



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia - Nível Mestrado

**ESTUDO DO POLIMORFISMO NO CODON 72 DO GENE TP53 NA
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E ASSOCIAÇÃO COM
POSSÍVEL RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IMATINIBE**

JEANY CAMELO SANTOS

Goiânia • 2013

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Pós-Graduação em Biologia

**ESTUDO DO POLIMORFISMO NO CODON 72 DO GENE TP53 NA
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA E ASSOCIAÇÃO COM
POSSÍVEL RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IMATINIBE**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientanda: Jeany Camelo Santos

Orientadora: Dra. Lídia Andreu Guillo

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

Santos, Jeany Camelo.
S237e Estudo do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* na Leucemia Mielóide Crônica e associação com possível resposta ao tratamento com imatinibe [manuscrito] / Jeany Camelo Santos. - 2013.
xv, 103 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2013.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices.

1. Leucemia Mielóide Crônica – Gene TP 53 – Códon 72. 2. Frequências alélicas – Polimorfismo TP 53. 3. Frequências genotípicas – TP 53. 4. Imatinibe (Fármaco). I.Título.

CDU: 616.155.392

*Abrirei rios nos altos desnudados, e fontes no meio dos vales;
Tornarei o deserto num lago d'água, e a terra seca em mananciais (Isaías 41:18).*

*Aos pacientes com LMC que com
alegria e prontidão concordaram em participar desta pesquisa
os quais almejam por novas terapias eficazes para o tratamento do câncer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que participaram de forma relevante para a execução deste trabalho:

Agradeço primeiramente à Deus por ter me concedido a honra de finalizar este trabalho com êxito em mais uma etapa da minha vida.

À minha família, principalmente a minha mãe, Antônia Camelo Santos, pelo o exemplo de vida, mulher guerreira, mulher virtuosa, mulher de oração. Suas palavras de incentivo me transmitiram segurança durante essa jornada. Obrigada mãe por desempenhar uma função tão importante na formação do meu caráter.

À minha orientadora, professora Dra. Lídia Andreu Guillo, que me acolheu e permitiu a realização de mais um sonho. Agradeço pela a oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal.

Aos pacientes com LMC do Hospital das Clínicas HC/UFG por aceitar participar desta pesquisa, sem eles, essa pesquisa não seria possível.

Aos médicos hematologistas do Ambulatório de Hematologia do HC, Dr. Renato Sampaio Tavares e Dra. Adriana do Prado Barbosa, pelo apoio, compreensão e disposição em tirar minhas dúvidas durante as análises dos prontuários. À secretária Rosália pelo o carinho e por sempre ter se disponibilizado para providenciar um espaço mesmo que provisório para as coletas de sangue.

Aos professores da banca examinadora por gentilmente aceitarem participar da minha defesa de mestrado.

Aos professores: Dra. Cristiana Maria Toscano Soares e Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pela a disposição em tirar algumas dúvidas na parte da estatística.

Ao Laboratório de Bioquímica Celular – ICB 2/UFG pelo o apoio.

À equipe do Laboratório de Enzimologia – ICB 2/UFG, sempre me auxiliando quando necessário.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular – ICB 2/UFG, em especial a Symone Vitoriano da Conceição Castro pela a disposição para quantificar as amostras de DNA.

Ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética – ICB 1/UFG pela a colaboração.

Aos estudantes de biotecnologia Iara Mendes Maciel e Guilherme Souza pelo pela amizade e pelos momentos juntos, os quais me proporcionaram alegrias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Goiás pelo apoio financeiro.

Agradeço as pessoas que direta e indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Leucemia Mielóide Crônica: epidemiologia e etiologia.	17
2.2. Características da Leucemia Mielóide Crônica	18
2.2.1. Fase crônica	18
2.2.2. Fase acelerada	18
2.2.3. Crise blástica	20
2.3. Aspectos moleculares da LMC	20
2.4. Fatores prognósticos da LMC	23
2.5. Histórico de tratamento	24
2.5.1. Imatinibe (Glivec®) – mecanismo de ação	26
2.6. Resistência terapêutica	30
2.7. Inibidores de segunda geração:	31
2.7.1. Dasatinibe	32
2.7.2. Nilotinibe	33
2.7.3. Bosutinibe	34
2.8. TP53 Gene supressor de tumor	34
2.9. A proteína TP53	36
2.10. Polimorfismos Genéticos	38
3. OBJETIVOS	40

3.1. Objetivos gerais:.....	40
3.2. Objetivos específicos:	40
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	41
4. 1. Características do estudo.....	41
4.2. Grupo amostral:.....	41
4.3. Critério de inclusão e exclusão.....	42
4.4. Pesquisa:.....	42
4.5. Extração de DNA:	43
4.6. Reação em cadeia de polimerase:.....	43
4.7. Análise dos produtos de PCR.....	45
4.8. Análise estatística	45
5.. RESULTADOS.....	46
5.1. Características descritivas do grupo amostral	46
5.2. Determinação dos genótipos.....	48
5.3. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas	49
5.4. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	50
5.5. Distribuição do polimorfismo de TP53 de acordo com as características clínicas da LMC	51
5.6. Regressão logística.....	52
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS.....	75
9.1. Anexo 1.....	75
9.2. Anexo 2.....	80
10. MANUSCRITO	83

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cromossomo Ph⁺ com o gene quimérico *BCR-ABL* que codifica a proteína BCR-ABL com atividade tirosina-quinase alterada. Fonte: MELLO, 2004.

Figura 2. Representação esquemática dos genes *BCR* e *ABL* na translocação t(9;22)(q34;q11). Fonte: FADERL et al., 1999.

Figura 3. Representação da fórmula estrutural da 2-fenil-amino-pirimidina, que origina o Glivec®, (Novartis Pharma, Basel, Switzerland). Fonte: COHEN et al., 2002.

Figura 4. Mecanismo de ação do inibidor de BCR-ABL, mesilato de imatinibe. Fonte: SAVAGE e ANTMAN, 2002.

Figura 5. Representação da fórmula química estrutural dos compostos de segunda geração. Em (A) dasatinibe; (B) nilotinibe e em (C) bosutinibe. Fonte: FERREIRA, 2010.

Figura 6. Desenho esquemático do gene *TP53* e sua distribuição de eventos mutacionais em cada éxon.

Figura 7. Desenho esquemático da estrutura da proteína p53 e seus domínios.

Figura 8. Genotipagem de cinco pacientes. PM – peso molecular; C+ controle positivo; os indivíduos 1 e 2 são Arg/Pro; os indivíduos 3 e 4 são Arg/Arg e o indivíduo 5 é Pro/Pro; C- controle negativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definições das fases da LMC

Tabela 2. Cálculo de risco da LMC de acordo com Sokal e colaboradores (1984) e Hasford e colaboradores (1998).

Tabela 3. Taxas de sobrevida de pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe.

Tabela 4. Definição e monitoramento da resposta: hematológica, citogenética e molecular ao tratamento com imatinibe.

Tabela 5. Concentrações e volumes dos reagentes empregados na reação de PCR

Tabela 6. Sequências de *primers* para identificação do polimorfismo em *TP53*.

Tabela 7. Protocolo de termociclagem usado nas reações de PCR.

Tabela 8. Características clínicas de 85 pacientes com LMC de acordo com as fases da doença.

Tabela 9. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas de *TP53* em pacientes com LMC.

Tabela 10. Associação entre resposta e resistência ao imatinibe com os dados clínicos dos pacientes com LMC.

Tabela 11. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo de acordo com o Índice Sokal

Tabela 12. Relação do polimorfismo de *TP53* em pacientes com idades superior a 40 anos que apresentaram resistência ou resposta ao tratamento

Tabela 13. Análise da regressão logística multivariada para LMC

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg Arginina	PDGRF (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
ABL (<i>Abelson murine leukemia</i>)	Pgp P-glicoproteína
BCR (<i>Breakpoint Cluster Region</i>)	Ph⁺ Cromossomo <i>Philadelphia</i>
C-terminal Extremidade Carboxi-terminal	Pro Prolina
c-Kit (<i>receptor stem cell factor</i>)	qRT-PCR reação quantitativa de cadeia de polimerase com transcriptase reversa
DNA Ácido desoxirribonucléico	RCC Resposta citogenética completa
dNTP desoxirribonucleosídeos trifosfato	RCMe Resposta citogenética menor
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético	RCMi Resposta citogenética mínima
EGFR (<i>epidermal growth factor receptor</i>)	RCP Resposta citogenética parcial
FA Fase acelerada	RMM Resposta Molecular Maior
FC Fase crônica	RMC Resposta Molecular Completa
FDA (<i>Food and Drug Administration</i>)	SRC Proteína tirosina quinase
HPV papiloma vírus humano	SCF (<i>Stem cell factor</i>)
INCA Instituto Nacional do Câncer	SH2 (<i>Src Homology 2</i>)
INF-α interferon alfa	SH3 (<i>Src Homology 3</i>)
LLA Leucemia linfóide aguda	SMD síndromes mielodisplásicas
LMA leucemias mielóides agudas	SNP polimorfismo de um único nucleotídeo
LMC Leucemia Mielóide Crônica	TMO Transplante de medula óssea
MDM2 (<i>murine double minute 2</i>)	TP53 Gene Supressor de tumor <i>TP53</i>
MDR gene de Resistência a Múltiplas drogas	TP53 Proteína <i>TP53</i>
M-bcr (<i>major breakpoint cluster region</i>)	UV radiação ultravioleta
m-bcr (<i>minor breakpoint cluster region</i>)	χ^2 Qui-quadrado
OR (<i>Odds Ratio</i>)	μg Micrograma
pb Pares de bases	μ-bcr (<i>micro breakpoint cluster region</i>)
PCR reação em cadeia da polimerase	

RESUMO

ESTUDO DO POLIMORFISMO NO CODON 72 DO GENE TP53 NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA E ASSOCIAÇÃO COM POSSÍVEL RESPOSTA AO TRATAMENTO COM IMATINIBE

