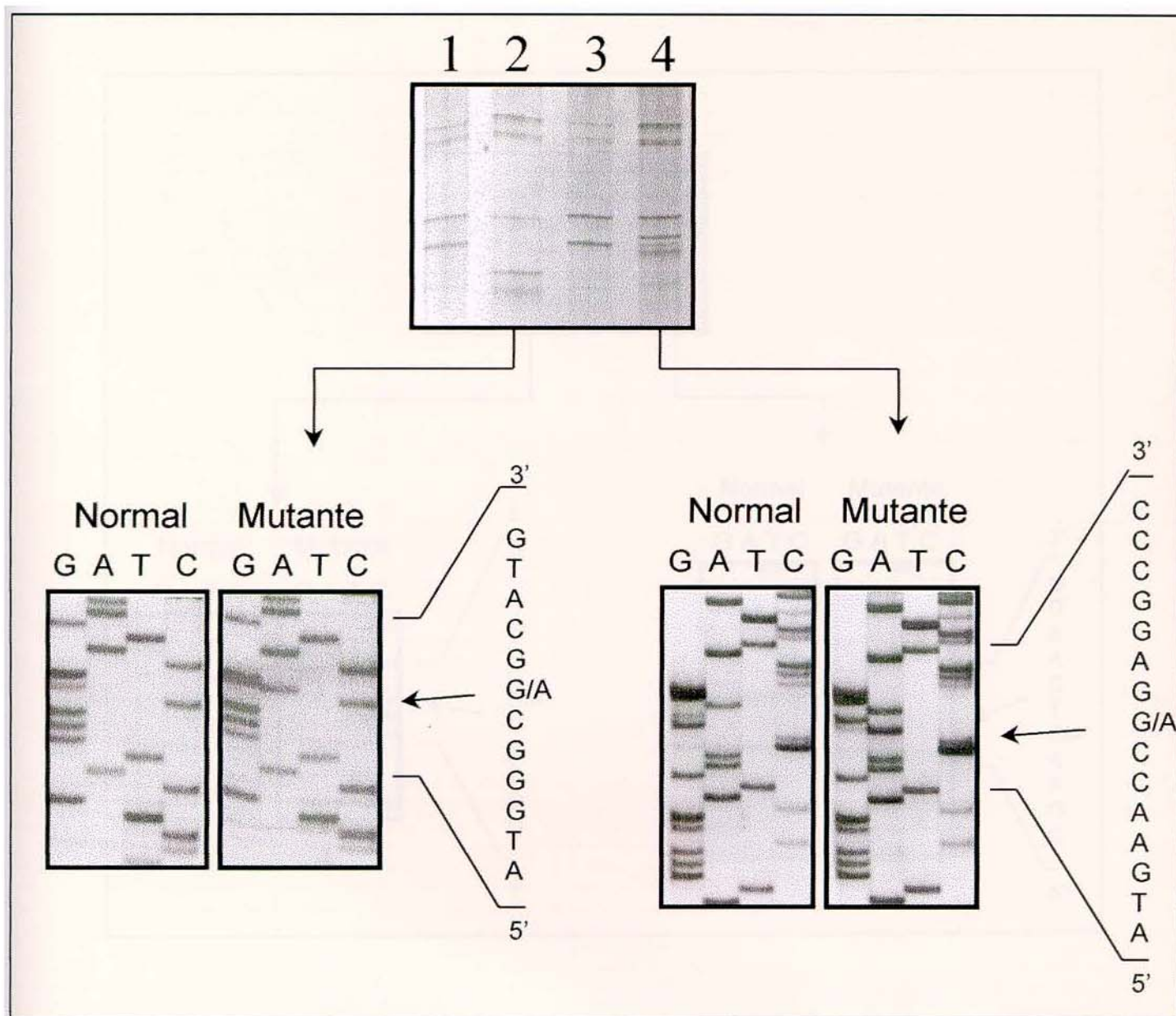


Figura 12: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 7 do gene p53. 1. DNA de controle normal; 2-4. DNAs de pacientes com leucemia aguda. As amostras de números 2 e 4 apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. À esquerda, análise por sequenciamento de DNA do exon 7 do gene p53, correspondente ao paciente número 2 do SSCP. O resultado é consistente com uma mutação de ponto no codon 245 levando à troca do aminoácido glicina por uma serina (GGC→AGC) em homozigose. À direita, análise por sequenciamento de DNA do exon 7 do gene p53, correspondente ao paciente número 4 do SSCP. O resultado é consistente com uma mutação de ponto no codon 248 levando à troca do aminoácido arginina por uma

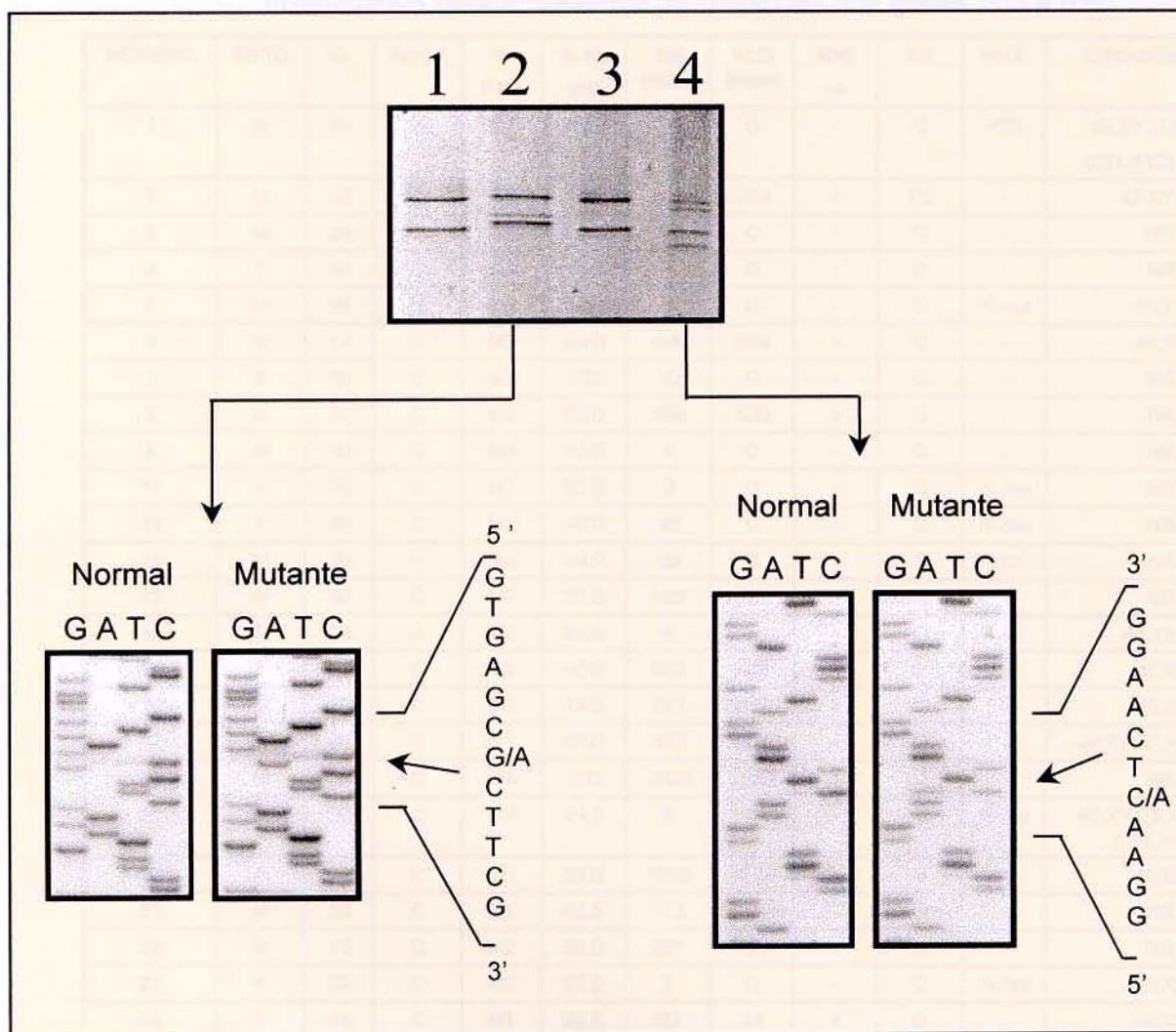


Figura 13: Acima, análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o exon 10 do gene p53. 1. DNA de controle normal; 2-4. DNAs de pacientes com leucemia aguda. As amostras de números 2 e 4 apresentam mobilidade eletroforética alterada quando comparadas com o controle. À esquerda, análise por sequenciamento de DNA do exon 10 do gene p53, correspondente ao paciente número 2 do SSCP. O resultado é consistente com uma mutação de ponto no codon 337 levando à troca do aminoácido arginina por histidina (CGC→CAC) em homozigose (a foto representa o sequenciamento da fita "sense"). À direita, análise por sequenciamento de DNA do exon 10 do gene p53, correspondente ao paciente número 4 do SSCP. O resultado é consistente com uma mutação de ponto no codon 350 levando à troca do aminoácido leucina por isoleucina (CTC→ATC) em heterozigose (a foto representa o sequenciamento da fita "anti-sense"). As setas indicam os locais onde ocorreram as alterações.

Tabela V. Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LMA investigados para a presença de mutações nos genes p53 e RB1.

NÚMERO	SEXO	ID.	RAÇA	S. FAB	% BL MO	SG (dias)	SLD (dias)	RIR +/-	SA	MUT.	CITOGENÉTICA
1	M	18	N	M1	70.0	1	0	-	O	P53	45,XY,-7,t(7,11)(q11;p12),+8,-13
2	M	26	C	M5	100	845	784	+	PS	-	47,XY,+8
3	M	38	C	M3	79.0	15	0	-	O	-	NR
4	F	49	C	M5	100	4	0	-	O	-	NR
5	M	58	C	M4	87.0	7	0	-	O	N-ras	46,XY
6	M	17	C	M2	94.0	645	334	+	O	-	46,XY
7	F	50	C	M1	100	20	0	-	O	-	NR
8	M	62	C	M2	50.0	658	505	+	O	-	NR
9	M	60	C	M4	72.0	4	0	-	O	-	NR
10	F	56	C	M1	95.0	3	0	-	O	N-ras	NR
11	F	25	C	M2	40.0	46	0	-	O	N-ras	NR
12	M	70	C	M4	64.0	59	0	-	O	p53	NR
13	M	40	C	M7	35.0	193	0	-	O	-	NR
14	F	24	C	M2	51.0	9	0	-	O	-	45,XX,-7
15	F	28	C	M2	40.0	533	448	+	O	-	46,XX
16	M	36	C	M2	74.0	627	457	+	O	-	46,XY
17	M	76	C	M1	69.0	405	304	+	O	-	46,XY/47,XY,+mar
18	M	30	C	M4	100	1929	1880	+	V	-	NR
19	M	50	C	M4	94.5	9	0	-	O	N-ras	46,XY,t(5,12)(q23,p13),+6,-7
20	F	22	C	M5	82.0	1910	1874	+	V	-	46,XX
21	M	39	C	M1	82.5	112	0	-	O	-	NR
22	M	16	C	M2	83.0	391	192	+	O	-	NR
23	F	58	C	M2	57.0	2	0	-	O	N-ras	46,XX
24	F	54	C	M1	92.5	80	34	+	O	-	46,XX
25	F	48	C	M2	54.2	160	0	-	PS	-	NR
26	F	56	A	M2	30.0	396	263	+	O	-	NR
27	M	18	C	M5	93.0	19	0	-	O	-	NR
28	F	36	C	M2	77.0	80	43	+	O	-	46,XX
29	F	18	C	M2	28.5	11	0	-	O	-	46,XX
30	M	63	C	M2	47.0	120	90	+	O	p53	46,XY,Ph1
31	F	15	N	M2	80.0	1825	1795	+	V	-	NR
32	M	16	C	M7	98.0	372	181	+	O	-	NR
33	M	45	C	M4	94.0	1	0	-	O	p53	46,XY
34	F	22	C	M2	35.5	26	0	-	O	-	NR
35	M	60	C	M4	93.0	10	0	-	O	p53	NR

SG: sobrevida global

SLD: sobrevida livre de doença

RIR: resposta à indução de remissão

M: masculino

F: feminino

PS: perda de seguimento

S.FAB: subtipo FAB

MO: medula óssea

% BL: porcentagem de blastos

+: positivo

-: negativo

NR: não realizado

ID.: idade

SA: situação atual

MUT.: mutação

O: óbito

N: negróide

C: caucasóide

A: asiática

V: vivo

Tabela VI. Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LLA investigados para a presença de mutações nos genes p53 e RB1.