A LMC caracteriza-se por uma expansão clonal de células progenitoras hematopoiética e está associada a uma alteração citogenética, conhecida como o cromossomo Philadelphia (Ph^+), produto de uma translocação recíproca $t(9q34;22q11)$, gerando a proteína híbrida BCR-ABL. O gene *TP53* é um gene supressor tumoral está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) que codifica uma proteína fosfonuclear a TP53. O polimorfismo desse gene, envolve uma troca de uma única base guanina (G) por uma citosina (C) no códon 72, originando os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro. Este trabalho tem como objetivo determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo de TP53 no códon 72 em pacientes com LMC e correlacionar com a resposta ao tratamento com imatinibe. O trabalho contou com a participação de 85 pacientes com LMC atendidos no serviço do Ambulatório de Hematologia do HC (Hospital das Clínicas) da UFG, na cidade de Goiânia, Goiás, para o diagnóstico e controle da doença. A idade, o sexo, a fase da doença, o Índice Sokal e resposta e resistência ao tratamento, foram levados em consideração. Para investigar as frequências alélicas e genótípicas, amostras de DNA foram isoladas do sangue periférico para posterior análise em reações de PCR. Para a amplificação das regiões de interesse, *primers* específicos *forward* e *reverse* foram utilizados. Dos 85 pacientes portadores de LMC, 69 pacientes estavam na fase crônica, oito na fase acelerada e um na crise blástica. A média de idade foi de 51 anos e oito meses. A frequência dos genótipos Pro/Pro, Arg/Pro e Arg/Arg foi 11% (4/35), 43% (15/35) e 46% (16/35) para pacientes com resistência ao tratamento com imatinibe (grupo caso) e 16% (8/50), 62% (31/50) e 22% (11/30) para pacientes com resposta ao tratamento (grupo controle), respectivamente. A população do presente estudo está em Equilíbrio de Hardy Weinberg ($\chi^2 = 1, 12; P > 0, 05$). Quanto à idade, sexo, fase da doença e índice Sokal não se observou associação com a resposta e resistência ao tratamento ($P= 0,36; P= 0,82; P=0,47$ e $P=0,72$), respectivamente. Quando avaliou-se os genótipos com relação ao Índice Sokal (Alto x Intermediário/baixo), observou-se que Pro/Pro, foi significativamente menor no grupo com Índice Sokal alto ($P=0,017$; $OR=8,19$). Para o critério idade acima de 40 anos no diagnóstico da doença, através da análise do Teste de Fisher, observou-se que pacientes homozigotos para o genótipo Arg/Arg são quatro vezes mais susceptíveis a apresentar algum tipo de resistência ao tratamento com imatinibe. Quando avaliou-se as variáveis: idade, sexo, fase da doença, genótipos e Índice Sokal na regressão logística, observou-se que somente a variável genótipo foi significativa ($P= 0,0159$). Nossos resultados divergem dos dados apresentados pela literatura sobre a LMC, que sugerem que o genótipo Pro/Pro ou alelo Pro, pode conferir risco de desenvolver a doença ou resistência ao tratamento com imatinibe. Nossos achados sugerem que pacientes Arg/Pro e Pro/Pro, responderam bem ao tratamento e que o genótipo Pro/Pro, representou um indicador para um bom prognóstico. O genótipo Arg/Arg representou um fator de risco na susceptibilidade genética à patogênese da LMC, contribuindo para um pior prognóstico da doença.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica, códon 72, TP53, polimorfismo, imatinibe.

ABSTRACT

Study codon 72 polymorphism gene *TP53* in chronic myeloid leukemia and association with possible response to imatinib therapy

The CML is a expansion clonal of cells progenitors hematopoietics and is associated to an specific genetic lesion, known as the Philadelphia chromosome, product of the reciprocal translocation t(9, 22)(q34, q11) that causes the oncogene BCR-ABL. The TP53 is a tumor suppressor gene located on the chromossome 17p13.1 coding for phosphoprotein TP53. The polymorphism arises from the exchange of G for C at codon 72, resulting the genotypes Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro. This study aims to determine the allelic and genotypic frequencies of TP53 polymorphism at codon 72 in CML patients and to correlate with the response to imatinib therapy. The work had the participation of 85 CML patients treated at the Clinic of Hematology, at Hospital das Clínicas – UFG in Goiânia city, state of Goiás for the diagnosis and control of disease. To investigate the allelic and genotypic frequencies, DNA samples were isolated from peripheral blood for analysis of PCR reactions. For genotyping, forward and reverse primers were used for each variant allelic. The study had the participation of 85 CML patients, which 69 were in chronic phase, eight in accelerated phase and only one in blast crisis. The mean age was 51 years and eight months. The frequency of genotypes Pro/Pro, Arg/Pro and Arg/Arg was 11% (4/35) 43% (15/35) 46% (16/35) for patients resistant to imatinib treatment (group case) and 16% (8/50) 62% (31/50) and 22% (11/30) for patients with response to imatinib (control group), respectively. The population in this study is in Hardy-Weinberg Equilibrium ($\chi^2 = 1, 12, P > 0, 05$). Regarding age, gender, disease stage, and score Sokal not observed an association of the disease with the response or resistance to treatment ($P = 0,36$; $P = 0,82$, $P = 0,47$ and $P = 0,72$), respectively. When we evaluated the genotypes with respect to the Score Sokal (High x Intermediate/Low), it was observed that Pro/Pro genotype was significantly lower in the high Sokal Score group than Intermediate/low ($P = 0,017$, OR = 8, 19). For criterion, age over 40 years old at diagnosis, by analyzing the Fisher's test, we found that patients carrying the Arg/Arg genotype are four times more susceptible to produce any resistance to imatinib therapy. When we evaluated the variables age, gender, disease phase, genotype and Sokal Score in logistic regression showed that only the variable genotype was significant ($P = 0,0159$). Our results are not according to the previous studies, in which suggest that the Pro/Pro genotype and the Pro allele can check risk of developing disease or resistance to imatinib treatment. Our findings suggest that patients carrying the Arg/Pro and Pro/Pro genotypes responded well to treatment and that the Pro/Pro genotype represented an indicator for a good prognosis. Genotype Arg/Arg represented a risk factor in genetic susceptibility in CML's pathogenesis, contributing for a worse outcome.

Key words: Chronic Mieloyd Leukemia, codon 72, *TP53*, polymorphisms, imatinib.

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma das neoplasias mais bem estudada, é relativamente rara e bastante diferenciada. Caracteriza-se por uma desordem mieloproliferativa clonal causada pela atividade da oncoproteína BCR-ABL que está constitutivamente ativada, a qual é resultante de uma translocação recíproca que produz o cromossomo Philadelphia (Ph^+) (KAVALERCHIK et al., 2008; KANTARGIAN et al., 2010; BRECCIA e ALIMENA et al., 2010).

A LMC progride em três fases clinicamente reconhecidas: fase crônica (FC), que é seguida por uma fase acelerada (FA) e uma fase terminal, a fase blástica (FB). As alternativas terapêuticas para o tratamento da LMC são: Bulsufano introduzido em 1953, Hidroxiureia em 1970, interferon Alfa – $INF-\alpha$ em 1980, o Transplante de medula óssea (TMO) e os inibidores de tirosina quinase: mesilato de imatinibe, nilotinibe, dasatinibe e bulsotinibe (BOCCHIA et al., 2005; GRANDO e WAGNER, 2008; ALVES 2010; LEVINSON e BOXER, 2012).

O *TP53* é um gene supressor de tumor o qual codifica uma proteína a TP53 que está envolvida na parada do ciclo celular e na apoptose. Em resposta a danos ao DNA, a TP53 acumulada no núcleo das células, ativa a transcrição de genes de reparo que resulta na parada do ciclo celular, permitindo que o DNA seja reparado antes da divisão celular (SHEN et al., 2003).

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) de TP53 no éxon 4 do códon 72, resulta na substituição de Arginina (Arg) ou Prolina (Pro) o qual é identificado em reação em cadeia da polimerase (PCR). Para alguns pesquisadores a variante Arg é mais potente em induzir a célula à apoptose, enquanto que Pro induz a parada do ciclo celular e reparo a danos ao DNA (SADDIQUE e SABAPATHY, 2006; WENG et al., 2012). Este polimorfismo é contrabalanceado, podendo variar com latitude e raça, sendo conservado em diferentes frequências alélicas em todo o mundo (SJALANDER et al., 1996; KOCHETHU et al., 2006).

O polimorfismo do gene apresenta relevante função individual na susceptibilidade ao câncer e determinação prognóstica ao seu tratamento. Recentemente, muitos estudos epidemiológicos têm examinado a associação entre polimorfismo de TP53 e risco de doenças hematológicas (WENG et al., 2012). Entretanto as pesquisas sobre esse polimorfismo em pacientes com LMC são reduzidas, bem como os estudos sobre a relação entre os alelos polimórficos do códon 72 e o processo de leucemogênese e resistência ao tratamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leucemias: epidemiologia e etiologia.

As neoplasias hematológicas formam um grupo de enfermidades provenientes de uma expansão clonal de células hematopoiéticas. Elas podem ser classificadas de acordo com a linhagem celular (mielóides ou linfóides) e no grau de diferenciação e evolução clínica, podendo ser agudas ou crônicas. As leucemias mais comuns em adultos são as Leucemias Mielóides Agudas (LMA), seguida pelas Leucemias Linfocíticas Crônica, Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e por último a Leucemia Linfocítica Aguda- LLA (DÍAZ-REGANÓ, 2004; MORALES et al., 2010).

As neoplasias mielóides afetam principalmente células da medula óssea, podendo também afetar os órgãos hematopoiéticos secundários. De acordo com suas características citológicas as neoplasias mielóides dividem-se em 3 amplas categorias: as leucemias mielóides agudas (LMA), caracterizadas pelo acúmulo de mieloblastos na medula óssea, as síndromes mielodisplásicas (SMD), associadas à hematopoese ineficaz e as doenças mieloproliferativas crônicas, associadas à produção elevada de células mielóides (KUMAR, 2005).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 válidas para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de 9.580 novos casos de leucemias, sendo 4.570 para homens e 3.940 mulheres. As causas da leucemia ainda não estão definidas, mas suspeita-se da associação entre determinados fatores com o risco aumentado de desenvolver alguns tipos específicos, tais como: o tabagismo, para LMA; radiação, para leucemia mielóide crônica (LMC) e benzeno para LMC e LMA. A incidência de casos de LMC aumenta com a idade em cerca de 12 a 30% em pacientes com mais de 60 anos (INCA, 2011; KANTAJIAN et al., 1998).

A LMC caracteriza-se por uma expansão mieloproliferativa clonal de células progenitoras hematopoiéticas transformadas (BAJPAI et al., 2010) constitui 14% de todas as leucemias com uma incidência de 1.6 casos por 100 mil indivíduos por ano (BERGANTINI et al., 2005).

2.2. Características da Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) foi descrita em 1845, por 3 patologistas, John Huggles Bennet, David Craigie, e Rudolf Virchow, trabalhando de forma independente. Em 1960, Peter Nowell e David Hungerford identificaram a causa molecular da doença através da descoberta de um pequeno cromossomo do grupo G nas células da medula óssea de indivíduos portadores da LMC. Tal cromossomo ficou conhecido como *Philadelphia* (Ph), nome dado em homenagem à cidade onde foi identificado (DEININGER et al., 2000; STEINBERG, 2007).