NÚMERO	SEXO	IDADE	SUBTIPO FAB	% BLASTOS M.O.	SOBREVIDA GLOBAL (dias)	MUTAÇÃO
36	F	26	LLA-L2	100,0	45	-
37	F	24	LLA-L2	100,0	450	-
38	M	25	LLA-L3	100,0	30	-
39	F	33	LLA-L2	100,0	450	-
40	M	18	LLA-L2	100,0	30	-
41	F	15	LLA-L2	100,0	300	-
42	M	37	LLA-L2	96,0	360	-
43	F	31	LLA-L2	43,0	210	-
44	F	14	LLA-L2	83,5	240	-

M: masculino

F: feminino

M.O: medula óssea

Análise Estatística

Entre os dois grupos de pacientes, com e sem mutação no gene p53 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparando-se as variáveis, idade, sexo, raça, porcentagem de blastos, subtipo FAB e resposta à terapêutica de indução de remissão (tabelas VII e IX). Para a variável idade, os resultados só foram estatisticamente significativos quando os pacientes foram estratificados em $<$ e $\geq$ 60 anos, indicando que pacientes com idade $\geq$ 60 anos teriam uma maior predisposição à aquisição de mutações no gene p53 ($p=0,026$). (tabela VIII). Para a variável porcentagem de blastos não houve mudança nos resultados quando os pacientes foram estratificados em $<$ e $\geq$ a 60% de blastos.

A comparação das curvas de sobrevida global (SG) para os grupos com e sem mutação no gene p53, através do Teste de Log-rank sugere que a SG foi significativamente menor nos pacientes com mutação no gene p53 do que nos pacientes sem mutação ($p=0,0226$) (Tabela X, Figura 14). Quanto à sobrevida livre de doença (SLD), apenas um dos pacientes com mutação entrou em remissão, não sendo possível, deste modo, a aplicação do teste para a comparação das curvas de sobrevida (figura 15). Quando foi realizada a estratificação por idade e porcentagem de blastos, as curvas, aparentemente, não foram alteradas (Figuras 1 a 4, anexo II). É importante ressaltar que um maior número de pacientes possibilitaria uma análise estatística mais fiel.

Uma vez que os pacientes empregados neste estudo também foram submetidos à análise de mutações no oncogene N-ras (Melo *et al*, 1997), foram estimadas as curvas

de SG e SLD entre os grupos com e sem a presença de mutação em qualquer um dos genes (p53 ou N-ras). A SG mostrou-se significativamente menor nos pacientes que apresentaram mutação em um ou outro gene ($p < 0,0001$) (Tabela XI, Figura 16). Não foi possível a comparação das curvas de SLD devido à existência de apenas um paciente com mutação que entrou em remissão (Figura 17).

Tabela VII. Análise descritiva global das variáveis contínuas idade e porcentagem de blastos nos pacientes com LMA e resultado da comparação entre essas variáveis e presença ou ausência de mutação.

Variáveis Contínuas	p53 + (média ± DP)	p53 - (média ± DP)	p
Idade (anos)	51,2 ± 20,68	38,1 ± 17,27	0,1195
% blastos	73,6 ± 20,03	72,46 ± 24,04	0,8688

DP = desvio padrão

Tabela VIII: Associação da variável idade após estratificação dos pacientes em < e ≥ 60 anos em relação à presença ou ausência de mutação no gene p53.

Idade	p53 + N/FR (%)	p53 - N/FR (%)
< 60	2/40	27/90
≥ 60	3/60	3/10

Teste exato de Fisher - p-valor = 0,026

Tabela IX: Análise descritiva global das variáveis categóricas sexo, raça, resposta à indução da remissão e subtipo FAB nos pacientes com LMA e resultados da associação entre as variáveis e presença ou ausência de mutação.

Variáveis Categóricas		p53 + N/FR (%)	p53 - N/FR (%)	p
Sexo	Masculino	5/100,0	15/50,0	0,057
	Feminino	0/0,00	15/50,0	
Raça	Caucasóide	4/80,0	28/93,33	0,380
	Negróide	1/20,0	1/3,33	
	Asiática	0/0,00	1/3,33	
Resposta à Indução de Remissão	Não	4/80,0	16/53,33	0,365
	Sim	1/20,0	14/46,67	
Subtipo FAB	M1 + M2	2/40,0	19/70,37	0,310
	M4 + M5	3/60,0	8/29,63	

FR = frequência relativa

N = frequência absoluta

Tabela X: Análise da sobrevida global (SG) dos pacientes com ou sem mutação no gene p53 pelo método de Kaplan-Meyer. O valor de p foi obtido através do teste de Log-rank para comparação das curvas.

Análise da Sobrevida	p53 + (média - TS $\pm$ DP)	n	p53 - (média TS $\pm$ DP)	n	p
SG	38,20 $\pm$ 23,12	5	443,37 $\pm$ 120,23	30	0,0226

TS = tempo de sobrevida

DP = desvio padrão

Tabela XI: Análise da sobrevida global (SG) pacientes com ou sem mutação nos genes N-ras ou p53 pelo método de Kaplan-Meyer. O valor de p foi obtido através do teste de Log-rank para comparação das curvas.

Análise da Sobrevida	mutação + (média TS $\pm$ DP)	n	Mutação - (média TS $\pm$ DP)	n	p
SG	25,80 $\pm$ 12,29	10	529,37 $\pm$ 137,98	25	< 0,0001

TS = tempo de sobrevida

DP = desvio padrão

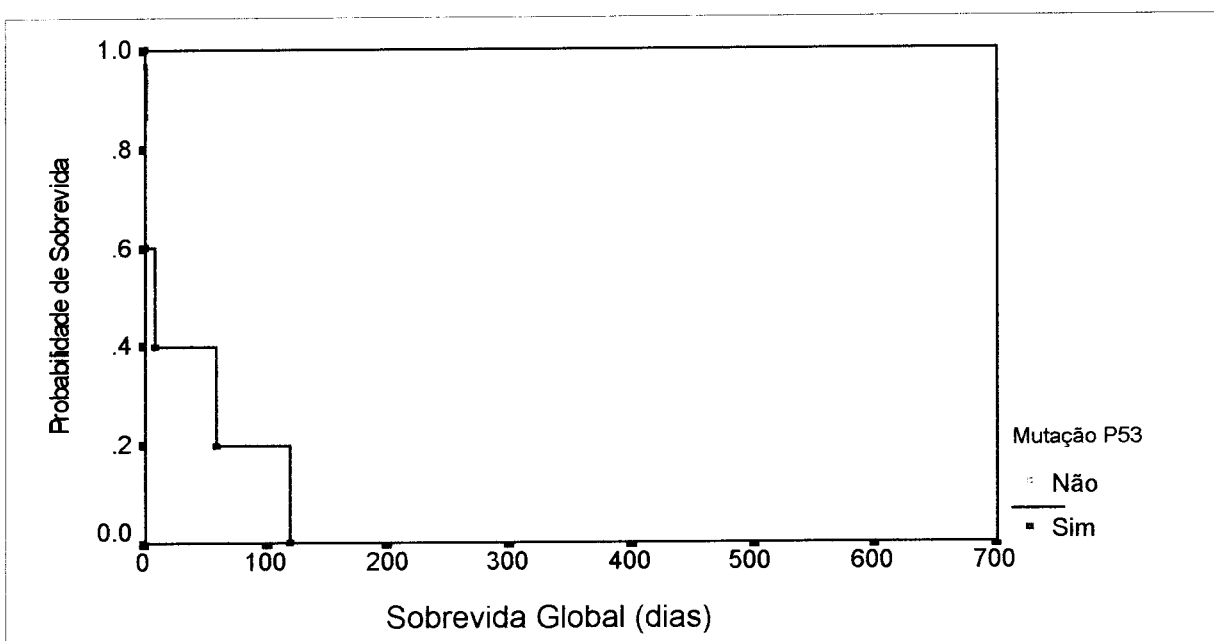


Figura 14. Curvas de sobrevida global dos pacientes com e sem mutação no gene p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meier. Teste de Log-rank para comparação das curvas significativo (p-valor=0,0226).

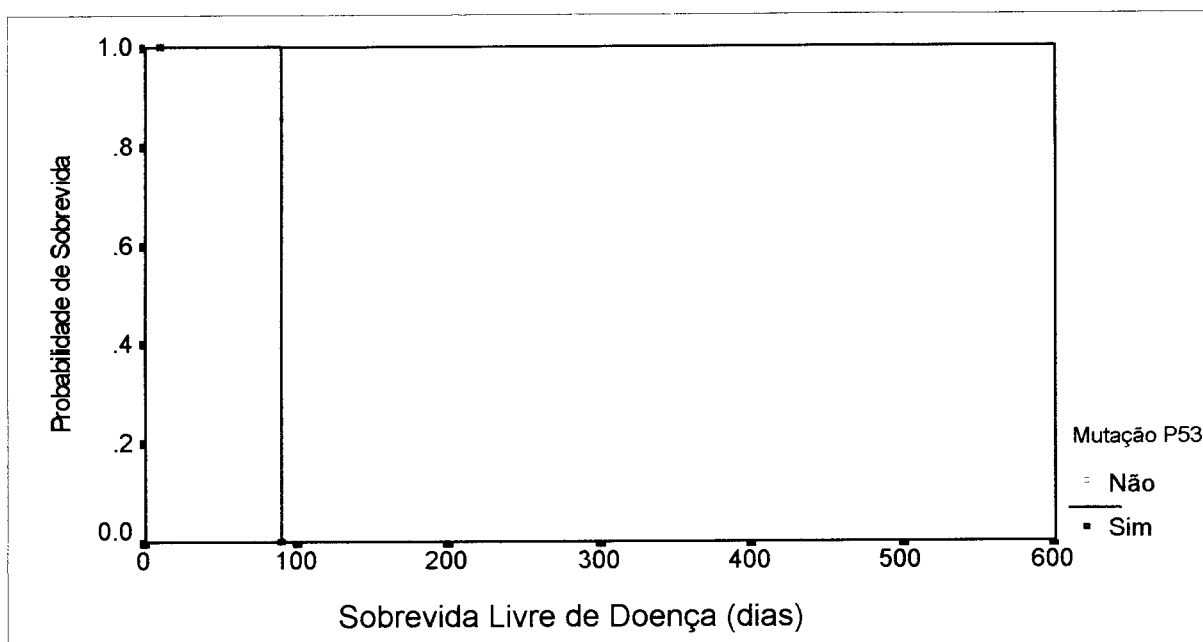


Figura 15. Curvas de sobrevida livre de doença dos pacientes com e sem mutação no gene p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meier. Não houve casos suficientes para realizar a comparação das curvas.

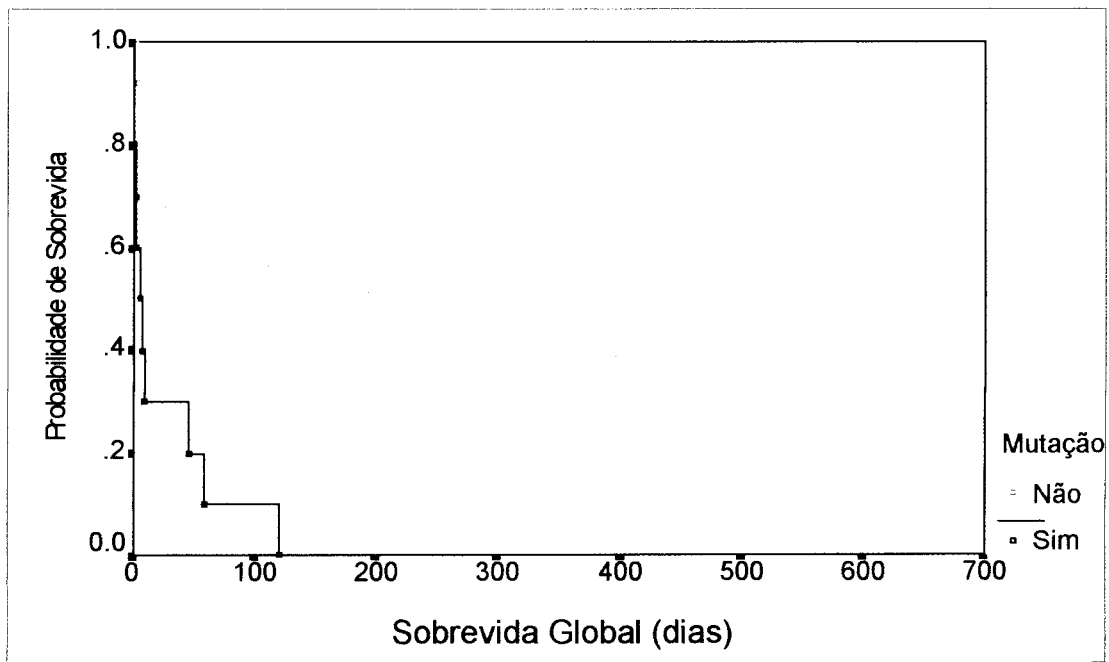


Figura 16. Curvas de sobrevida global dos pacientes com e sem mutação nos genes N-ras e p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meier. Teste de Log-rank para comparação das curvas significativo (p -valor $< 0,0001$).