A LMC inclui 3 fases clinicamente distintas: fases crônica (FA), acelerada (FA) e blástica (FB), tornando seu tratamento mais resistente em cada fase sucessiva (ANAND et al., 2012).

2.2.1. Fase crônica

A fase crônica é caracterizada por grande quantidade de células no sangue total, hematopoiese extramedular e esplenomegalia. Após um período de 3 a 5 anos, o número de células mielóides imaturas expande rapidamente com a progressão da doença para uma fase aguda fatal, caracterizada pela explosão de células blásticas na medula óssea, leucocitose e basofilia no sangue periférico, Tabela 1 (MUGHAL e GOLDMAN, 2001; JAISWAL, et al., 2003; OTERO et al., 2005).

2.2.2. Fase acelerada

A fase acelerada é a forma mais agressiva da LMC marcada por instabilidade genética. Os critérios para a inclusão nesta fase são: aumento de células blásticas no sangue periférico ou medula óssea, presença de basófilos acima de 20% e de promieloblastos acima de 30%, além de trombocitopenia ou trombocitose persistentes não responsivas a terapia (STEINBERG, 2007). Nesta fase é possível ainda apresentar evolução clonal, definida pelo o aparecimento de novas anormalidades cromossômicas

adicionais ao cromossomo Ph⁺. A fase acelerada, em percurso natural, pode durar de 3 meses a 18 meses (KALIDAS et al., 2001; COHEN et al., 2002).

Tabela 1. Definições das fases da LMC

Fase crônica^a

1. <15% de blastos no sangue periférico e medula óssea
2. < 30% blastos + promielócitos sangue periférico ou medula óssea
3. < 20% basófilos no sangue periférico
4. 100 x 10⁹/L - plaquetas
5. Nenhum outro envolvimento extramedular que não baço ou fígado

Fase acelerada^b

1. 15% a < 30% de blastos no sangue periférico ou medula óssea
2. 30% blastos + promielócitos sangue periférico ou medula óssea (porém < 30% blastos no sangue periférico e medula óssea)
3. 20% basófilos no sangue periférico
4. <100 x 10⁹/L - plaquetas

Crise blástica^c

1. 30% blastos no sangue periférico ou medula óssea ou
 2. Outros envolvimento extramedulares além do baço ou fígado
-

Adaptado: COHEN et al., 2002.

^a Os cinco critérios devem ser cumpridos;

^b Pelo menos um dos quatro critérios devem ser cumpridos;

^c Estes dois critérios tem preferencia sobre os resultados da fase crônica e acelerada.

2.2.3. Crise blástica

A crise blástica apresenta características de uma leucemia aguda e é definida hematologicamente pelo o aumento em mais de 30% de blastos no sangue periférico e na medula óssea. Nesta fase ainda podem ocorrer mutações secundárias e alterações citogenéticas, tais como duplicação do cromossomo Ph⁺ e trissomia do cromossomo 8. Além de mutações e deleções de genes supressores de tumor (*P16* e *TP53*) que contribuem para uma característica maligna. Tal fenótipo agressivo e pleiotrópico desta fase sugerem que diferentes anormalidades oncogênicas sejam responsáveis pela transição da fase crônica para a crise blástica. Esta fase pode durar de 3 a 6 meses (BERGANTINI et al., 2005; KALIDAS et al., 2001; GRANDO e WAGNER, 2008).

2.3. Aspectos moleculares da LMC

Desde 1960, o cromossomo *Philadelphia* (Ph^+) é considerado um aspecto quase que constante da doença, sendo encontrado em cerca de 90 a 95% dos pacientes através da análise citogenética clássica (GALIMBERTIA et al., 2005; ANAND et al., 2012).

Considerado um marcador citogenético para a LMC, o cromossomo Ph^+ é produto da fusão do gene *BCR* (do inglês, *breakpoint cluster region*) no cromossomo 22q11 com o gene *ABL* (do inglês, *abelson leukemia virus*), mapeado no cromossomo 9q34. A translocação recíproca $t(9, 22)(q34; q11)$ entre os cromossomos 9 e 22 está associada com a origem de um novo (DEININGER, 2008; GRANDO e WAGNER, 2008; JABBOUR et al., 2011; CREWS & JAMIESON, 2012).

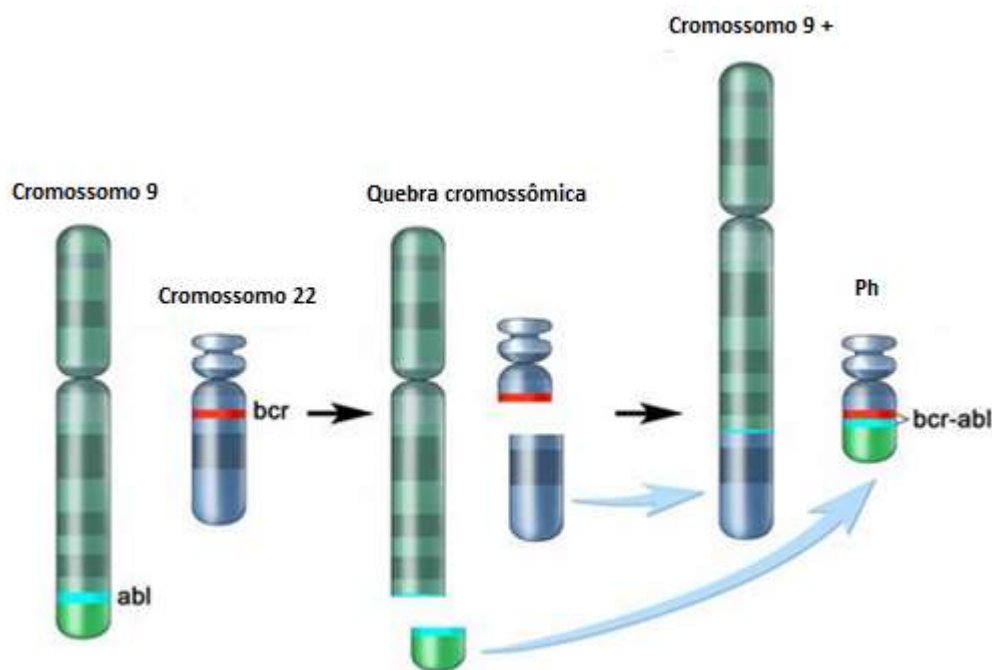


Figura1. Cromossomo Ph^+ com o gene quimérico *BCR-ABL* que codifica a proteína BCR-ABL com atividade tirosina-quinase alterada. Adaptado de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/CML/Patient/page1>.

A radiação ionizante é a possível causa da translocação cromossômica. Isso ficou relativamente claro após estudos que comprovaram um aumento da incidência de casos de

LMC no Japão após o bombardeio atômico em Hiroshima e Nagasaki (O'BRIEN et al. 2007; HAMERSCHLAK, 2008; RADIVOYEVITCH et al., 2012).

Os pontos de quebra no cromossomo 9 estão localizados no primeiro e no segundo íntron do gene *ABL* (a2). Já os pontos de quebra do cromossomo 22 estão localizados em 3 regiões: uma região principal que possui 5 éxons, chamada M-bcr (do inglês, *major breakpoint cluster region*) e duas regiões secundárias – a região m-bcr (do inglês, *minor breakpoint cluster region*) e μ -bcr (do inglês, *micro breakpoint cluster region*). Um terço dos pacientes com leucemia mielóide crônica apresentam pontos de quebra na região M-bcr, seja entre os éxons 13 e 14 (b2) ou 14 e 15 (b3) e por causa do *splicing* alternativo, os transcritos de fusão b2a2 e b3a2 são formados (figura 2) (FADERL et al., 1999; DEININGER et al., 2000).

O transcrito b2a2 resulta da união do éxon b2 do gene *BCR* com o a2 do *ABL*. O segundo transcrito, b3a2, contém o éxon b3 do *BCR* o qual se une ao éxon a2 do *ABL*. Ambos originam uma proteína quimérica de 210 kD (figura 2) (DEININGER et al., 2000; GRANDO e WAGNER, 2008; MELO et al., 2003).

Dependendo de quais pontos de quebras estejam envolvidos, tamanhos diferentes de sequências *BCR* são fundidos com sequências 3' de *ABL*. Tal evento pode resultar em moléculas de RNAm (e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2) de comprimentos diferentes, que são transcritas em proteínas quiméricas (p190, p210, p230) de pesos moleculares variáveis (FADERL et al. 1999).

Uma minoria dos pacientes com LMC apresenta os transcritos e1a2 (p190), sendo estes mais frequentes em indivíduos com Leucemia linfóide aguda (LLA). A isoforma p210 está presente em mais 90% dos pacientes com LMC e em 25% dos pacientes com cromossomo Ph positivo para a LLA (KANTARJIAN et al., 2007; BURGESS, 2011). A p230 foi descrita pela primeira vez em associação com a leucemia neutrofílica crônica, podendo ocorrer raramente na LMC. Todas essas proteínas apresentam elevada atividade tirosina quinase, com papel fundamental na proliferação celular (MELO e DEININGER, 2004).