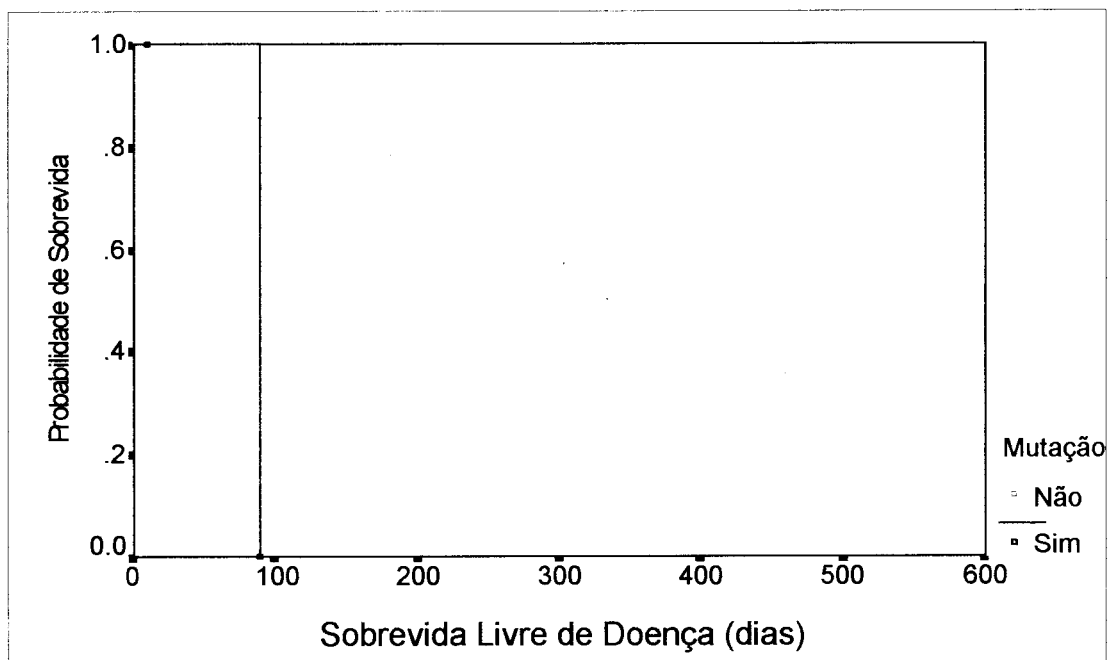


Figura 17. Curvas de sobrevida livre de doença dos pacientes com e sem mutação nos genes N-ras e p53 realizadas pelo método de Kaplan-Meier. Não houve casos suficientes para realizar a comparação das curvas.

Discussão

A inativação do gene RB1 tem sido documentada em uma variedade de outros tumores além do retinoblastoma, como osteosarcomas, câncer de bexiga, próstata, mama, pulmão e leucemias (Friend *et al*, 1986; Horowitz *et al*, 1990; Bookstein *et al*, 1990; Murakami *et al*, 1991; Pietiläinen *et al*, 1995; Jamal, 1996; Jamal *et al*, 1996). Estes dados sugerem que a inativação do gene RB1 estaria envolvida na formação de tumores em diferentes tipos de células e tecidos. A inativação da proteína pRB tem sido amplamente investigada com o emprego de técnicas de “Western blot”, imunoprecipitação ou imunocitoquímica. Esses estudos detectaram a expressão da pRB ausente ou diminuída em 19-55% dos pacientes com leucemias agudas, sugerindo que a expressão anormal da pRB seja um evento freqüente nesse tipo de neoplasia (Ginsberg *et al*, 1991; Tang *et al*, 1992; Kornblau *et al*, 1992; Weide *et al*, 1993; Kornblau *et al*, 1994; Zhu *et al*, 1994; Jamal *et al* 1996; Sauerbrey *et al*, 1996). A maioria desses estudos não mostrou predominância da inativação da pRB de acordo com o subtipo FAB ou com alterações citogenéticas, porém levam a crer que as alterações na expressão da pRB podem ser indicativas de mau prognóstico e redução da sobrevida. No entanto, grande parte dos trabalhos com o objetivo de identificar anormalidades estruturais no gene RB1 indicam que grandes deleções ou rearranjos estão presentes em baixa porcentagem de pacientes com leucemias agudas (Chen *et al*, 1990; Cheng *et al*, 1990; Ahuja *et al*, 1991; Tang *et al*, 1992; Jamal *et al*, 1996).

Desse modo, existe grande discordância entre os dados relacionados à inativação da proteína pRB e à presença de alterações estruturais no gene RB1, sugerindo que a maioria das alterações no gene RB1 que levariam à inativação da proteína não seriam devido a grandes deleções ou rearranjos, mas possivelmente a

mutações de ponto, como é o caso do tumor retinoblastoma (Yandell *et al*, 1989; Blanquet *et al*, 1995; Jamal, 1996). Além disso, há poucos dados na literatura relacionados à presença de alterações estruturais no gene RB1, principalmente às mutações de ponto, situação em que o rastreamento torna-se mais difícil devido ao tamanho do gene e à necessidade de utilização de técnicas mais sensíveis. Com o intuito de investigar se mutações de ponto e pequenas deleções ou inserções no gene RB1 seriam freqüentes nas leucemias agudas, foi realizado o rastreamento de 35 amostras de DNA de pacientes com LMA e 9 amostras de DNA de pacientes com LLA.

Como referido, a técnica de “Southern blot” detecta apenas grandes alterações ou rearranjos no gene; assim, faz-se necessário o uso de outras técnicas de rastreamento. No presente estudo, foi utilizada a técnica de CSGE, que baseia-se na detecção de heteroduplexes. Utiliza-se um sistema de solventes moderadamente desnaturantes que podem aumentar a tendência de mutações de ponto e pequenas deleções ou inserções a produzirem mudanças conformacionais e conseqüentemente aumentar a migração diferencial de heteroduplexes e homoduplexes de DNA durante a eletroforese. O procedimento pode ser aplicado a qualquer produto de PCR de 200 - 800 pb sem o uso de isótopos radioativos (Ganguly *et al*, 1993; Williams *et al*, 1995) e sua sensibilidade é semelhante à de outras técnicas de rastreamento como o SSCP, ou seja, aproximadamente 80% (Cotton, 1993).

Não foram observadas mutações de ponto, deleções ou inserções em regiões codificadoras do gene RB1 em nenhum dos pacientes; contudo, notou-se a presença de polimorfismos localizados nos introns 2, 3, 4, 11, 17, 23 e 25. Destes, alguns são conhecidos (introns 3, 4 e 25) e outros parecem ter sido identificados pela primeira

vez (introns 2, 11, 17 e 23) (tabela III). A distribuição alélica para os polimorfismos dos introns 3 e 17 em pacientes com leucemia foi semelhante à encontrada na população caucasóide utilizada como controle, sugerindo que eles não estariam significativamente associados com a predisposição para esse tipo de neoplasia. A presença de polimorfismos no gene RB1 confirma a sensibilidade da técnica, tornando difícil a possibilidade de que o método de rastreamento tenha deixado de detectar mutações. Além disso, a mesma técnica foi utilizada com sucesso para a detecção de mutações no gene RB1 em pacientes com retinoblastoma. As amostras utilizadas tinham em média 70% de blastos, e métodos de rastreamento como SSCP e CSGE são capazes de identificar mutações em amostras com 20-30% de células malignas como demonstrado em experimentos de diluição usando quantidades diferentes de células não malignas misturadas com células malignas (Grierson *et al*, 1996; Ganguly - comunicação pessoal). Outros trabalhos confirmam a sensibilidade da técnica como Lohman *et al* (1996) que utilizaram o CSGE na detecção de mutações no gene RB1 em pacientes com retinoblastoma do tipo hereditário e Tricoli *et al* (1996) e Szijan *et al* (1995) que utilizaram a análise de heteroduplexes para o rastreamento de mutações no gene RB1 em adenocarcinoma de próstata e em retinoblastomas, respectivamente.

O gene RB1 é altamente polimórfico, sendo que o polimorfismo mais conhecido é o sítio de *Bam HI* no intron 1. A maioria dos polimorfismos do gene RB1 é encontrada nos introns e alguns podem ser detectados com o uso de enzimas de restrição (Jamal, 1996).

A presença de polimorfismos nos genes, principalmente aqueles que possuem sítios para enzimas de restrição, também conhecidos como “restriction fragment length

polymorphisms” ou RFLPs representam uma fonte importante de marcadores genéticos potencialmente informativos. Eles podem oferecer um procedimento diagnóstico para a detecção de doenças, quando estão confiavelmente ligados ao fenótipo e também ser utilizados em aconselhamentos genéticos, uma vez que permitem o acompanhamento do alelo mutante através de gerações. Por outro lado, permitem a construção de haplótipos, utilizados para o estudo de aspectos evolutivos e geográficos dos alelos, assim como podem ajudar no isolamento de genes (Lewin, 1994). Em retinoblastomas, vários trabalhos relatam a utilização de RFLPs do gene RB1 em aconselhamento genético, principalmente devido à penetrância incompleta do gene, o que possibilita a presença de portadores assintomáticos (Horsthemke *et al*, 1987; Wiggs *et al*, 1988; Yandell *et al*, 1989; Yandell & Dryja, 1989; Onadim & Cowell, 1991; Onadim *et al*, 1992; Constanzi *et al*, 1993; Schubert & Hansen, 1996).

Neste estudo não foram detectadas mutações de ponto ou pequenas deleções/inserções em regiões codificadoras do gene RB1. Uma vez que são poucos os relatos de investigações de mutações de ponto no gene RB1 em neoplasias hematológicas, torna-se difícil a interpretação dos resultados. Por exemplo, Grierson e colaboradores (1996) investigaram o gene RB1 em 20 linfomas não-Hodgkin (LNH), tendo encontrado apenas um polimorfismo de *Bam HI*. Suas conclusões são de que mutações no gene RB1 não seriam a causa dos baixos níveis de expressão da pRB observada em alguns LNH. Também Zandecki *et al* (1995) estudando 35 pacientes com mieloma múltiplo não encontraram mutações de ponto pelo método de SSCP ou rearranjos pela análise por “Southern blot”, sugerindo o estudo de outros mecanismos moleculares que venham a explicar a diminuição do nível de expressão da pRB. A

análise do gene RB1, realizada por “Southern blot” e PCR/SSCP, em 26 casos de leucemia mielóide crônica (LMC) em crise blástica, não revelou alterações estruturais, sugerindo que os tipos mais comuns de crise blástica de LMC (crise blástica mielóide e linfóide) ocorreriam independentemente da inativação do gene RB1 (Gaidano *et al*, 1994). Também o grupo de Phillips *et al* (1992) concluiu que mutações no gene RB1 aparentemente não representam contribuição importante na leucemogênese. Estes dados, aliados aos dados aqui apresentados, sugerem que a presença de mutações no gene RB1 seja um evento raro em neoplasias hematológicas. No entanto, alguns outros eventos poderiam estar relacionados com a alteração da pRB em uma porcentagem razoável de pacientes com leucemias agudas. Hatta *et al* (1997), analisaram 40 casos de leucemia/linfoma de célula T do adulto (ATL) e não identificaram mutações de ponto no gene RB1. Atribuem a diminuição da expressão da pRB relatada em outros trabalhos à alguma alteração epigenética, tal como a hipermetilação do gene, sem a presença de mutações na região promotora. A metilação por citosina em sítios CpG na região promotora de genes de eucariotos está envolvida na inativação da expressão de certos genes. A metilação pode levar à transcrição reduzida, sendo possível que a expressão dos genes supressores de tumores também seja inativada pela hipermetilação, o que contribuiria para a gênese do câncer (Ohtani-Fujita *et al*, 1993). No caso do gene RB1, a hipermetilação no promotor inibe a ligação do “retinoblastoma binding factor 1” (RBF1) e dos fatores semelhantes ao fator ativador de transcrição (“activating transcription factor” ou ATF), o que poderia resultar na redução da atividade promotora do gene RB1 em ATL, como

previamente relatado em retinoblastomas (Ohtani-Fujita *et al*, 1993; Ohtani-Fujita *et al*, 1997).

Outro mecanismo de inativação do produto do gene RB1 é proveniente de estudos de transformação neoplásica mediada por um grupo de vírus indutores de tumores, dentre eles, adenovírus, papovavírus e papilomavírus. As proteínas transformantes desses vírus (E1A, antígeno "large T" e E7) formam complexos específicos com um grupo de proteínas celulares hospedeiras que incluem a pRB. A formação dos complexos oncoproteína viral-RB1 parece resultar em perda ou atenuação da atividade da pRB, e, conseqüentemente, as células infectadas por vírus perderiam a atividade regulatória de crescimento imposta pelo RB1 (Kaye *et al*, 1990; Hoppe-Seyler & Butz, 1995).

Uma outra possibilidade é de que a alteração de um único componente da cascata que leva à fosforilação da pRB (p16, ciclina D1, cdk4 ou pRB) seja suficiente para desregular o controle da entrada na fase S (Figura 3). Uma vez que ocorra uma mutação, mutações adicionais que afetem outros componentes da via seriam supérfluas e conseqüentemente não seriam selecionadas durante a evolução do tumor. Desse modo, tumores individuais não teriam mais que uma alteração nessa via. De fato, alguns exemplos de tumores podem ser citados, nos quais alteração em apenas um dos genes é observada. Em glioblastomas, mais de 60% dos tumores apresentam perda de função da p16, pRB ou amplificação do cdk4 (Ichimura *et al*, 1996). Em câncer de pulmão, as perdas de função da p16 e pRB são freqüentes e tendem a ser mutuamente exclusivas (Shapiro *et al*, 1995; Kelley *et al*, 1995), o mesmo acontecendo em linhagens celulares de câncer de pulmão de pequenas

células, as quais retêm a p16, mas apresentam mutações no RB1. Nos raros casos em que encontra-se o RB1 em sua forma selvagem, são encontradas alterações na p16 (Sellers & Kaelin Jr, 1997).

Para o rastreamento de mutações no gene p53 foi empregada a técnica de SSCP não radioativo, realizada no aparelho PhastSystem (Pharmacia, Uppsala - Sweden). O procedimento de SSCP tem sido amplamente utilizado por vários investigadores no rastreamento de mutações no gene p53 em um grande número de pacientes (Trecca *et al*, 1994; Bosari *et al*, 1995; Kusser *et al*, 1994; McManus *et al*, 1994). Com a adaptação da técnica à coloração pela prata, é possível a visualização direta das bandas nos géis de poliacrilamida sem a utilização de material radioativo e com redução no tempo para a obtenção dos resultados (Bosari *et al*, 1995). Alguns grupos têm feito uso do SSCP não radioativo nas investigações de mutações no gene p53 em diferentes tipos de câncer (Dobashi *et al*, 1994; Shiao *et al*, 1994), e aparentemente, trata-se de técnica tão sensível quanto o SSCP radioativo, primeiramente descrito por Orita e colaboradores (1989 a e b).

Através do método acima descrito, observou-se mutações no gene p53 em 14,3% (5 em 35) dos pacientes com LMA. Este número se assemelha ao relatado em populações dos EUA e Europa, apesar das diferentes origens étnicas de nossa população e dos diferentes fatores ambientais a que a mesma provavelmente está exposta.

Das sete alterações observadas, cinco são mutações de ponto, que compreendem a maioria das alterações descritas no gene p53. De acordo com o banco de dados mantido por Thierry Soussi (Institut de Genetique Moleculaire - Paris,

França), até meados de 1997 havia 5893 mutações descritas no gene p53, sendo que destas, 4865 são mutações de ponto. Das 5 mutações identificadas em nosso estudo, 3 são transições (codons 245, 248 e 337) e 2 são transversões (codons 141 e 350). A mutação no exon 5, codon 141 é responsável pela substituição de uma cisteína (TGC) por um codon de terminação (TGA), tendo sido relatada em câncer de esôfago (Liang *et al*, 1995) mas não em leucemias. As 2 mutações no exon 7, sendo elas no codon 245 (GGC→AGC) e no codon 248 (CGG→CAG) levam à substituição de uma glicina por uma serina e de uma arginina por uma glutamina, respectivamente. Ambas as mutações já foram relatadas em pacientes com leucemia (Hu *et al*, 1992; Chang *et al*, 1992). Já no caso das mutações no exon 10, de acordo com o banco de dados de Thierry Soussi, elas estão sendo relatadas pela primeira vez na literatura. A mutação no codon 337 (CGC→CAC) é responsável pela substituição do aminoácido arginina por histidina e no codon 350 (CTC→ATC) pela substituição do aminoácido leucina por isoleucina. Esses dados ratificam a porcentagem descrita por diversos investigadores, cujos relatos mostram que a maioria das mutações de ponto no gene p53 é composta por transições e que a maioria das transições são alterações de G:C para A:T (Hu *et al*, 1992; Bühler-Leclerc *et al*, 1993; Dicciani *et al*, 1994; Trecca *et al*, 1994; Wattel *et al*, 1994; Preudhomme *et al*, 1995).

Vários grupos têm relatado a existência de correlação entre mutações no gene p53 e anormalidades no cromossomo 17 (Fenaux *et al*, 1991; Fenaux *et al*, 1992b; Fenaux *et al*, 1992c; Nakai *et al*, 1993). De fato, em leucemias agudas, têm sido freqüentes as descrições de deleção de parte do cromossomo 17 ou do cromossomo 17 como um todo, acompanhadas de mutações no gene p53 (Fenaux *et al*, 1991;

Fenaux *et al*, 1992c; Nakai *et al*, 1993; Kurosawa *et al*, 1995). A inativação da proteína p53 pode ocorrer de três modos diferentes: perda de ambos os alelos normais, um alelo mutante e perda do alelo normal e através de efeito dominante negativo da p53 mutante sobre a p53 normal (Kurosawa *et al*, 1995). No caso de presença de um alelo normal e um alelo mutante, sugere-se o mecanismo “trans-dominante negativo”, onde ambos os alelos produzem a proteína, mas a mutação em um único alelo contribui para a transformação devido ao seqüestro e inativação da proteína selvagem pela forma mutante (Felix *et al*, 1992).

Neste estudo, uma vez que não foi possível a realização da análise citogenética na maioria das amostras é difícil dizer se as mutações estão presentes em heterozigose, homozigose ou hemizigose. Das cinco mutações encontradas, duas, aparentemente, estão presentes em heterozigose (codons 248 e 350) e três em homozigose (codons 141, 245 e 337). As mutações em heterozigose podem refletir tanto a heterozigosidade dos alelos do p53 nas células leucêmicas como a contaminação da amostra com células hematopoéticas normais. A mutação no paciente número 12 (codon 248; tabela V, figura 12), poderia ser um caso de contaminação, uma vez que a intensidade da banda contendo o alelo mutante é bem mais forte do que a do alelo normal, o que não ocorre na mutação do paciente número 33 (codon 350, tabela V, figura 13) em que as duas bandas apresentam a mesma intensidade. Não foi realizada a análise citogenética do paciente número 12, não sendo possível saber se houve perda de um dos alelos do gene, mas, no caso do paciente número 33 a citogenética é normal; logo, ele teria os 2 alelos do gene p53, um normal e um mutante. Os demais pacientes, tanto poderiam ser homozigotos para

a mutação como poderiam ter um alelo mutante e ter perdido o alelo normal. A análise citogenética do paciente número 1 (tabela V, figura 12), que apresenta mutação no codon 245, não apresenta alterações no cromossomo 17, podendo ser um caso de homozigose. O paciente número 35 (mutação no codon 337, tabela V, figura 13) não teve a citogenética realizada, sendo impossível afirmar se a mutação ocorreu em homo ou hemizigose e o paciente número 30 (mutação no codon 141, tabela V, figura 11) apresentou citogenética normal; logo, provavelmente, a mutação está presente em homozigose. Este paciente também apresentou cromossomo Ph¹, o qual é característico de leucemia mielóide crônica mas pode ser encontrado em aproximadamente 2% das LMAs em adultos. Em contraste com as LMAs sem cromossomo Ph¹, as mutações no gene p53 em LMA Ph¹ podem ocorrer independentemente da perda do cromossomo 17p (Nakai *et al*, 1993).

Dos 2 polimorfismos observados, 1 ocorreu no exon 4 (codon 72) e 1 no exon 6 (codon 213). A alteração no codon 72 (CCC→CGC), condizente com a substituição de uma prolina por uma arginina, foi relatada por Buchman *et al* (1988) e está correlacionada com um sítio variável de *Bgl* II no intron 1. Em geral, o alelo menos freqüente encontra-se na forma homozigota e ambas as formas da proteína são funcionais, não havendo evidência, até o momento, de que alguma dessas variantes da p53 estaria ligada à existência de malignidades (Pignon *et al*, 1994). No codon 213 foi observado um polimorfismo silencioso (CGA→CGG, arginina para arginina) o qual abole um sítio de *Taq* I e foi previamente descrito (Pignon *et al*, 1994; Bathia *et al*, 1992).

Vários relatos foram publicados sobre a detecção de mutações no gene p53 em diferentes tipos de câncer, sendo que a maioria desses estudos analisou os exons de números 5 a 8, onde a maioria das mutações está localizada. Ocasionalmente outras regiões foram estudadas e casos raros de mutações foram descritos fora dessas regiões (Pignon *et al*, 1994). Em nosso estudo foram observadas 3 mutações localizadas em regiões consideradas sítios preferenciais para mutações (codons 141, 245 e 248) e 2 mutações novas no exon 10 (codons 337 e 350), região analisada com pouca frequência no rastreamento do gene p53. Mutações no codon 337, levando porém à substituição por diferentes aminoácidos, foram descritas em câncer de fígado, próstata e esôfago (Nishida *et al*, 1993; Chi *et al*, 1994; Tanaka *et al*, 1996), mas não em leucemias. Mutações no codon 350, até onde sabemos, não foram relatadas na literatura. A baixa frequência de mutações nessa região pode se dar pelo não rastreamento usual da região ou por esta não ser uma região considerada como sítio preferencial para mutações (“hot spot”).

Dentre os 35 pacientes com LMA, algumas variáveis foram comparadas com relação à presença ou ausência de mutações no gene p53: idade, raça, sexo, porcentagem de blastos, resposta à terapêutica de indução de remissão, subtipo FAB, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD).

Foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas com relação às variáveis sexo, raça, idade e porcentagem de blastos. Contudo, quando os pacientes foram estratificados em idade < 60 anos e $\geq$ 60 anos, os resultados foram alterados, indicando que pacientes com idade $\geq$ 60 anos teriam uma maior predisposição à aquisição de mutações no gene p53 ($p = 0,026$). Esse resultado

está em concordância com o relato de Fenaux e colaboradores (1992a), cujos dados mostram que 6 de 8 pacientes com mutação tinham mais de 60 anos.

Uma vez que o número de pacientes classificados por cada subtipo FAB era pequeno (6 M1, 15 M2, 1 M3, 7 M4, 4 M5, 2 M7) optou-se por agrupá-los em 2 grupos, sem e com componente monocítico (M1 + M2 e M4 + M5, respectivamente). O único paciente de subtipo M3 e 2 de subtipo M7 não foram incluídos na análise. Temos então um total de 21 pacientes pertencentes ao grupo M1 + M2 e 11 pacientes pertencentes ao grupo M4 + M5. Destes, são portadores de mutação no gene p53 2 pacientes do primeiro grupo e 3 do segundo grupo. Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação à presença ou ausência de mutações no gene p53, resultados semelhantes aos obtidos por Fenaux *et al* (1992a) e Wattel *et al* (1994).

São poucos os trabalhos que abordam o estudo de aspectos clínicos e sua associação com mutações no gene p53 em leucemias agudas (Fenaux *et al*, 1991; Hu *et al*, 1992; Fenaux *et al*, 1992a; Wattel *et al*, 1994; Trecca *et al*, 1994; Kurosawa *et al*, 1995). Apesar da pequena amostra e, conseqüentemente, da dificuldade de análise das variáveis, tentamos investigar possíveis diferenças entre presença ou ausência de mutações e resposta à terapêutica de indução de remissão, sobrevida global e sobrevida livre de doença. Resultados preliminares obtidos a partir desse tipo de estudo poderiam sugerir estudos multicêntricos maiores para comprovação dos resultados. É importante ressaltar que o número de pacientes estudados nesse trabalho, apesar de pequeno, não difere significativamente dos números descritos em vários outros estudos, como nos de: Wattel *et al*, 1994 (107 pacientes); Kurosawa *et al*, 1995 (18 pacientes); Hu *et al*, 1992 (49 pacientes); Fenaux *et al*, 1992a (112

pacientes); Bühler-Leclerc *et al*, 1993 (45 pacientes) e Trecca *et al*, 1994 (70 pacientes).