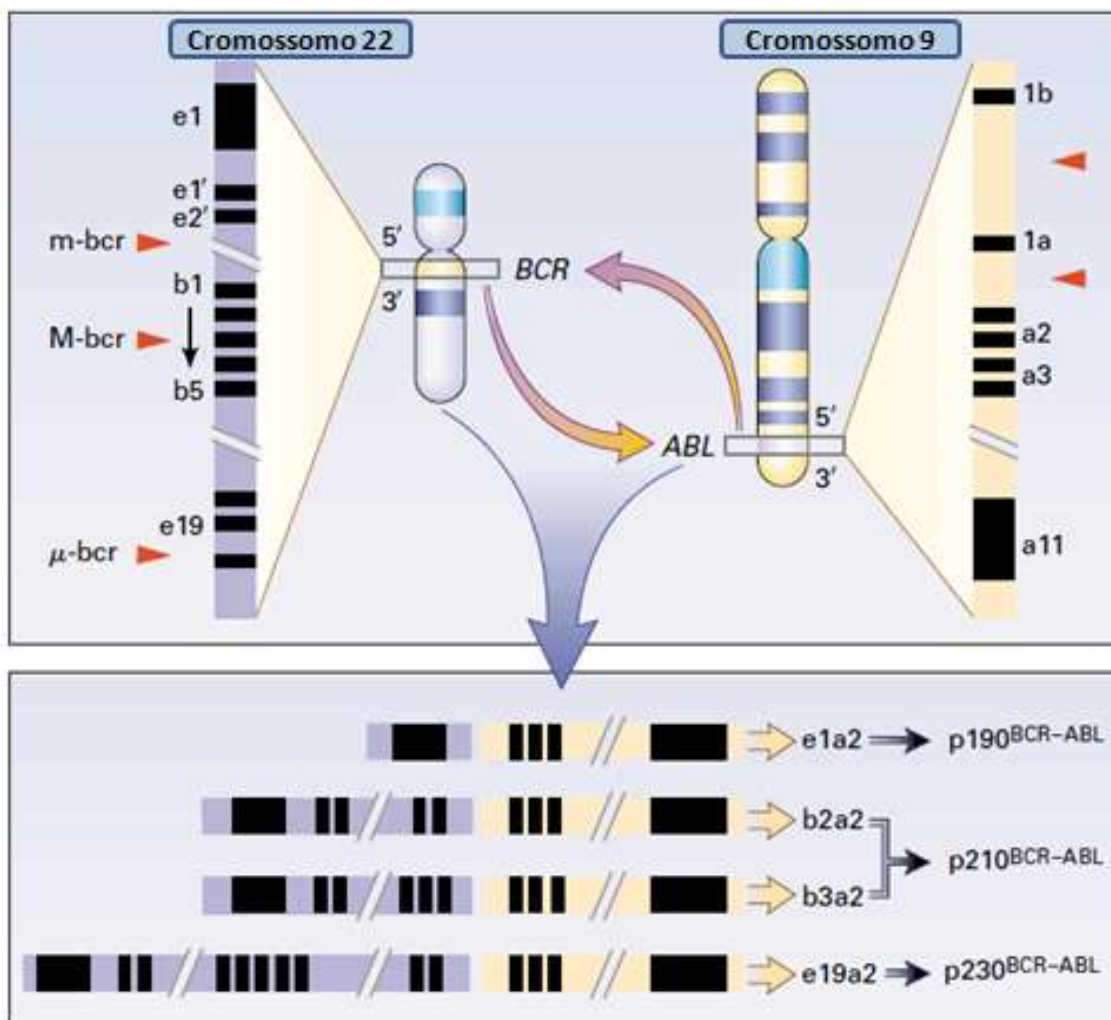


Figura 2. Representação esquemática dos genes *BCR* e *ABL* na translocação t(9;22)(q34;q11). Os éxons estão representados em cor preta e os íntrons em colorido (lilás no cromossomo 22 e amarelo para o cromossomo 9). Dois pontos de quebra são descritos para o gene *ABL* (setas em vermelho) os quais ocorrem antes do éxon 1b, entre 1b e 1a ou entre 1a e a2. Para o gene *BCR* três pontos de quebra são descritos nas regiões *m-bcr*; *M-bcr* e *μ-bcr*. A localização e a extensão são demonstradas pelas três flechas horizontais. A parte inferior da figura apresenta a estrutura dos transcritos de RNA mensageiro quimérico formados a partir da fusão dos genes *BCR* e *ABL*. Quebras na localização *m-bcr* originam transcritos de junção e1a2. As quebras na região *M-bcr* ocorrem entre os éxons b2 ou b3 as quais originam transcritos de fusão b2a2 e b3a2 respectivamente. Na região *μ-bcr* ocorrem quebras que originam o transcrito e19a2. A abreviatura *m-bcr* denota um agrupamento de ponto de quebras na menor região; *M-bcr* região principal de pontos de quebras e *μ-bcr* uma terceira localização de ponto de quebras no gene *BCR*, que está próximo a região *M-bcr* entre os éxons e19 e e20. Fonte: FADERL et al., 1999.

Em condições normais, o gene *BCR* codifica uma proteína com função relacionada à regulação do ciclo celular, enquanto o gene *ABL* codifica uma proteína tirosina quinase. O gene *BCR-ABL* promove a síntese de uma oncoproteína com atividade tirosina-quinase elevada, responsável por estímulos à proliferação e ao bloqueio à apoptose da célula progenitora hematopoiética, o que resulta na oncogênese inicial da LMC (OTERO et al., 2005; BERGANTINI et al., 2005; GRANDO e WAGNER, 2008). Em decorrência desse evento, a célula leucêmica apresenta uma mieloproliferação contínua resultante,

provavelmente, de três mecanismos principais: ativação de múltiplas vias de transdução de sinais que levam à proliferação celular desregulada, a alteração da aderência de células leucêmicas ao estroma da medula óssea e resistência à apoptose celular (SAVAGE e ANTMAN, 2002; BORTOLHEIR e CHIATTONE, 2008).

2.4. Fatores prognósticos da LMC

Em função da fase crônica da LMC ser assintomática e as fases terminais de rápida evolução levando ao óbito, inúmeros investigadores avaliaram diversos fatores clínicos e hematológicos com o intuito de identificar alguns fatores prognósticos que permitissem uma conduta terapêutica (KANTARJIAN et al., 1990). Nesse sentido, algumas escalas prognósticas foram desenvolvidas para orientar a conduta terapêutica. Os mais indicados para a prática clínica são: o índice de Sokal (1984) e índice Europeu (HASFORD, 1998) descritos na tabela 2. O índice SOKAL é o mais utilizado (HEHLMANN et al. 1997).

Para Sokal e colaboradores (1984) algumas características como o tamanho do baço (em centímetros abaixo do rebordo costal esquerdo) e a porcentagem de blastos circulantes foram os indicadores de prognósticos mais importantes. Tais características, além da idade, admitiram-se como variáveis contínuas, progressivamente desfavoráveis nos valores mais altos. A contagem de plaquetas não influenciou significativamente a sobrevida quando abaixo de $700 \times 10^9/L$, mas aumentou o risco quando estava acima desses valores.

O modelo de avaliação de Sokal, baseado nas variáveis citadas acima, permitiu a identificação de três categorias de risco relativo de morte na população de pacientes estudada. Com base nesses cálculos, três grupos foram identificados: alto, intermediário e de baixo risco, com sobrevida média de 3, 4 e 5 anos, respectivamente.

O índice europeu avalia a sobrevida de pacientes com LMC tratados com interferon- α . As variáveis utilizadas foram as mesmas utilizadas no escore SOKAL adicionados da contagem de basófilos e eosinófilos. Este modelo também permitiu a identificação de três grupos de pacientes com risco relativo de morte. Os pacientes no grupo de baixo risco (41,4%) apresentavam índice ≤ 780 e tinham sobrevida mediana de

98 meses. Pacientes no grupo intermediário (44,5%) apresentavam índice >780 e ≤ 1480 , apresentaram uma sobrevida em média de 65 meses e taxa de sobrevida em cinco anos de 56%. O grupo de alto risco (índice > 1480) foi representado por 14,1% da amostra, o qual apresentou sobrevida mediana de 42 meses e taxa de sobrevida em cinco anos de 28% (FUNKE et al., 2005; HASFORD, 1998).

Tabela 2. Cálculo de risco da LMC de acordo com Sokal e colaboradores (1984) e Hasford e colaboradores (1998).

	Sokal (1984)	Hasford (1998)
Idade	$0,116 \times (\text{Idade} - 43,4)$	0,666 quando ≥ 50 anos
Baço*	$0,0345 \times (\text{baço} - 7,51 \text{ cm})$	0,042 x baço
Contagem de plaquetas $\times 10^9/L$	$0,188 \times [(\text{contagem de plaquetas} \div 700)^2 - 0,563]$	1,0956 quando a contagem de plaquetas $\geq 1500 \times 10^9/L$
Mieloblastos %	$0,0887 \times (\text{mieloblastos} - 2,10)$	0,0584 x mieloblastos
Basófilos %	NA	0,20399 quando basófilos $> 3\%$
Eosinófilos %	NA	0,0413 x eosinófilos
Risco relativo		
Baixo	$< 0,8$	≤ 780
Intermediário	0,8-1,2	780 – 1480
Alto	$>1,2$	> 1480

Adaptado: Baccarani e colaboradores (2006). O cálculo de risco de acordo com Sokal e colaboradores (1984) foi definida com base em pacientes tratados com quimioterapia convencional. O Risco de acordo com Hasford e colaboradores (1998) foi definida com base em pacientes tratados com interferon- α .

O cálculo do risco requer o uso de dados clínicos e hematológicos do diagnóstico, antes de qualquer tratamento. O cálculo do risco relativo para Sokal é expresso como exponencial do total; para Hasford é expresso como o total $\times 1000$.

* centímetros abaixo do rebordo costal esquerdo; NA - Não aplicável;

2.5. Tratamento da LMC

Dentre as terapias tradicionais para o tratamento da LMC encontra-se hidroxiuréia (HY), o bussulfano (BU), o interferon- α , o transplante alogênico de medula óssea (TMO) e recentemente os inibidores de tirosina quinase.

Durante a primeira metade do século XX, o tratamento da LMC, foi em grande parte limitada à irradiação do baço, que ofereceu o controle da dor, mas nenhum benefício de sobrevivência. Em 1953, o Bussulfano (BU) - um agente alquilante, foi a primeira droga

utilizada no controle da LMC, dando início a era moderna da quimioterapia no tratamento da doença. O composto apresenta uma ação seletiva na linhagem granulocítica do tecido hematopoiético, resultando em uma melhora da sobrevida. A droga foi administrada por 35 anos até a introdução da Hidroxiuréia (CENTRO CONCHRONE DO BRASIL, 2005; WOESSNER, et al., 2011).

Na década de 70, foi introduzida a hidroxiuréia (HY) no controle da LMC, ela é um composto citostático paliativo, que age no controle da proliferação celular pela a inibição da síntese de DNA e induz a célula à apoptose por meio da ativação da via intrínseca. Este fármaco é bem menos tóxico que o BU, porém está relacionado a um pior prognóstico, pelo fato de seus benefícios serem limitados, promovendo apenas a remissão hematológica (RAYMOND, 1999; BERGANTINI et al., 2005).

A partir de 1980, um novo agente quimioterápico foi introduzido no tratamento da doença - o Interferon Alfa (INF- α). Este por sua vez, age por meio de dois mecanismos de ação complementar: o direto, que promove a inibição da proliferação do clone leucêmico, e o indireto, que potencializa a resposta imune anti-leucêmica, mediada pelas células T e NK (do inglês, *Natural Killer*). A droga induziu remissões hematológicas e citogenéticas em pacientes na fase crônica da LMC, além de aumentar a sobrevida do paciente em até 2 anos quando comparado com a terapia por BU e HY. Nas fases acelerada e blástica da doença o IFN- α mostrou-se pouco eficaz (BERGANTINI et al., 2005; HEHLMANN et al., 2007; BRECCIA e ALIMENA, 2010).