Os dados obtidos através deste estudo, com relação à proporção de pacientes que obtiveram remissão clínica e hematológica, não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem mutação. Esses resultados são diferentes daqueles obtidos por outros grupos, como Wattel *et al* (1994), que afirmam a existência de associação entre mutações no gene p53 e resposta não adequada à quimioterapia intensiva e a baixas doses de Ara C. Além disso, os 3 casos com mutação e que responderam à quimioterapia tiveram uma remissão curta. Os autores correlacionam também a não resposta à quimioterapia com a presença de cariótipos complexos. Também o grupo de Fenaux (1992a) observou que a resposta ao tratamento dos pacientes com mutação no gene p53 não foi satisfatória. Kurosawa e colaboradores (1995) observaram que os 3 pacientes com mutação no gene p53 em seu estudo não entraram em remissão.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando comparou-se as curvas de sobrevida global entre os grupos com e sem mutação no gene p53 ($p = 0,0226$). Este resultado não foi aparentemente alterado quando os pacientes foram estratificados por idade em $< e \geq 60$ anos e por porcentagem de blastos em $< e \geq 60\%$ de blastos. Levando-se em consideração as limitações já comentadas, como o pequeno número de pacientes e a falta de dados da análise citogenética, pode-se dizer que nossos dados sugerem uma evolução clínica favorável aos pacientes sem mutação quando comparados aos que apresentam mutação no gene p53. Já com relação à sobrevida livre de doença, não foi possível analisar a diferença entre as

curvas, uma vez que apenas 5 pacientes apresentaram mutação, e, destes, somente 1 entrou em remissão. Importa ressaltar que esse paciente teve uma SLD de apenas 90 dias. Estes resultados concordam com a maioria dos estudos que investigaram a existência de mutações no gene p53 e sua correlação com aspectos clínicos dos pacientes. Tanto Wattel *et al* (1994) como Fenaux *et al* (1992a) relatam diminuição da sobrevida dos pacientes com LMA portadores de mutações no gene p53. Os dados de Wattel foram estatisticamente significativos, mostrando que a SG média de pacientes com mutação foi de 2,5 meses contra 15 meses dos pacientes sem mutação ($p < 10^{-5}$). A diferença continuou significativa quando a análise foi restrita a pacientes tratados com quimioterapia intensiva e a pacientes tratados com baixas doses de Ara C. Também em LLAs, confirmou-se que mutações no gene p53 contribuem para um mau prognóstico, pois foram correlacionadas com diminuição da SG e SLD, estão associadas à redução de duração da primeira remissão e à diminuição da taxa de resposta à terapia de reindução, e, além disso, são correlacionadas com diminuição da duração da sobrevida mesmo após terapia de reindução bem sucedida (Diccianni *et al*, 1994).

A correlação positiva entre mutações no gene p53 e aspectos clínicos dos pacientes também pode ser observada em uma variedade de outros tumores, como câncer de mama (Ciesielski *et al*, 1995; Kovach *et al*, 1996), carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Field *et al*, 1991), adenocarcinoma de cólon (Ohue *et al*, 1994), câncer de bexiga (Kusser *et al*, 1994) e outros, confirmando a necessidade do estudo dessas alterações e investigação da possível correlação com o prognóstico do paciente.

A interpretação desses resultados não é conclusiva, como já discutido, indicando a necessidade de estudos com um grande número de pacientes para que possa ser avaliado com maior fidelidade o papel das mutações no gene p53 como indicador de prognóstico em LMAs.

Com relação às LLAs, além de não termos encontrado mutações no gene p53 nos pacientes portadores desse tipo de leucemia, o número de pacientes é extremamente reduzido, não permitindo que se chegue à alguma conclusão. Os dados da literatura indicam uma frequência que varia de 2 a 24% de mutações no gene p53 em LLAs (Fenaux *et al*, 1992c; Mori *et al*, 1992; Felix *et al*, 1992; Wada *et al*, 1993; Diccianni *et al*, 1994; Kawamura *et al*, 1995; Preudhomme *et al*, 1995). Nossos resultados sugerem uma baixa frequência destas mutações a qual só pode ser comprovada com o estudo de um número maior de pacientes.

Investigamos também a hipótese de que pacientes com mutações no oncogene N-ras poderiam ter uma incidência maior de mutações no gene p53, uma vez que há evidências de que o oncogene *ras* e o gene supressor de tumores p53 podem colaborar na indução experimental de tumores (Parada *et al*, 1984), e de que mutações nos genes K-ras e p53 foram encontradas em carcinoma de cólon e são vistas como eventos consecutivos no acúmulo progressivo de lesões genéticas em um modelo de carcinogênese de cólon descrito por Vogelstein *et al* em 1988. O rastreamento de mutações no oncogene N-ras nesses mesmos pacientes foi previamente realizado (Melo *et al*, 1997). Os resultados mostraram que não foi encontrado neste estudo nenhum paciente portador de mutação em ambos os genes. Nossos dados estão de acordo com os achados de Bühler-Leclerc *et al* (1993), que

também não obtiveram nenhum caso com mutação simultânea em ambos os genes, quando estudaram 45 pacientes com LMA e 6 pacientes com MDS. Diversos estudos realizados em tumores sólidos mostraram correlações positivas ou negativas entre mutações nos genes *ras* e *p53*. Lehman *et al* (1991) mostraram que 4/5 linhagens celulares de carcinoma de pulmão que apresentaram mutações no gene *p53*, também apresentaram mutações nos genes *K-ras* ou *N-ras*. Em contraste, Hollstein *et al* (1991) relataram mutações de ponto freqüentes no gene *p53* (44%) e ausência de mutações no oncogene *N-ras* em 34 pacientes com câncer de esôfago. Também Kawamura e colaboradores (1995) investigaram 22 casos de LLA e 5 linhagens celulares. Mutações no gene *p53* foram encontradas em 10% dos casos de LLA ao diagnóstico e em 4 das 5 linhagens celulares. O rastreamento de mutações nos genes *H-*, *K-*, e *N-ras* apontou apenas uma mutação no gene *N-ras* dentre todos os casos, o qual não apresentou mutação no gene *p53*. Mutações nos genes *ras* e *p53* podem ser eventos colaborativos no câncer de pulmão e de cólon, mas parecem não ser comuns em leucemias agudas (Vogelstein *et al*, 1988; Lehman *et al*, 1991; Bühler-Leclerc *et al*, 1993). O fato de muitos trabalhos não encontrarem mutações em ambos os genes concomitantemente, poderia indicar que os dois genes participam de vias independentes de regulação do ciclo celular. Foram estimadas as curvas de sobrevida global para os grupos com e sem mutação em qualquer um dos genes. Através da comparação das curvas pode-se observar que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sugerindo que pacientes portadores de mutação em um ou outro gene apresentam pior prognóstico que pacientes sem essas alterações.

Em razão da interação entre os genes p53 e RB1 no ciclo celular (Kouzarides, 1995), um dos objetivos deste trabalho foi verificar a existência de uma possível associação entre mutações nos dois genes em LMAs. Williams *et al* (1994) relataram que camundongos deficientes tanto para o gene RB1 como para o gene p53 tiveram uma taxa de desenvolvimento do tumor mais rápida e uma taxa de sobrevida menor do que camundongos deficientes para um ou outro gene. Os resultados aqui obtidos, ausência de mutação no gene RB1 e presença de mutações no gene p53 em 14,3% dos pacientes, não permitem que se chegue a conclusões definitivas. Hangaishi *et al* (1996) em um estudo sobre inativação de múltiplos genes supressores de tumores em malignidades linfóides primárias observou que não há correlação entre a inativação dos genes p53 e RB1, indicando que o gene p53 participaria de uma via independente tal como a regulação do “checkpoint” G1 em resposta à lesões no DNA. Já outros investigadores sugerem que mutações no gene p53 poderiam facilitar a perda do gene RB1 (Williams *et al*, 1994). Ainda pode-se pensar na hipótese de que mutações em apenas um dos genes sejam suficientes para levar à desregulação do ciclo celular. Assim, mutações no gene p53 excluiriam mutações no gene RB1 (Sellers & Kaelin, 1997).

A ausência de mutações de ponto no gene RB1 em pacientes com LMA ou LLA sugere que este seja um evento raro nessas neoplasias, fazendo-se necessário, contudo, o estudo concomitante de alterações estruturais e de expressão proteica a fim de uma maior compreensão do papel do gene RB1 em leucemias. Já com relação ao gene p53, a frequência observada de mutações (14,3%) não difere significativamente da observada em outras populações, apesar das possíveis

diferenças ambientais a que estão expostas e das diferentes origens étnicas. Além disso, mutações no gene p53 parecem ser indicativas de evolução clínica não favorável, com diminuição da sobrevida global quando comparada com pacientes sem mutação no gene.

Em seu conjunto, os dados aqui obtidos indicam que estudos envolvendo análises concomitantes de alterações estruturais dos genes e de expressão das proteínas, tornam-se necessários para a elucidação dos mecanismos de ação dos genes supressores de tumores e de possíveis interações entre eles em leucemias agudas.

Conclusões

1. Este é um dos poucos estudos que realizaram o rastreamento de mutações de ponto no gene RB1 nos 27 exons e região promotora em tumores que não o retinoblastoma. Além disso, foi possível a adaptação da técnica de CSGE para o rastreamento de mutações no referido gene, permitindo o uso de um novo método que dispensa a utilização de material radioativo. A ausência de mutações no gene RB1 em pacientes com LMA sugere que este seja um evento raro nesse tipo de neoplasia. Contudo, faz-se necessário o estudo concomitante de alterações estruturais no gene tanto por meio de “Southern blot” como por meio de técnicas mais sensíveis e de expressão proteica, na tentativa de uma maior compreensão do papel do gene RB1 nas leucemias.

2. A frequência observada de mutações no gene p53 em 35 pacientes portadores de leucemia mielóide aguda foi de 14,3% (5 em 35). Esta frequência não difere significativamente das observadas em outras populações, como as populações norte-americana e européia. Tais dados sugerem que a população brasileira não se comportaria de maneira diferente de outras populações, com relação à presença de mutações no gene p53, apesar dos possíveis fatores ambientais a que estão expostas e das diferentes origens étnicas.

3. Os resultados encontrados nos pacientes com LLA sugerem uma frequência reduzida de mutações no gene p53 nesse tipo de leucemia, que deverá ser comprovado através do estudo de um número maior de pacientes.

4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem mutação no gene p53, quando comparadas as variáveis sexo, raça, idade e resposta à terapêutica de indução de remissão. Quando os pacientes foram estratificados por idade, $< e \geq 60$ anos, os resultados foram alterados, sugerindo que pacientes com idade maior ou igual a 60 anos teriam uma maior probabilidade de apresentar mutações no gene p53.

5. Foi observada diferença estatisticamente significativa quando as curvas de sobrevida global foram comparadas entre os grupos com e sem mutação no gene p53. Esse dado sugere evolução clínica favorável, com maior sobrevida global, para os pacientes sem mutação quando comparados com os pacientes com mutação no gene p53. Não foi possível fazer a comparação da sobrevida livre de doença entre os dois grupos por motivos expostos na sessão de resultados do trabalho.

6. Não houve nenhum caso de mutação nos genes *N-ras* e p53 simultaneamente, mas a comparação das curvas de sobrevida global entre os grupos com e sem mutação em qualquer um dos genes também sugere que a sobrevida global seja maior nos pacientes sem mutação do que nos pacientes com mutação.

7. Também não foi possível concluir que exista alguma correlação entre alterações nos genes p53 e RB1 em leucemias agudas, sugerindo-se a realização de estudos multicêntricos com um maior número de pacientes e avaliação de alterações tanto estruturais como proteicas em ambos os genes.

Referências Bibliográficas

- Ahuja HG, Jat PS, Foti A, Bar-Eli M & Cline MJ. Abnormalities of the retinoblastoma gene in the pathogenesis of acute leukemia. *Blood* 1991;**78**:3259-3268.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C. Proposals for classification of the acute leukaemias: French-American-British (FAB) Cooperative Group. *British Journal of Haematology* 1976;**33**:451-458.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): a report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* 1985a;**103**:460-462.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* 1985b;**103**:626-629.
- Bhatia K, Gutiérrez MI, Huppi K & Magrath IT. PCR detection of a neutral CGA/CGG dimorphism in exon 6 of the human p53 gene. *Nucleic Acids Research* 1992;**20**:928.
- Blanquet V, Turleau C, Goossens M & Besmond C. A new G to T polymorphism in the retinoblastoma gene RB1 detected by DGGE. *Nucleic Acids Research* 1992;**20**:1432.
- Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Sénamaud-Beaufort C, Doz F & Besmond C. Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non-hereditary retinoblastoma. *Human Molecular Genetics* 1995;**4**:383-388.

- Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE & Lee W-H. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;**87**:7762-7766.
- Bosari S & Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Archives* 1995;**427**:229-241.
- Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G & Coggi G. Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. *Diagnostic Molecular Pathology* 1995;**4**:249-255.
- Buchman VJ, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP & Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 1988;**70**:245-252.
- 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 HR, 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. *Seminars in Hematology* 1991;**28**(3, Suppl. 4):76-79.
- Bühler-Leclerc M, Gratwohl A & Senn H. Occurrence of point mutations in p53 gene is not increased in patients with acute myeloid leukaemia carrying an activating N-ras mutation. *British Journal of Haematology* 1993;**84**:443-450.
- Chang F, Syrjänen S & Syrjänen K. Implications of the p53 tumor suppressor gene in clinical oncology. *Journal of Clinical Oncology* 1995;**13**:1009-1022.

- Chang Y-S, Lin Y-J, Tsai C-N, Shu C-H, Tsai M-S, Choo K-B & Liu S-T. Detection of mutations in the p53 gene in human head and neck carcinomas by single strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Letters* 1992,**67**:167-174.
- Chen YC, Chen PJ, Yeh SH, Tien HF, Wang C, Tang H & Hong RL. Deletion of the human retinoblastoma gene in primary leukemias. *Blood* 1990,**76**:2060-2064.
- Cheng J, Scully P, Shew J-Y, Lee W-H, Vila V & Haas M. Homozygous deletion of the retinoblastoma gene in an acute lymphoblastic leukemia (T) cell line. *Blood* 1990,**75**:730-735.
- Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ, Sawitsky A, Stass S, Weinstein H & Woods WG. Report of the National Cancer Institute - Sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1990,**8**:813-819.
- Chi S-G, White RWV, Meyers FJ, Siders DB, Lee F & Gumerlock PH. p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *Journal of the National Cancer Institute* 1994,**86**:926-933.
- Ciesielski D, Dziwulska-Bokiniek A, Zoltoeska A, Roszkiewicz A, Kopacz A & Wojtacki J. p53 expression in breast cancer related to prognostic factors. *Neoplasma* 1995,**42**:235-237.
- Cline MJ. The molecular basis of leukemia. *The New England Journal of Medicine* 1994,**330**:328-336.
- Collett D. Modelling survival data in medical research. (1994) Chapman & Hall, Londres.
- Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973,**70**:3324-3328.

- Conover WJ. Practical nonparametric statistics. (1971) John Wiley & Sons, Nova York.
- Constanzi E, Erwenne CM & Armelin MCS. PCR detection of Xba1 polymorphism in the human Rb gene of retinoblastoma patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1993;**26**:1031-1036.
- Cotton RGH. Current methods of mutation detection. *Mutation Research* 1993;**285**:125-144.
- Cowell JK & Hogg A. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1992;**64**:1-11.
- Cox LS & Lane DP. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssays* 1995;**17**:501-508.
- Dacie JV & Lewis SM. *Practical Haematology*. (1984) 6a edição, Churchill-Livingstone, New York.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew J-Y, Huang C-M, Lee W-H, Marsilio E, Paucha E & Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988;**54**:275-283.
- Diamandis EP. Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene. *Clinica Chimica Acta* 1995;**237**:79-90.
- Dicciani MB, Yu J, Hsiao M, Mukherjee S, Shao L-E & Yu AL. Clinical significance of p53 mutations in relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994;**84**:3105-3112.
- Dobashi Y, Sugimura H, Sakamoto A, Mernyei M, Mori M, Oyama T & Machinami R. Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology* 1994;**3**:9-14.

- Dyson N & Harlow E. The molecular biology of the retinoblastoma protein. Em: *Molecular Genetics of Ocular Diseases*, 1995, pp:183-200. Wiley-Liss, Inc., New York - N.Y.
- Dyson N, Howley PM, Münger K & Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989,**243**:934-937.
- Elledge RM & Lee W-H. Life and death by p53. *BioEssays* 1995,**17**:923-930.
- Felix CA, D'Amico D, Mitsudomi T, Nau MM, Li FP, Fraumeni JF, Cole DE, McCalla J, Reaman GH & Whang-Peng J, Knutsen T, Minna JD & Poplack DG. Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees. *The Journal of Clinical Investigation* 1992;**90**:653-658.
- Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, Jonveaux P, Lai JL, Vanrumbeke M, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R & Kerckaert JP. Mutations of the p53 gene in acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology* 1992a,**80**:178-183.
- Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai jl, Pignon JM, Loucheaux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R & Kerckaert JP. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991;**78**:1652-1657.
- Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Quiquandon I, Jonveaux P, Vanrumbeke M, Sartiaux C, Morel P, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R & Kerckaert JP. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992b,**6**:246-250.
- Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Preudhomme C, Lai JL, Vanrumbke M, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R & Kerckaert. Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoblastic acute leukemia: a report on 60 cases. *Leukemia* 1992c,**6**:42-46.

- Feugeas O, Guriec N, Babin-Boilletot, Marcellin L, Simon P, Babin S, Thyss A, Hofman P, Terrier P, Kalifa C, Brunat-Mentigny M, Patricot L-M & Oberling F. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology* 1996;**14**:467-472.
- Field JK, Spandidos DA, Malliri A, Gosney JR, Yiagnisis M & Stell PM. Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *British Journal of Cancer* 1991;**64**:573-577.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM & Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;**323**:643-646.
- Fung CY & Fisher DE. p53: from molecular mechanisms to prognosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1995;**13**:808-811.
- Gaidano G, Serra A, Guerrasio A, Rege-Cambrin G, Mazza U & Saglio G. Genetic analysis of p53 and RB1 tumor-suppressor genes in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Annals of Hematology* 1994;**68**:3-7.
- Gallie BL, Dunn JM, Hamel PA, Muncaster M, Cohen B & Phillips RA. How do retinoblastoma tumours form? *Eye* 1992;**6**:226-231.
- Gallie BL, Dunn JM, Chan HSL, Hamel PA & Phillips RA. The genetics of retinoblastoma. *Pediatric Clinics of North America* 1991;**38**:299-315.
- Ganguly A, Rock MJ & Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;**90**:10325-10329.
- Ginsberg AM, Raffeld M & Cossman J. Inactivation of the retinoblastoma gene in human lymphoid neoplasms. *Blood* 1991;**77**:833-840.

- Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W, Lee EY-HP & Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;**67**:293-302.
- Grierson AJ, Hodgkins MA, Hancock BW, Goepel JR, Royds J & Goyns MH. Investigation of the RB-1 tumour suppressor gene in a United Kingdom series of non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1996;**23**:353-363.
- Guinn B & Padua RA. Do p53 mutations have a role in the initiation and progression of leukemia? *The Cancer Journal* 1997;**8**:1-9.
- Hall M & Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research* 1996;**68**:67-108.
- Hangaishi A, Ogawa S, Imamura N, Miyawaki S, Miura Y, Uike N, Shimazaki C, Nobuhiko E, Takeyama K, Hirosawa S, Kamada N, Kobayashi Y, Takemoto Y, Kitani T, Toyama K, Ohtake S, Yasaki Y, Ueda R & Hirai H. Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16^{INK4A}/CDKN2, MTS2/p15^{INK4B}, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood* 1996;**87**:4949-4958.
- Harris CC. P53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993;**262**:1980-1981.
- Hartwell LH & Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;**266**:1821-1828.
- Hartwell LH & Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;**246**:629-634.
- Hatta Y, Yamada Y, Tomonaga M & Koefler HP. Extensive analysis of the retinoblastoma gene in adult T cell leukemia/lymphoma (ATL). *Leukemia* 1997;**11**:984-989.

- He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS & James CD. CDK4 amplification is an alternative mechanism to *p16* gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Research* 1994;**54**:5804-5807.
- Hellman S. Oncology . *The Lancet* 1997;**349** - Supplement (Maio):1-30.
- Hijiya N & Gewirtz AM. Oncogenes, protooncogenes, and tumor suppressor genes in acute myelogenous leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1995;**17**:101-112.
- Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Bodenstein H, Plaumann L, Büchner T, Urbanitz D, Koch P, Heimpel H, Engelhardt R, Müller U, Wendt FC, Sodomann H, Rühl H, Herrmann F, Kaboth W, Dietzelbinger H, Pralle H, Lunsken C, Hellriegel KP, Spors S, Nowrousian RM, Fischer J, Fülle H, Mitrou OS, Pfreundschuh M, Görg C, Emmerich B, Queisser W, Meyer P, Labedzke 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* 1984;**64**:38-47.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B & Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;**253**:49-53.
- Hoppe-Seyler F & Butz K. Molecular mechanisms of virus-induced carcinogenesis: the interaction of viral factors with cellular tumor suppressor proteins. *Journal of Molecular Medicine* 1995;**73**:529-538.
- Horowitz JM, Yandell DW, Park S-H, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA & Dryja TP. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989;**243**:937-940.

- Horowitz JM, Park S-H, Bogenmann E, Cheng J-C, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP & Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990,**87**:2775-2779.
- Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1992,**63**:1-7.
- Horsthemke B, Greger V, Barnert HJ, Höpping W & Passarge E. Detection of submicroscopic deletions and a DNA polymorphism at the retinoblastoma locus. *Human Genetics* 1987;**76**:257-261.
- Hu G, Zhang W & Deisseroth AB. P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* 1992,**81**:489-494.
- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM & Collins P. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16^{INK4A}, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 1996,**13**:1065-1072.
- Imamura J, Miyoshi I & Koeffler P. p53 in Hematologic Malignancies. *Blood* 1994,**84**:2412-2421.
- Jamal R. The retinoblastoma gene in myeloid leukaemias. *Hematology* 1996,**1**:43-51.
- Jamal R, Gale RE, Shaun N, Thomas NSB, Wheatley K & Linch DC. The retinoblastoma gene (rb1) in acute myeloid leukaemia: analysis of gene rearrangements, protein expression and comparison of disease outcome. *British Journal of Haematology* 1996,**94**:342-351.
- Jenkins JR, Rudge K & Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984,**312**:651-654.

- Kawamura M, Kikuchi A, Kobayashi S, Hanada R, Yamamoto K, Horibe K, Shikano T, Ueda K, Hayashi K, Sekiya T & Hayashi Y. Mutations of the p53 and *ras* genes in childhood t(1;19)-acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;**85**:2546-2552.
- Kaye FJ, Kratzke RA, Gerster JL & Horowitz JM. A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;**87**:6922-6926.
- Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A & Johnson BE. Differential inactivation of CDKN2 and Rb protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 1995;**87**:756-761.
- Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ & Look AT. Coamplification of the *CDK4* gene with *MDM2* and *GLI* in human sarcomas. *Cancer Research* 1993;**53**:5535-5541.
- Knudson Jr AG. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971;**68**:820-823.
- Koh J, Enders GH, Dynlacht BD & Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 1995;**375**:506-510.
- Kornblau SM, Xu H-J, del Giglio A, Hu S-X, Zhang W, Calvert L, Beran M, Estey E, Andreeff M, Trujillo J, Cork MA, Smith TL, Benedict WF & Deisseroth AB. Clinical Implications of decreased retinoblastoma protein expression in acute myelogenous leukemia. *Cancer Research* 1992;**52**:4587-4590.
- Kornblau SM, Xu H-J, Zhang W, Hu S-X, Beran M, Smith TL, Hester J, Estey E, Benedict WF & Deisseroth AB. Levels of retinoblastoma protein expression in newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994;**84**:256-261.

- Kouzarides T. Functions of pRB and p53: what's the connection? *Trends in Cell Biology* 1995;**5**:448-450.
- Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D & Sommer SS. Mutation detection y highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;**93**:1093-1096.
- Kurosawa M, Okabe M, Kunieda Y & Asaka M. Analysis of the p53 gene mutations in acute myelogenous leukemia: the p53 gene mutations associated with a deletion of chromosome 17. *Annals of Hematology* 1995;**71**:83-87.
- Kusser WC, Miao X, Glickman BW, Friedland J, Rothman N, Hemstreet GP, Mellot J, Swan DC, Schulte PA & Hayes RB. P53 mutations in human bladder cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1994;**24**:156-160.
- Lalande M, Dryja TP, Schreck RR, Shipley J, Flint A & Latt SA. Isolation of human chromosome 13-specific DNA sequences cloned from sorted chromosomes and potentially linked to the retinoblastoma locus. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1984;**13**:283-295.
- Lamb P & Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Molecular and Cellular Biology* 1986;**6**:1379-1385.
- Lane DP & Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;**278**:261-263.
- Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Young L-j, Shew J-Y & Lee EY-HP. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* 1987;**235**:1394-1399.
- Lee W-H, Bookstein R & Lee EY-HP. Studies on the human retinoblastoma susceptibility gene. *Journal of Cellular Biochemistry* 1988a;**38**:213-227.