O transplante de medula representa uma alternativa terapêutica comprovadamente curativa para LMC, com uma porcentagem de sobrevivência de 65%. No entanto, apenas um terço dos pacientes é elegível para este procedimento, devido à baixa disponibilidade de um doador, ou ao aumento da taxa de mortalidade, devido a idade avançada. O sucesso desse tratamento para a cura da LMC depende de alguns fatores tais como idade, sendo significativamente menor em pacientes com idade acima de 40 anos, além disso, a fase da doença, a compatibilidade HLA e o tempo do diagnóstico ao transplante também são importantes (SAWYERS, 1999; THIESING et al., 2000).

O TMO tem apresentado bons resultados não quantos os apresentados pelo o imatinibe, devido às taxas de morte de transplante no primeiro ano. Porém ele tem sido indicado para pacientes com resposta subótima, falha terapêutica aos inibidores de tirosina

quinase de segunda geração, nos casos de mutação T315I e nos casos de doença avançada. Neste último caso, pode ser utilizado um inibidor de tirosina quinase para obter um retorno para a fase crônica da doença antes de se realizar o transplante (BRANDFORD et al., 1999; JABBOUR et al., 2009).

Nas duas últimas décadas, houve uma revolução no tratamento da LMC. Estudos demonstraram que o gene *BCR-ABL* sozinho induz a LMC, a partir de então criaram condições para o desenvolvimento de estratégias para a terapia alvo. Nos anos 90, vários pesquisadores iniciaram projetos de pesquisas para a síntese de compostos com efeito inibitório contra a atividade tirosina quinase da BCR-ABL, através da competição do sítio de ligação da adenosina trifosfato (ATP) no domínio quinase (DEININGER et al., 2005; ALVES, 2010). O imatinibe (Glivec®) foi o primeiro inibidor de BCR-ABL a ser aprovado pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), nos EUA, e pela ANISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil (HAMERSCHLAK, 2008). Desde 2001 tem sido utilizado como tratamento de linha de frente para a doença (CHU et al., 2004; MOEN et al., 2007).

O imatinibe revelou-se um agente terapêutico promissor, induzindo particularmente pacientes na fase crônica a uma resposta hematológica, citogenética e molecular (ALVES, 2009; BRECCIA e ALIMENA, 2010).

2.5.1. Imatinibe (Glivec®) – mecanismo de ação

O imatinibe é um derivado da fenilaminopirimidina – 4-[(4-Metil-1-piperazinil) metil]-N-[4-Metil-3-[[4-(3-pirimidil)-2-pirimidil]amino]-fenil]benzamidametano sulfonato e atualmente constitui o tratamento de primeira linha da LMC, com uma acentuada melhora no prognóstico em todas as três fases da doença. Sua ação decorre de sua capacidade inibitória no domínio SH1 da tirosina quinase BCR-ABL. O composto inibe a proliferação e induz apoptose em linhagens de células *BCR-ABL*-positivas. O composto além de induzir a uma resposta hematológica e citogenética na LMC, parece modular diferentes proteínas anti e pró-apoptóticas pertencentes às vias extrínseca e intrínseca de apoptose celular (DOBBIN e GADELHA, 2002; BERGANTINI et al., 2005; PAGNANO 2008). Sua fórmula estrutural está representada na figura 3.

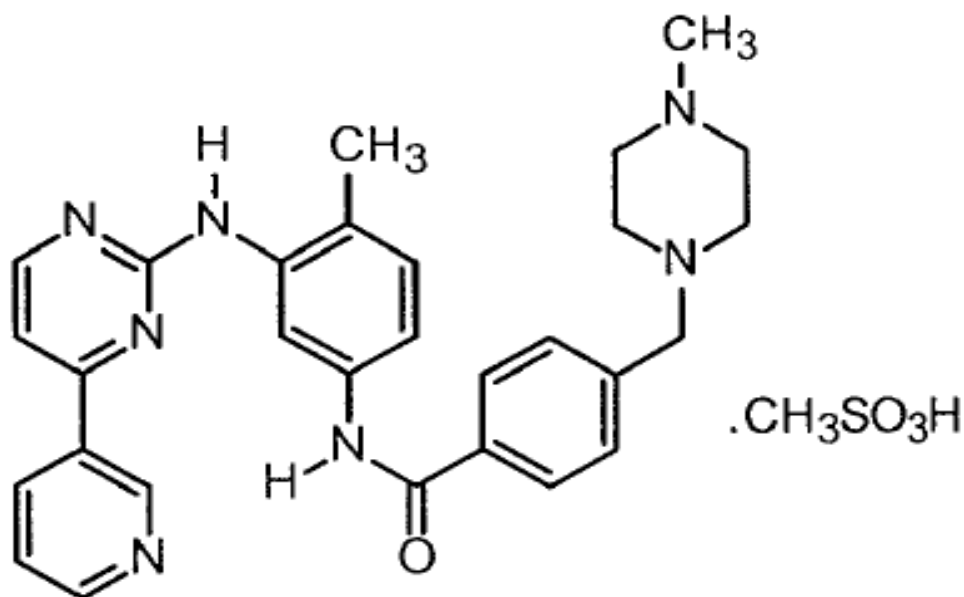


Figura 3. Representação da fórmula estrutural da 2-fenil-amino-pirimidina, que origina o Glivec®, Novartis Pharma, Basel, Switzerland). Fonte: COHEN et al., 2002.

O imatinibe inibe também outras proteínas de sinalização, incluindo os receptores de tirosina quinase para o PDGRF (do inglês, *Platelet-derived growth factor*), SCF (do inglês, *Stem cell factor*) e c-Kit (do inglês, *receptor stem cell factor*), além de inibir os eventos celulares mediados pelos PDGRF e SCF (KANTARJIAN et al., 2002). O composto compete para o sítio de ligação do ATP e ocupa com alta afinidade este sítio na quinase, dessa maneira bloqueia capacidade do c-Kit de transferir grupos fosfato do ATP para os resíduos de tirosina das proteínas, interrompendo o sinal de transdução mediado por c-Kit. Dessa forma, ocorre uma alteração na conformação da proteína, a porção ABL da tirosina quinase se torna estabilizada em sua conformação inativa, o que a impede de exercer sua atividade catalítica, Figura 4 (GADZICKI, et al., 2005; GOLDMAN, 2000).

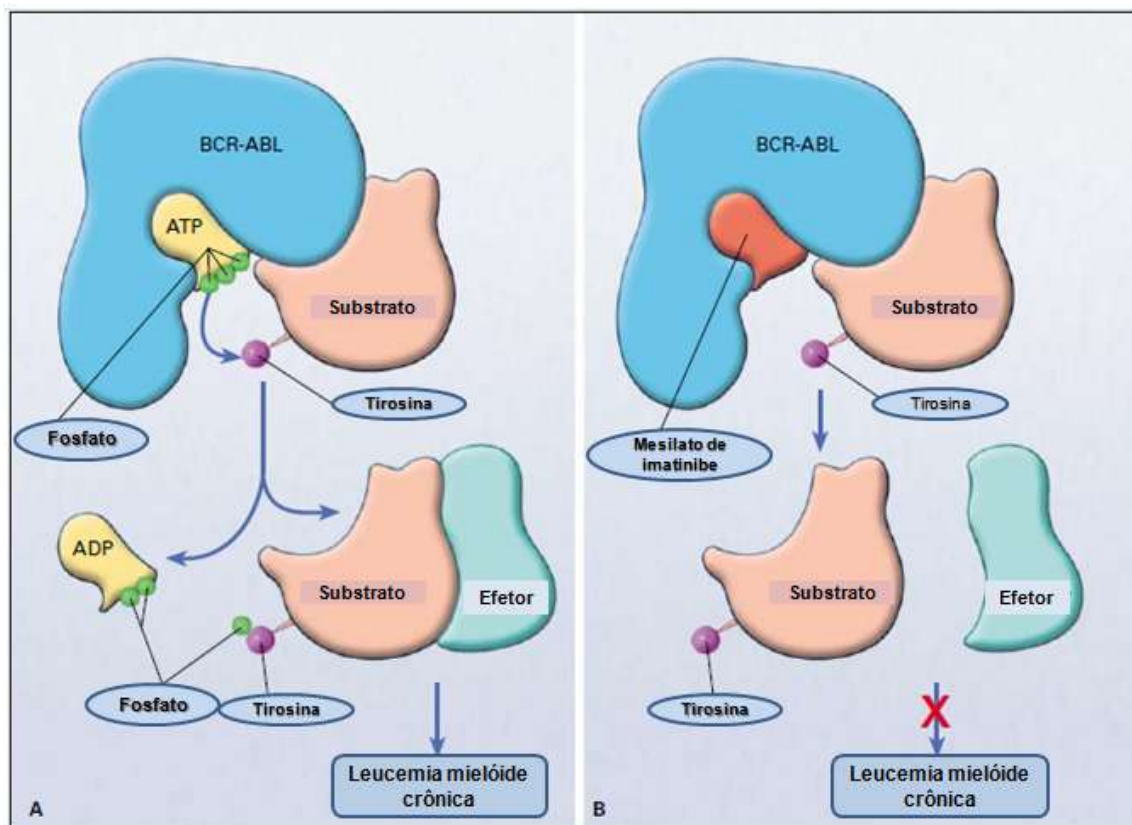


Figura 4 – Mecanismo de ação do inibidor de BCR-ABL, o imatinibe.

A figura A apresenta a oncoproteína BCR-ABL com uma molécula de ATP no sítio de ligação da quinase. O substrato é então ativado pela a fosforilação dos resíduos de tirosina, podendo interagir com outras moléculas efetoras a jusante. Na figura B quando o imatinibe ocupa o sítio de ligação do ATP a atividade de BCR-ABL é inibida e o substrato não pode ser fosforilado. Adaptado: SAVAGE e ANTMAN, 2002.

A tirosina quinase é uma proteína chave na indução da transformação leucêmica por sinalizar positivamente a proliferação celular, ativando vias de sinais mitogênicos, interferindo na adesão das células leucêmicas ao estroma da medula óssea e resistência à apoptose. A proteína quimérica torna-se altamente potencializada quando comparada com a normal, conferindo a célula leucêmica uma alta resistência à morte celular independente do agente indutor (MELO, 2003; BERGANTINI et al., 2005).

O imatinibe foi aprovado, após ensaios de fase I e II, para o uso em pacientes com LMC em todas as suas fases: crônica, acelerada ou blástica, resistentes ou altamente intolerantes ao Interferon-alfa (IFN- α) (DOBBIN e GADELHA, 2002). Em um estudo de fase II, o imatinibe foi investigado nas três fases da doença. Na crise blástica 229 pacientes com LMC apresentaram uma taxa de resposta citogenética de 6 e 18% em pacientes tratados com imatinibe 400 e 600 mg/dia, respectivamente. Na fase acelerada, 235 pacientes tratados com 400 ou 600 mg/dia de imatinibe, apresentaram uma resposta hematológica de 65% para os tratados com 400 mg/dia e de 71% para os tratados com 600

mg/dia de imatinibe. Já na fase crônica tardia 454 pacientes tratados com imatinibe após intolerância ao INF- α , a taxa de resposta hematológica completa foi de 95% e resposta citogenética completa (RCC) foi de 57% em 5 anos, tabela 3 (KANTARJIAN et al., 2007).

Tabela 3. Taxas de sobrevida de pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe.

Fase da doença	Dose diária de mesilato de imatinibe (mg)	Taxa de sobrevida (em anos)
Crônica, recém-diagnosticada	400	89% (5)
Crônica, anteriormente tratada	400	86% (4) e 79% (5)
Fase acelerada	400 vs 600	44% (3) vs 66% (3)
Crise blástica	400 - 600	17% (2); 14 - 17% (2 - 3)

Adaptado de KANTARJIAN et al., 2007.

A resposta hematológica se dá através da normalização da contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico, erradicação de sinais e sintomas da doença e manutenção da resposta por mais de quatro semanas (CHAUFFAILLE, 2008; BACCARANI, 2006). A resposta citogenética se estabelece no desaparecimento do cromossomo Ph⁺ apresentando uma graduação conforme mostra a tabela 4.

Já a análise molecular investiga os níveis de transcritos BCR/ABL que são de grande importância para o monitoramento da doença. Ela pode ser classificada em: Resposta Molecular Maior (RMM) que é obtida quando o nível de BCR-ABL cai no mínimo 3 log abaixo do nível em que uma RCC é alcançada. A Resposta Molecular Completa (RMC) é dada quando os níveis de BCR/ABL são indetectáveis (BRANFORD, 2007).

Tabela 4. Definição e monitoramento da resposta: hematológica, citogenética e molecular ao tratamento com imatinibe.

	Resposta hematológica	Resposta citogenética	Resposta molecular <i>BCR-ABL</i> / gene de controle (%) de acordo com a escala internacional)
Definições	Completa: contagem de plaquetas < 450 x 10 ⁹ ; diferencial sem granulócitos imaduros e basófilos inferior a 5%; baço não palpável.	Completa (RCC): Ph ⁺ 0% Parcial (RCP): Ph ⁺ 1%-35% Menor (RCMe): Ph ⁺ 36%-65% Mínima (RCMi): Ph ⁺ 66%-95% Nenhuma: Ph ⁺ 95%	Completa: indica transcritos não detectáveis; Maior (RMM): < 0,01%

Monitoramento	A cada 2 semanas até resposta completa, posteriormente a cada três meses (ou mais se necessário).	Verificado a cada 6 meses até RCC, posteriormente a cada 12 meses.	A cada 6 meses; análise mutacional no caso de falha terapêutica, resposta subótima ou aumento da razão.
---------------	---	--	---

Adaptado de BACCARANI et al., 2006.

2.6. Resistência terapêutica

Apesar do sucesso do imatinibe, obtidos em estudos anteriores, cerca de 30% dos pacientes apresentam algum tipo de resistência ao tratamento, enquanto outros tem resistência ou são intolerantes. Geralmente os casos com início tardio do tratamento com imatinibe e a doença mais avançada, apresentam uma maior taxa de resistência (CORNELISON et al., 2011; BHAMIDIPATI et al., 2013).

A resistência pode ser classificada em: resistência primária ou secundária. A resistência primária é conhecida pela a incapacidade de alcançar uma resposta hematológica ou citogenética, observada em alguns pacientes em fase crônica e em uma maioria dos pacientes em fase avançada. Já a resistência secundária ou adquirida é a perda da sensibilidade ao longo do tempo e o reaparecimento de clones leucêmicos após uma resposta inicial à droga (BRECCIA e ALIMENA, 2010; CORNELISON et al., 2011).

A resistência ao imatinibe é multifatorial e está classificada em: fatores que atuam independente da atividade de BCR-ABL e os fatores dependentes de BCR-ABL. Os mecanismos independentes de BCR-ABL são responsáveis pela a resistência primária. Já os mecanismos dependentes estão relacionados a própria reativação de BCR-ABL, caracterizada como resistência secundária (Alves, 2009; SOVERINI et al., 2011).

As mutações pontuais em quinases no domínio ABL caracterizaram os fatores dependentes de BCR-ABL e são responsáveis por 35% a 75% dos casos de resistência. Elas atuam impedindo a ligação do imatinibe à BCR-ABL ou podem induzir a uma transição da conformação inativa para a ativa, na qual o composto é incapaz de se ligar. Portanto, as células que sofrem essa mutação podem continuar a proliferar caracterizando a resistência (CORNELISON et al., 2011; SOVERINI et al., 2011).

Entre as mutações identificadas no momento pode-se destacar a T315I, que resulta na substituição do aminoácido treonina por uma isoleucina na posição 315 da porção ABL da proteína BCR-ABL. Posteriormente outras mutações foram identificadas nos códons 253, 255, 317 e 396, cada uma resulta na troca do aminoácido codificado. A mais importante ainda parece ser a T315I, que confere uma resistência clinicamente comprovada aos inibidores BCR-ABL disponíveis no mercado (O'HARE et al., 2007; JABBOUR et al., 2009).

Os mecanismos de resistência independentes da atividade de BCR-ABL incluem um aumento da expressão de BCR-ABL através da amplificação gênica em resposta aos altos níveis de imatinibe no plasma, o surgimento de anormalidades clonais secundárias, ativação de moléculas constitutivas de sinalização, por exemplo, as quinases da família Src, aumento de efluxo da droga pelo aumento da expulsão da droga mediada pela a P-glicoproteína (Pgp), codificada pelo o gene de Resistência a Multiplas drogas (MDR, ABCB1) (ALVES, 2009; JABBOUR et al., 2009).

O fenômeno de resistência levou ao desenvolvimento de inibidores de segunda geração, dentre os quais destacam-se o dasatinibe e nilotinibe, aprovados pela FDA para o tratamento de pacientes em fase crônica ou crise blástica da LMC são agora os mais estudados. O dasatinibe ainda é indicado para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (STEIN e SMITH, 2010).

2.7. Inibidores de segunda geração:

Mais recentemente a FDA aprovou o dasatinibe e o nilotinibe, como tratamento de linha de frente para pacientes com LMC recém-diagnosticados. Eles são mais potentes inibidores de tirosina quinase com eficácia demonstrada para superar a refratariedade ou a intolerância ao imatinibe, exceto aqueles com mutação T315I (SAGLIO et al., 2010; KANTARJIAN et al., 2010; SHIH et al., 2013). Porém, como aconteceu com imatinibe, nem todos os pacientes respondem às terapias atuais e novas drogas estão sendo desenvolvidas (OHANIAN et al., 2012).

2.7.1. Dasatinibe

O dasatinibe (Sprycel®) é um inibidor de quinase múltipla que inibe BCR-ABL e membros da família Src. Em células *in vitro* é visivelmente mais potente que o imatinibe (LOMBARDO et al., 2004). O composto faz parte da segunda geração de inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, apresenta uma maior inibição (325 vezes mais ativo) e um melhor perfil de tolerabilidade do que o imatinibe e recentemente foi aprovado para o tratamento da LMC e para pacientes que são refratários ou intolerantes ao imatinibe (SANCHÉZ-ORTEGA et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

O dasatinibe é capaz de interagir com a proteína em estados de conformação ativa e inativa da BCR-ABL. A sua eficácia contra muitas formas mutantes, exceto T315I, está atribuída à sua capacidade de se ligar de uma maneira independente dos resíduos de mutações. Dessa maneira, apoiando o seu uso como tratamento de segunda linha (STEINBERG, 2007; STEIN e SMITH, 2010; SULLIVAN et al., 2010). Sua fórmula estrutural esta ilustrada na figura 5 A.

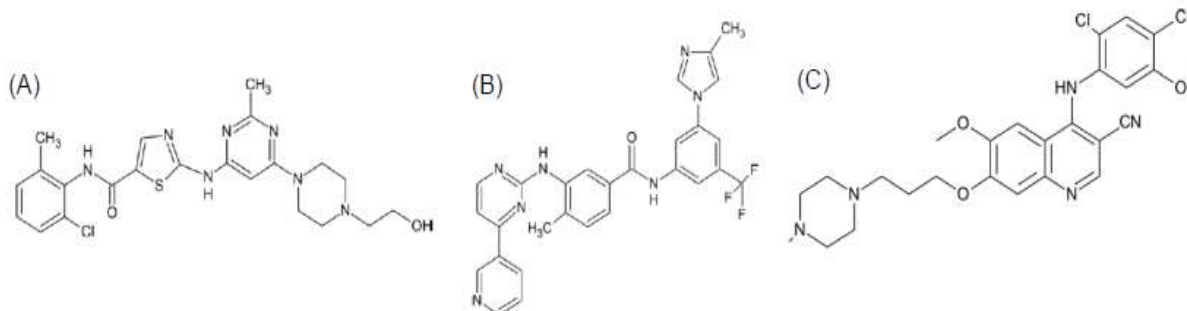


Figura 5. Representação da fórmula química estrutural dos compostos de segunda geração. Em (A) dasatinibe; (B) nilotinibe e em (C) bosutinibe. Fonte: FERREIRA, 2010.

O dasatinibe além de apresentar seu efeito antileucêmico apresenta ainda um efeito inibidor nas vias de sinalização dos receptores da tirosina quinase para PDGRF, do fator de crescimento pró-fibrótico, nas quinases da família Src (SANCHÉZ-ORTEGA et al., 2012).

Estudos sugerem que o dasatinibe está associado com alto nível de eficácia e durabilidade em pacientes em fase crônica e acelerada. Em estudos de fase I em pacientes

resistentes ou intolerantes em todas as fases da LMC, o dasatinibe levou à respostas tanto hematológicas quanto citogenéticas com uma boa tolerabilidade. Pacientes que eram intolerantes ao imatinibe não demonstraram a mesma toxicidade ao dasatinibe (HOCHHAUS, 2007; DELAMAIN e CONCHON, 2008).

O composto é indicado também no tratamento de doentes adultos com leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para o cromossomo Ph⁺ com resistência ou intolerância à terapêutica prévia (LOPES e ABREU, 2009).

2.7.2. Nilotinibe

O nilotinibe (Tasygna®) é um derivado da fenilaminopirimidina desenhada para ser mais seletiva e melhorar a especificidade e afinidade de ligação contra a BCR-ABL em relação à do imatinibe (CORTES et al., 2009). O composto é cerca de 20 à 50 vezes mais potente que o imatinibe, é eficiente contra várias formas mutantes de BCR-ABL, exceto a T315I (TIWARI et al., 2009). Sua fórmula estrutural esta representada na figura 5 B.