- Lee EY-HP, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P & Lee W-H. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1988b,**241**:218-221.
- Lee EY-HP, Chang C-Y, Hu N, Wang Y-C J, Lai C-C, Herrup K, Lee W-H & Bradley A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992,**359**:288-294.
- Lee JM & Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer and Metastasis Reviews* 1995,**14**:149-161.
- Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV, Ullrich S, Romano JW, Appella E, Testa JR, Gerwin BI & Harris CC. P53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Research* 1991;**51**:4090-4096.
- Levine AJ. Tumor suppressor genes. *Scientific American Science & Medicine* 1995,**2**:28-37.
- Lewin B. Oncogenes: gene expression and cancer. Em: Genes V (1994), Oxford University Press Inc., New York.
- Liang Y-Y, Esteve A, Martel-Planche G, Takahashi S, Lu S-H, Montesano R & Hollstein M. p53 mutations in esophageal tumors from high-incidence areas of China. *International Journal of Cancer* 1995;**61**:611-614.
- Linzer DIH & Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979,**17**:43-52.
- Lister TA, Rohatiner AZS, Bassan R, Gregory W, Willis L, Barnett MJ, Waxman J, Richards MA, Ganesan TS, Tucker J, Malik S, Biruls R & Amess J. Conventional dose cytosine arabinoside in combination chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Seminars in Hematology* 1987,**14**:53-54.

- Lohman DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E & Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *American Journal of Human Genetics* 1996;**58**:940-949.
- Lorand IGH, Souza CA & Costa FF. Hematological toxicity associated with agricultural chemicals. *Lancet* 1984;**1**:404.
- Ludwig L, Schulz AS, Janssen JWG, Grünewald K & Bartram C. p53 mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1992;**6**:1302-1304.
- McGee TL, Yandell DW & Dryja TP. Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 1989;**80**:119-128.
- McManus DT, Yap EPH, Maxwell P, Russel SEH, Toner PG & McGee JOD. P53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. *Journal of Pathology* 1994;**174**:159-168.
- Melo, M.B.; Lorand-Metze, I.; Lima, C.S.P.; Saad, S.T.O. & Costa, F.F. N-ras gene point mutations in Brazilian acute myelogenous leukemia patients correlate with a poor prognosis. *Leukemia and Lymphoma* 1997;**24**:309-317.
- Mohabeer AJ, Hiti AL & Martin WJ. Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "PhastSystem". *Nucleic Acids Research* 1991;**19**:3154.
- Mori N, Hidai H, Yokota J, Okada M, Motoji T, Oshimi K & Mizoguchi H. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome and overt leukemia. *Leukemia Research* 1995;**19**:869-875.
- Mori N, Wada M, Yokota J, Terada M, Okada M, Teramura M, Masuda M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K & Mizoguchi H. Mutations of the p53 tumour suppressor gene in haematologic neoplasms. *British Journal of Haematology* 1992;**81**:235-240.

- Murakami Y, Katahira M, Makino R, Hayashi K, Hirohashi S & Sekiya T. Inactivation of the retinoblastoma gene in a human lung carcinoma cell line detected by single-strand conformation polymorphism analysis of the polymerase chain reaction product of cDNA. *Oncogene* 1991;**6**:37-42.
- Nakai H, Misawa S, Tanaka S, Nishigaki H, Taniwaki M, Yokota S, Horiike S, Takashima T, Seriu T, Nakagawa H, Fujii H, Shimazaki C, Okada H, Toguchida J, Ishizaki K, Abe T & Kashima K. p53 gene mutations and loss of a chromosome 17p in Philadelphia chromosome (Ph¹)-positive acute leukemia. *Leukemia* 1993;**7**:1547-1551.
- Nishida N, Fuuda Y, Kokuryu H, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Imura H & Ishizaki K. Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 1993;**53**:368-372.
- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD & Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1993;**8**:1063-1067.
- Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K & Sakai T. Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1997;**98**:43-49.
- Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, Yana I, Ohnishi T, Enomoto T, Inoue M, Shimano T & Mori T. A frequent alteration of the p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Research* 1994;**54**:4798-4804.
- Onadim Z & JK Cowell. Application of PCR amplification of DNA from paraffin embedded tissue sections to linkage analysis in familial retinoblastoma. *Journal of Medical Genetics* 1991;**28**:312-316.

- Onadim Z, Hungerford J & Cowell JK. Follow-up of retinoblastoma patients having prenatal and perinatal predictions for mutant gene carrier status using intragenic polymorphic probes from the RB1 gene. *British Journal of Cancer* 1992;**65**:711-716.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand coformation-polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989a;**86**:2766-2770.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T & Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989b;**5**:874-879.
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D & Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* 1984;**312**:649-651.
- Philips RA, Gill RM, Zacksenhaus E, Bremner R, Jiang Z, Sopta M, Gallie BL & Hamel PA. Why don't germline mutations in RB1 predispose to leukemia? *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1992;**182**:485-491.
- Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinem M, Kosma V-M & Syrjänen K. Expression of retinoblastoma gene protein (Rb) in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *European Journal of Cancer* 1995;**31**:329-333.
- Pignon JM, Vinatier I, Fanen P, Jonveaux P, Tournilhac O, Imbert M, Rochant H & Goossens M. Exhaustive analysis of the p53 gene coding sequence by denaturing gradient gel electrophoresis: application to the detection of point mutations in acute leukemias. *Human Mutation* 1994;**3**:126-132.

- Preudhomme C, Vachee A, Lepelley P, Vanrumbeke M, Zandecki M, Quesnel B, Cosson A & Fenaux P. Inactivation of the retinoblastoma gene appears to be very uncommon in myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* 1994;**87**:61-67.
- Preudhomme C, Dervite I, Wattel E, Vanrumbeke M, Flactif M, Lai JC, Hecquet B, Coppin MC, Nelken B, Gosselin B & Fenaux P. Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. *Journal of Clinical Oncology* 1995;**13**:812-820.
- Prokocimer M & Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood* 1994;**84**:2391-2411.
- Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE & Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Research* 1992;**52**:4828-4831.
- Riley DJ, Lee EY-HP & Lee W-H. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annual Review of Cellular Biology* 1994;**10**:1-29.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;**239**:487-491.
- Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD & Dryja TP. Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 1991;**353**:8386.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (1989), 2a edição, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sauerbrey A, Stämmler G, Zintl F & Volm M. Expression and prognostic value of the retinoblastoma tumour suppressor gene (RB-1) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 1996;**94**:99-104.

- Schubert EL & Hansen MF. A previously unknown polymorphism located within the RB1 locus only present in Asian individuals. *Human Heredity* 1996;**46**:118-120.
- Sellers WR & Kaelin Jr WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1997;**15**:3301-3312.
- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ & Rollins BJ. Reciprocal Rb inactivation and p16^{INK4} expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Research* 1995;**55**:505-509.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;**274**:1672-1677.
- Sherr CJ & Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* 1995;**9**:1149-1163.
- Shiao Y-H, Rugge M, Correa P, Lehmann HP & Scheer WD. P53 alteration in gastric precancerous lesions. *American Journal of Pathology* 1994;**144**:511-517.
- Shimizu T, Toguchida J, Kato MV, Kaneko A, Ishizaki K & Sasaki MS. Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *American Journal of Human Genetics* 1994;**54**:793-800.
- Sidransky D & Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Annual Review of Medicine* 1996;**47**:285-301.
- Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, Chiba S, Mano H, Takaku F, Yazaki Y & Hirai H. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood* 1993;**81**:3022-3026.
- Szijas I, Lohmann DR, Parma DL, Brandt B & Horsthemke B. Identification of RB1 germline mutations in Argentinian families with sporadic bilateral retinoblastoma. *Journal of Medical Genetics* 1995;**32**:475-479.

- Tanaka H, Shibagaki I, Shimada Y, Wagata T, Imamura M & Ishizaki K. Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: increased frequency and different spectrum of mutations from primary tumors. *International Journal of Cancer* 1996;**65**:372-376.
- Tang J-L, Yeh S-H, Chen P-J, Lin M-T, Tien H-F & Chang Y-. Inactivation of the retinoblastoma gene in acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* 1992;**82**:502-507.
- Tlsty TD, Briot A, Gualberto A, Hall I, Hess S, Hixon M, Kuppuswamy D, Romanov S, Sage M & White A. Genomic instability and cancer. *Mutation Research* 1995;**337**:1-7.
- Trecca D, Longo L, Biondi A, Cro L, Calori R, Grignani F, Maiolo AT, Pelicci PG & Neri A. Analysis of p53 gene mutations in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 1994;**46**:304-309.
- Tricoli JV, Gumerlock PH, Yao JL, Chi S-G, D'Souza AD, Nestok BR, deVere White RW & The Cooperative Prostate Network, National Cancer Institute. Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1996;**15**:108-114.
- Tsuchita K, Hotta T, Ichikawa A & Saito H. Mutation of the p53 gene does not play a role in myelodysplastic syndrome and its transformation to acute leukemia. *British Journal of Haematology* 1992;**81**:456-457.
- Velculescu VE & El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clinical Chemistry* 1996;**42**:858-868.
- Vogelstein B & Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 1993;**9**:138-141.

- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM & Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine* 1988;**319**:525-532.
- Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya MH, Chen DL, Borenstein J, Miller CW, Ludwig L, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Mizoguchi H & Koeffler P. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;**82**:3163-3169.
- Wahlin A, Hörnsten P & Jonsson H. Remission rate and survival in acute myeloid leukemia: impact of selection and chemotherapy. *European Journal of Haematology* 1991;**46**:240-247.
- Waller CA & MacLennan ICM. Analysis of lymphocytes in blood and tissue. In: *Thompson, techniques in clinical immunology* 1977, pp. 170-195 - Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P & Fenaux P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994;**84**:3148-3157.
- Weide R, Parviz B, Pflüger K-H & Havemann K. Altered expression of the human retinoblastoma gene in monocytic leukaemias. *British Journal of Haematology* 1993;**83**:428-432.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;**254**:1138-1177.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;**81**:323-330.
- Wiggs J, Nordenskjöld M, Yandell D, Rapaport J, Grondin V, Janson M, Werelius B, Petersen R, Craft A, Riedel K, Liberfarb R, Walton D, Wilson W & Dryja TP. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *New England Journal of Medicine* 1988;**318**:151-157.

- Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT & Jacks T. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nature Genetics* 1994;**7**:480-484.
- Williams CJ, Rock M, Considine E, McCarron S, Gow P, Ladda R, McLain D, Michels VM, Murphy W, Prockop DJ & Ganguly A. Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of a fourth family with the COL2A1 Arg519→Cys base substitution using conformation sensitive gel electrophoresis. *Human Molecular Genetics* 1995;**4**:309-312.
- Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie-Rosell A, Buckley EG & Dryja TP. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *The New England Journal of Medicine* 1989;**321**:1689-1695.
- Yandell DW & Dryja TP. Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *American Journal of Human Genetics* 1989;**45**:547-555.
- Yokota J, Akiyama T, Fung Y-K, Benedict WF, Namba Y, Hanaoka M, Wada M, Terasaki T, Shimosato Y, Sugimura T & Terada M. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988;**3**:471-475.
- Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Vanrumbeke M, Vachee A, Quesnel B, Lai JL, Cosson A & Fenaux P. The retinoblastoma gene (RB-1) status in multiple myeloma: a report on 35 cases. *Leukemia and Lymphoma* 1995;**18**:497-503.
- Zhu Y-M, Bradbury D & Russell N. Decreased retinoblastoma protein expression in acute myeloblastic leukaemia is associated with the autonomous proliferation of clonogenic blasts. *British Journal of Haematology* 1994;**86**:533-539.

Anexos

ANEXO I

Tratamento quimioterápico para pacientes com LMA

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

Pacientes com idade menor 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 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: 2 g/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/m^2 IV a cada 12 horas nos dias 1 a 7;
- daunorrubicina: $45 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV nos dias 5 a 7;
- tioguanina: 100 mg/m^2 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 daunorrubicina, tioguanina ou ciclofosfamida, de acordo com as dosagens descritas abaixo:

Manutenção I:

- citosina-arabinosídeo: 100 mg/m^2 subcutâneo (SC) a cada 12 horas nos dias 1 a 5
- daunorrubicina: $45 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ IV nos dias 3 e 4

Manutenção II:

- citosina-arabinosídeo: como na manutenção I
- tioguanina: $200 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ VO nos dias 1 a 5

Manutenção III:

- citosina-arabinosídeo: como na manutenção I
- ciclofosfamida: $1 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ VO no dia 3

Pacientes com idade maior ou igual a 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/m^2 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/m^2 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 com o protocolo estabelecido para a manutenção da remissão com duração de 24 meses. Consta de ciclos mensais de citosina-arabinosídeo combinada alternadamente com daunorrubicina, tioguanina ou ciclofosfamida, de acordo com as dosagens descritas abaixo:

Manutenção I:

- citosina-arabinosídeo: $100 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ subcutâneo (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 mg/m²/dia IV no dia 3

Tratamento quimioterápico para pacientes com LLA

O tratamento quimioterápico constou de três fases distintas: indução, consolidação, profilaxia do sistema nervoso central e manutenção da remissão (modificado de Hoelzer *et al*, 1984).