O composto é um inibidor competitivo do citocromo P450, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9 e CYP2D6 (DEREMER et al., 2008). Adicionalmente, inibe também a autofosforilação de PDGFR e c-kit (TIWARI et al., 2009).

Para alguns autores a terapia com nilotinibe apresenta melhores respostas quando comparada com imatinibe (WEISBERG et al., 2005; BRECCIA e ALIMENA, 2010). No estudo de Breccia e Alimena (2010), por exemplo, realizado com 49 pacientes com LMC em tratamento com nilotinibe, 96% apresentaram Resposta Citogenética Completa e 52% apresentaram Resposta Molecular Maior durante 12 meses de tratamento. Quarenta e três pacientes apresentaram uma interrupção temporária da droga e seis pacientes interromperam o tratamento devido à toxicidade, um paciente progrediu para a crise blástica e um pacientes recusou a terapia.

Segundo os autores o nilotinibe é geralmente bem tolerado e não parece estar associado com eventos adversos, como retenção de líquidos, edema, ganho de peso ou derrames pleurais, sendo que os efeitos colaterais mais frequentes foram erupção cutânea,

cefaléia, náuseas e fadiga. Neste sentido, o nilotinibe representa uma opção terapêutica adicional para pacientes com LMC.

2.7.3. Bosutinibe

O bosutinibe (SKI-606) é um composto 4 anilino-3-quinolino-carbonitrila que tem estrutura similar às drogas erlotinibe e gefitinibe. Adicionalmente, o busotinibe apresenta eficácia também contra outros tipos de câncer nos quais as quinases da família Src estão envolvidas (LEVINSON e BOXER, 2012).

O Bosutinibe faz parte dos inibidores de segunda geração, é similar ao dasatinibe, que atua sobre as quinases da família Src e ABL é cerca de 30 a 50 vezes mais potente do que o imatinibe (JABBOUR et al., 2011). O comportamento também é mais específico que o imatinibe e dasatinibe, pelo o fato de não inibir significativamente a atividade das quinases c-Kit e PDGFR o que pode reduzir os efeitos colaterais da droga (GOLAS et al., 2005); além disso, o bosutinibe é capaz de atuar inibindo algumas mutações do gene *BCR-ABL* resistentes ao imatinibe (PUTTINI et al., 2006; LOPES e ABREU, 2009). Sua fórmula estrutural está representada na figura 5 C.

2.8. TP53 Gene supressor de tumor

O gene *TP53* (figura 7) foi o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado, ele está localizado no braço curto do cromossomo 17 (p13.1) que codifica uma proteína fosfonuclear de 53 kD - a TP53 a qual é constituída por 393 aminoácidos formando quatro domínios que representam regiões funcionais distintas. O gene é altamente conservado, apresentando homologia estrutural nas diferentes espécies como *Xenopus laevis*, aves, camundongos, na espécie humana, por exemplo, apresenta uma extensão de 20 Kb e é constituído por 11 éxons e 10 íntrons (CAVALCANTI et al., 2002; NUNOBIKI et al., 2011).

Mutações do gene *TP53*, representam uma das alterações genéticas mais comuns em cânceres humanos. Cerca de 30% das mutações no gene, estão localizadas em quatro

regiões conservadas do gene, localizadas entre os éxons 5 e 8, que são conhecidas como sítios quentes de mutação (figura 6) (ROBBINS, 1996).

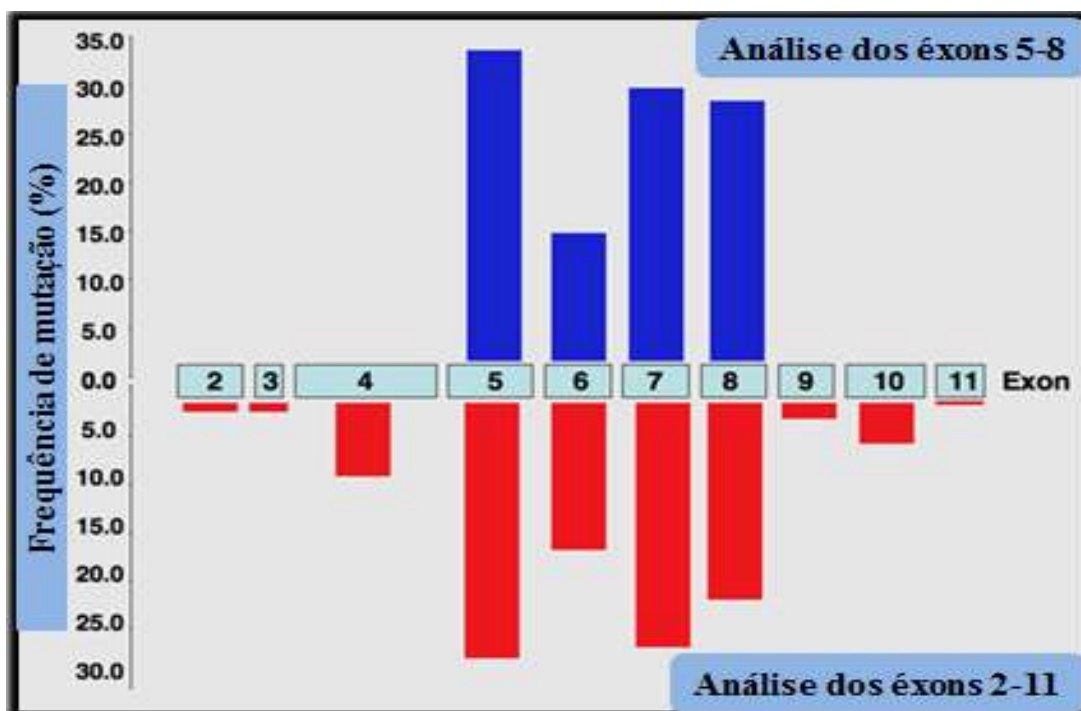


Figura 6. Desenho esquemático do gene *TP53* e sua distribuição de eventos mutacionais em cada éxon. A figura mostra uma comparação de estudos que focam as mutações na região central do gene (barras azuis – éxons 5 a 8) com análises de todas as regiões codificadoras (barras vermelhas - éxons 2 a 11). Adaptado de: http://p53.free.fr/Database/p53_recomendations.html.

Os genes supressores de tumor estão envolvidos no controle de pontos estratégicos do ciclo celular, na diferenciação celular, na ativação da transcrição de genes de reparo do DNA ou induzindo as células à apoptose (LIMA et al., 2006).

Diversas categorias de mutação no *TP53* podem ser distinguidas tendo em vista o impacto da mutação na estrutura e estabilização da proteína ou na sua interação com o DNA. Elas podem ser classificadas em: tipo I, mutações *missense* que afetam os aminoácidos na superfície de ligação ao DNA, rompendo os pontos de contato proteína-DNA; de tipo II, as mutações de sentido trocado que rompem a conformação da proteína e as do tipo III, mutações nulas, são as mais drásticas, incluem mudanças de bases, inserções ou deleções de uma base, que destroem completamente a função da proteína (OIJEN e SLOOTWG, 2000; CAVALCANTI et al., 2002).

A principal característica de *TP53* comparado com outro gene supressor de tumor é o seu modo de inativação. Embora a maioria dos genes supressores de tumor são inativados por mutações que levam a ausência da proteína ou síntese de um produto truncado, mais de 80% dessas alterações no *TP53* são mutações missense que codificam uma proteína de comprimento total estável. Além disso, cada tumor geralmente abriga uma única mutação no *TP53*, que reduz a atividade de transativação da proteína, conduzindo à perda das suas propriedades antiproliferativas e proapoptóticas. (EDLUND et al., 2012).

Dentre todas as mutações, as somáticas ocorrem em aproximadamente 38 à 50% em câncer de ovário, de esôfago, colorretal e cabeça e pescoço. Na leucemia primária, no sarcoma, em câncer testicular, melanoma maligno, câncer cervical e de pulmão as mutações somáticas ocorrem em cerca de 5% (OLIVIER et al., 2010). Na crise blástica da LMC as mutações pontuais são mais frequentes, devido às alterações no ciclo celular, no reparo de DNA, na imunidade e ocorrência de quimio-resistência às drogas, as mutações no *TP53* estão usualmente associadas à instabilidade genômica (HAMÚ et al., 2007).

2.9. A proteína TP53

A proteína TP53 foi descoberta em 1979 por Lane e Crawford como uma proteína nuclear ligada ao complexo do antígeno T do vírus símio 40. Neste estudo a proteína apresentava-se em concentrações elevadas em células transformadas do que em células normais (LEVINE et al., 2004; SATO e TSURUMI, 2012).

A partir de então vários estudos foram feitos para determinar o potencial oncogênico da TP53, mas somente em 1989 o gene *TP53* ficou conhecido como um gene supressor de tumor, quando demonstrou-se que o tipo selvagem da proteína TP53 era capaz de inibir a transformação maligna de células e o crescimento de linhagens defeituosas, por meio de sua proteína normal. Outra função foi dada a proteína como um fator de transcrição regulando um conjunto de genes que podem mediar a parada do ciclo celular, sinalização da senescência celular e induzir a célula à apoptose (VOGELSTEIN et al., 2000; LEVINE et al., 2004).

A TP53 observada em sua estrutura terciária (figura 7) pode ser dividida em cinco domínios, cada um correspondendo a funções específicas: I) A região amino-terminal contém o domínio de transativação que interage com várias proteínas, inclusive com a MDM2, que reprime sua atividade. II) Uma região rica em prolina (resíduos 40-92), a qual constitui um segundo domínio de transativação. III) O domínio central (resíduos 101-306) contém quatro regiões de ligação ao DNA através das quais a proteína TP53 é capaz de se ligar em sítios específicos do DNA. Cerca de 90% das mutações do gene p53 em cânceres humanos são encontrados nessa região. IV) O domínio carboxi-terminal de tetramerização (resíduos 307-355) responsável pela formação de tetrâmeros da p53, a forma mais ativa da proteína em transativação. V) O domínio regulatório que se liga de forma não específica ao DNA danificado controlando negativamente a parte central de ligação ao DNA (LEVINE, 1997; LEWIN, 2001).