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 a 26, dividido em três doses;
- vincristina: 1,5 mg/m²/dia IV (máximo de 2 mg) nos dias 1, 8, 15 e 22;
- daunoblastina 45 mg/m²/dia IV nos dias 1, 8, 15 e 22
- l-asparaginase: 5000 U/m²/dia intra-muscular (IM) do dia 1 ao dia 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 no dia 29 a 56

Receberam como profilaxia do sistema nervoso central a administração intratecal de methotrexate (10 mg/m^2 nos dias 31, 36, 45 e 52) e a radioterapia craniana (2400 r, divididos em doses, do dia 29 a 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/m^2 VO diariamente
- methotrexate: $20 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ 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 a 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)

- ciclofosfamida $650 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ 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);
- thioguanina: $60 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ VO do dia 29 ao 42.

ANEXO II

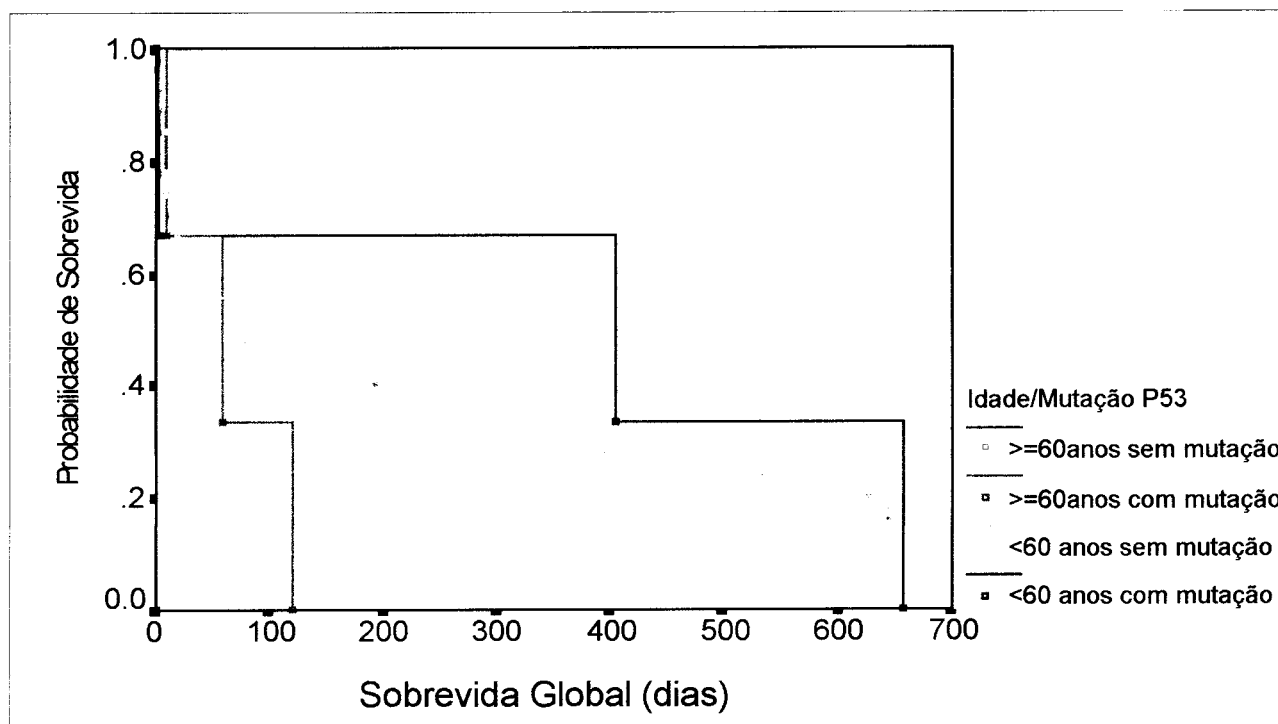


Figura 1. Curvas de sobrevida global para presença ou ausência de mutação no gene p53 após estratificação dos pacientes por grupo etário (a curva dos pacientes <60 anos com mutação sobrepõe o eixo y).

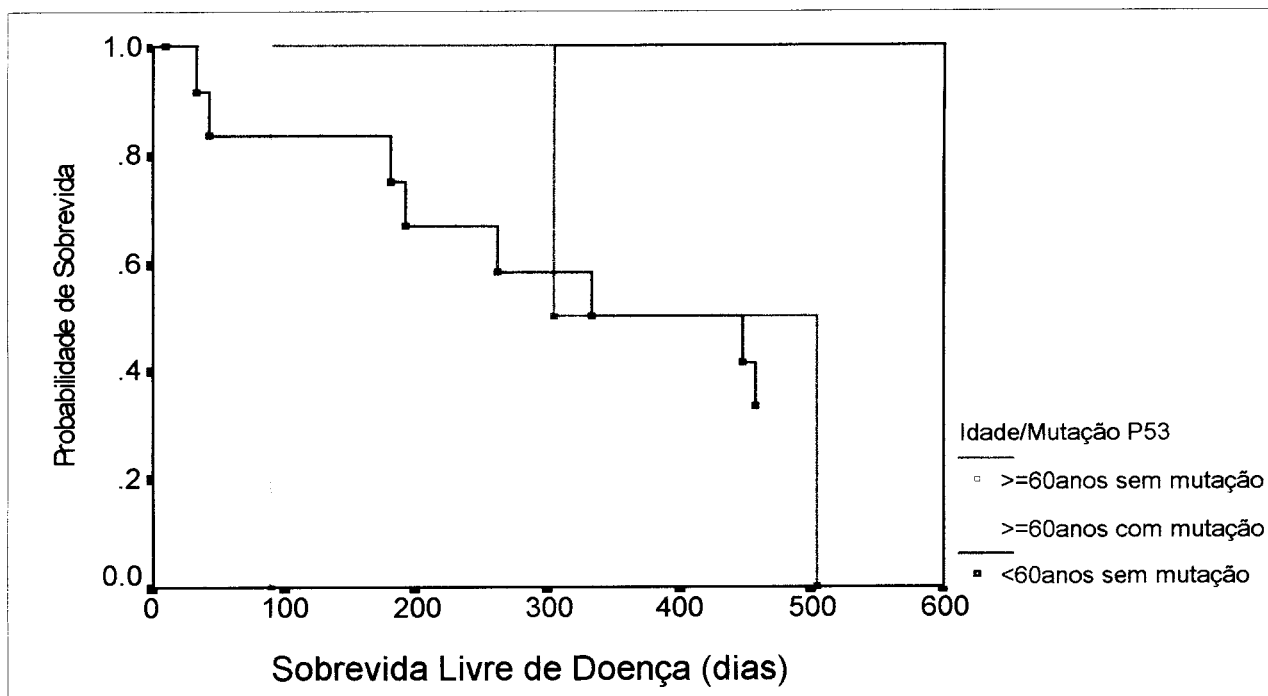


Figura 2. Curvas de sobrevida livre de doença para presença ou ausência de mutação no gene p53 após estratificação dos pacientes por grupo etário.

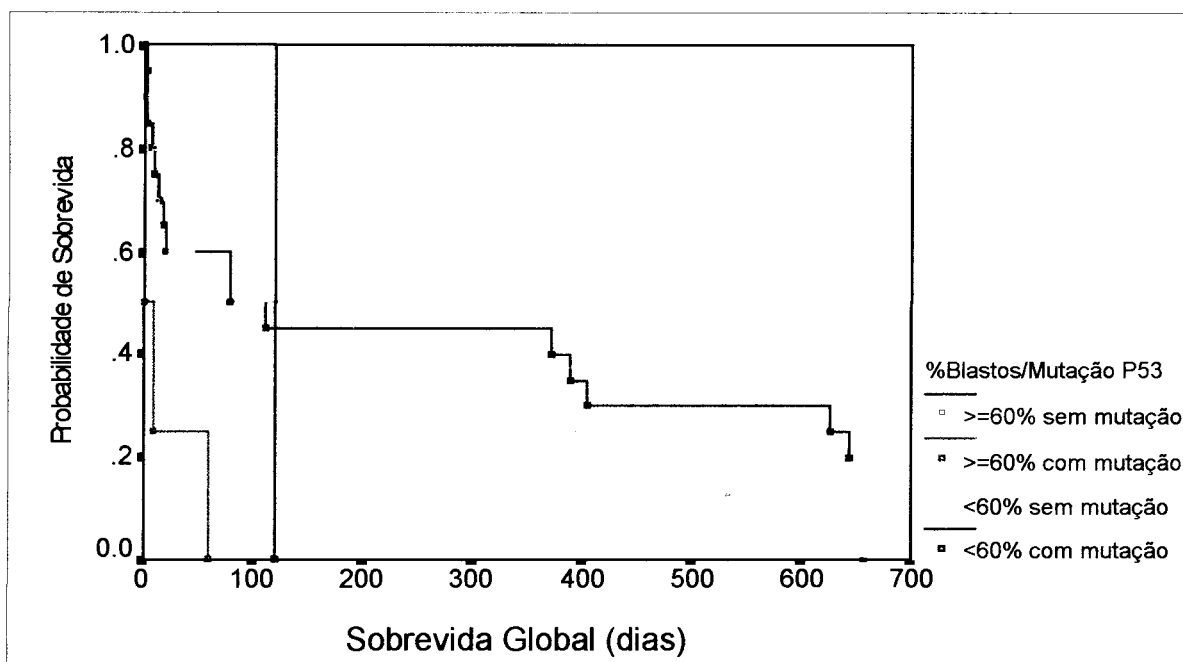


Figura 3. Curvas de sobrevida global para presença ou ausência de mutação no gene p53 após estratificação dos pacientes por porcentagem de blastos.

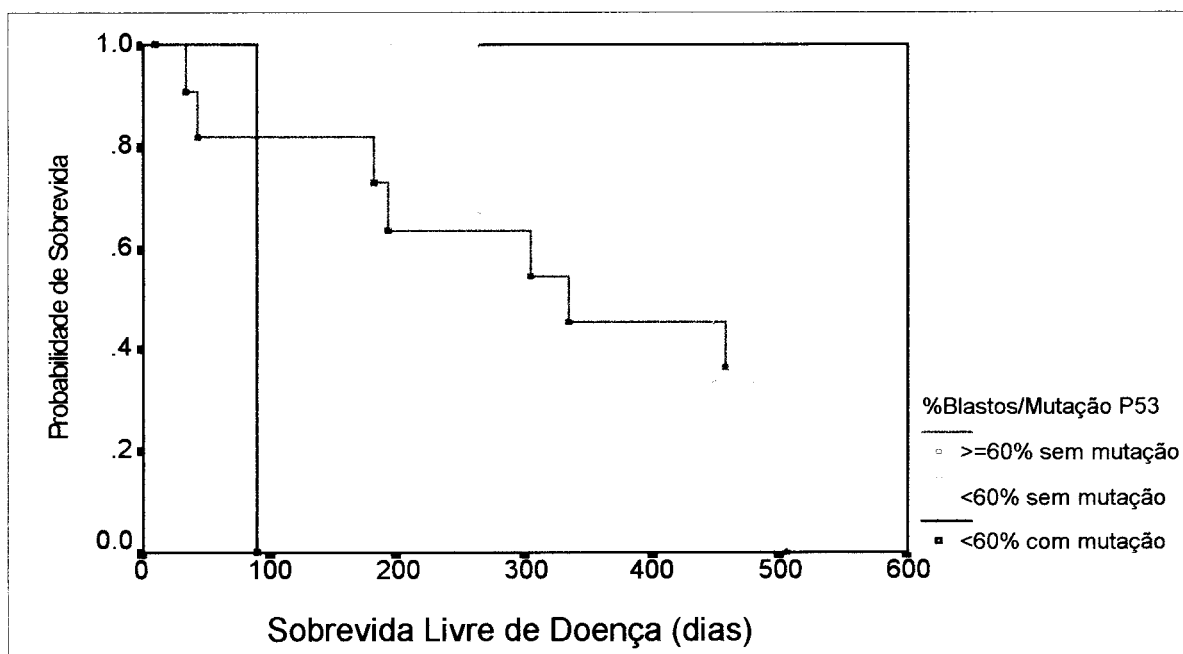


Figura 4. Curvas de sobrevida livre de doença para presença ou ausência de mutação no gene p53 após estratificação dos pacientes por porcentagem de blastos.