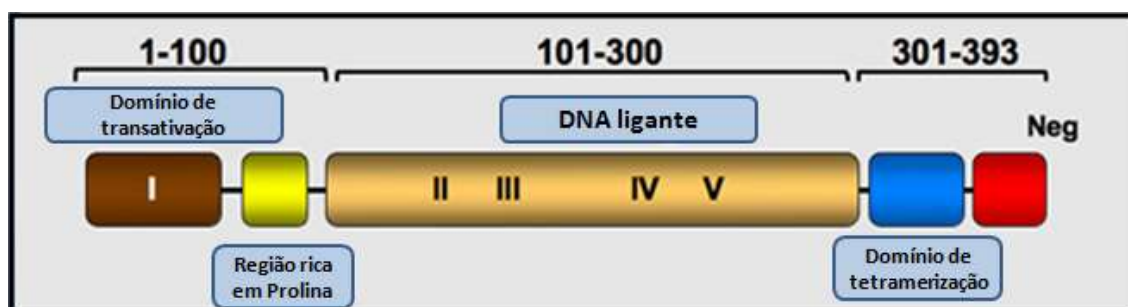


Figura 7. Desenho esquemático da estrutura da proteína p53 e seus domínios. Adaptado de: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html

A via de TP53 é complexa e por se tratar de uma molécula capaz de provocar importantes alterações na célula, sua atividade é mantida sob um rígido controle. Pelo menos 50 enzimas diferentes podem modificar covalentemente a TP53 e alterar a sua estabilidade, localização ou sua atividade na célula. Nesse contexto, a proteína MDM2, regulador negativo, desempenha uma importante função de se ligar na extremidade amino-terminal da TP53 e inibir sua atividade, através da via dependente ubiquitina-proteassoma. A interação entre MDM2-TP53 forma um circuito de retroalimentação negativo, no qual as duas proteínas limitam a atividade uma da outra, além de ser responsável pela exportação da TP53 do núcleo ao citoplasma. Tal evento é desempenhado por proteínas denominadas exportinas, que se liga a MDM2 e auxiliam a

exportação do complexo do núcleo para o citoplasma (LEWIN, 2004; WHIBLEY et al., 2009; SATO e TSURUMI, 2012).

A proteína é sensível a diferentes tipos de estresses que as células podem sofrer, como a exposição à radiação ultravioleta (UV), com consequentes danos no DNA. Dessa forma, o gene é *TP53* é ativado, levando a transcrição da proteína TP53 que resulta na fosforilação, acetilação, metilação ou ubiquitinação de seus resíduos específicos (WHIBLEY et al., 2009). Quando a proteína TP53 é ativada apenas por fosforilação de resíduos específicos na extremidade N-terminal, ela é incapaz de se ligar ao DNA de maneira específica. A ligação não específica ao DNA é causada pela ligação da extremidade C-terminal da proteína com o domínio central, causando um bloqueio nesse domínio. O bloqueio pode ser revertido por fosforilação ou acetilação da extremidade C-terminal. Como consequência desta interação, a TP53 liga-se de maneira específica ao DNA, podendo agir como um fator de transcrição (LEWIN, 2004; LEWIN et al., 2006).

2.10. Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos são explicados por variações na sequência de DNA e que estão presentes na população de forma estável em uma frequência igual ou superior a 1% (METZGER et al., 2006).

Os SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) respondem por mais de 90% da variação genética no genoma humano. O número de SNP foi estimado na ordem de um a 10 milhões dos quais 50.000 a 250.000 estão distribuídos dentro ou em torno de genes codificantes. Alguns SNPs não conferem alterações fenotípicas, mas são marcadores de alguns haplótipos, que são também marcadores genéticos (GONZALÉS et al., 2008).

O foco das pesquisas atuais envolve possíveis associações de genes polimórficos e o risco de câncer. Um dos polimorfismos mais estudado é o do gene *TP53*, localizado no éxon 4 no códon 72, o qual codifica duas formas alélicas funcionais distintas: arginina e prolina. O polimorfismo resulta da troca de G por C no domínio de ligação SH3 da TP53, levando a diferentes características bioquímicas e biológicas da proteína (ORSTED et al., 2007; ZHUO et al., 2009). Dois genótipos homocigotos são formados: um para a arginina

(Arg/Arg) e outra para prolina (Pro/Pro) enquanto que Arg/Pro é o heterozigoto (DUNNA et al., 2012).

Estudos mostram que associações do polimorfismo de *TP53* com dados clínicos de leucemias estão aumentando nos últimos anos (XIONG et al., 2009; DUNNA et al., 2012). Quanto à leucemia mielóide crônica, os resultados ainda são escassos e inconsistentes.

Desde a publicação do trabalho de Bergamaschi e colaboradores (2004) os quais mostraram que o alelo Pro foi mais frequente nos pacientes com LMC do que nos controles e entre os pacientes com LMC com ausência de resposta citogenética ao imatinibe, poucas referências têm tratado do assunto.

Mais recentemente, Sailaja e colaboradores (2009), demonstraram que a frequência de genótipo homozigoto (Pro/Pro) foi maior nos pacientes com LMC quando comparados com o controle. No entanto, Hamú e colaboradores (2007) não encontraram nenhuma associação entre *TP53* polimorfismo e o risco de desenvolver a LMC. Dessa forma, eles sugeriram que o genótipo não se tratava de um fator de risco relevante para o desenvolvimento de LMC.

O gene *TP53* é um importante supressor tumoral, cujo polimorfismo no códon 72 apresenta relevante função individual na susceptibilidade ao câncer e determinação prognóstica ao seu tratamento. Entretanto as pesquisas sobre esse polimorfismo em pacientes com leucemia mielóide são reduzidas, bem como os estudos sobre a relação entre os alelos polimórficos do códon 72 e o processo de leucemogênese.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Este trabalho tem como objetivo investigar o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* em pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crônica em tratamento no HC (Hospital das Clínicas) - UFG.

3.2. Objetivos específicos:

- Analisar o polimorfismo no codon 72 do gene TP53 em pacientes com LMC;
- Analisar as frequências alélicas e gênicas arg/arg, arg/pro e pro/pro em pacientes com LMC;
- Correlacionar as frequências gênicas com a resposta do paciente ao tratamento com imatine;
- Correlacionar as frequências gênicas com a resposta do paciente ao tratamento com nilotinibe e dasatinibe.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Características do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo de casos os quais foram obtidos junto ao Ambulatório de Hematologia - Leucemia Mielóide Crônica no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG). O estudo foi aprovado pelo o Comitê de Ética em Pesquisa da UFG número 211/2009. Os registros foram mantidos em sigilo e natureza confidencial.

4.2. Grupo amostral

Neste trabalho estudou-se o histórico da doença LMC através da análise de prontuários dos pacientes atendidos do HC (Hospital das Clínicas). Foram incluídos neste estudo 85 pacientes atendidos no serviço do Ambulatório de Hematologia – Leucemia Mielóide Crônica do HC para o diagnóstico de LMC e controle da doença. Foram incluídos no estudo todos os indivíduos que estavam em tratamento com o imatinibe, e medicamentos como dasatinibe e nilotinibe, bem como indivíduos com hipersensibilidade ao imatinibe ou a qualquer um dos componentes da formulação. Foram excluídos deste estudo pacientes que não estavam clinicamente e laboratorialmente confirmados com Leucemia Mielóide Crônica (LMC).

O trabalho teve início em Outubro de 2010 com um total de 85 amostras do sangue periférico coletadas para extração de DNA e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para análise molecular e validação do polimorfismo. Para a composição da amostra, os dados clínicos de 85 pacientes foram avaliados a partir do estudo dos respectivos prontuários.

A idade, o sexo, a fase da doença, o Índice Sokal, os dados hematológicos, citogenéticos (Resposta citogenética) e moleculares (Resposta molecular) foram levados em consideração. O monitoramento do tratamento da doença teve início a partir da data de início do imatinibe através da investigação molecular e citogenética clássica com 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses. Ao atingir os dezoito meses de tratamento a análise dos prontuários foi finalizada.

A Resposta Molecular foi obtida por reação quantitativa de cadeia de polimerase com transcriptase reversa (qRT-PCR), realizadas por laboratórios independentes. Esta técnica é o método mais sensível de controle de circulação de células leucémicas (LOWENBERG, 2003). O nível de transcritos de BCR-ABL foi medido e a resposta molecular foi classificada como completa (RMC) ou maior (RMM).

Para os pacientes que não responderam ao tratamento inicial com imatinibe ou que foram intolerantes à droga, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda o aumento da dose até 800 mg por dia ou trocar de medicamentos, podendo usar os outros inibidores de segunda geração como nilotinibe ou dasatinibe. No presente estudo, pacientes que responderam ao tratamento com imatinibe, continuaram com o uso do medicamento. Nos casos de persistência ou intolerância, o medicamento foi alterado para nilotinibe ou dasatinibe.

Participaram da pesquisa pacientes com diagnóstico de LMC em fase crônica, acelerada ou crise blástica da doença com idade entre 18 e 90 anos e ter concordado livremente e assinado o termo de consentimento (Anexo 1), após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos, antes de qualquer procedimento.

Qualquer um dos seguintes critérios não compatíveis com os acima citados foi excluído do estudo.

4.3. Critérios de inclusão e exclusão

Participaram da pesquisa pacientes com diagnóstico de LMC nas três fases da doença com idade entre 18 e 90 anos, ter concordado livremente e assinado o termo de consentimento (Anexo 1). Foram excluídos do estudo, qualquer um dos critérios não compatíveis com os acima destritos.

4.4. Pesquisa

A pesquisa foi executada em dois momentos: a análise de prontuários e coleta de amostras de sangue foi realizada no Ambulatório de Hematologia do Hospital das clínicas – UFG, Goiânia – GO. A etapa sobre a análise molecular foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica Celular no ICB II (Instituto de Ciências Biológicas) – UFG, Campus Samambaia (Campus II), Goiânia, GO.

4.5. Extração de DNA

Para investigar as frequências alélicas e gênicas, amostras de DNA foram isoladas do sangue periférico seguindo o protocolo de extração de DNA de leucócitos descritos por Sambrook (2001), anexo 2. De cada amostra, foram utilizados 600 μL de sangue e 1200 μL de tampão de lise celular dos glóbulos vermelhos, que foram misturados e centrifugados. Descartou-se tudo, deixando 20 μL de sobrenadante. Posteriormente, ressuspendeu-se o pellet com 1000 μL de tampão de lise celular gelado, adicionou-se 6 μL de proteinase K e incubou-se por 3h à 55°C.

Ao final da incubação adicionou-se 400 μL de acetato de amônio, centrifugou-se e transferiu-se o sobrenadante a um novo microtubo com 1200 μL de isopropanol. Removeu-se o sobrenadante por aspiração, em seguida adicionou-se às amostras 1000 μL de etanol 70% centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante.

Ao final do processo de extração, o DNA foi acondicionado em tubos eppendorf de 1,5 mL previamente identificados e etiquetados. Todas as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro de modelo NanoDrop 2000 Spectrophotometer, da Thermo Scientific. Posteriormente, todos os tubos foram levados ao freezer a -20° C, onde permaneceram até o momento em que foram submetidos à PCR.

4.6. Reação em cadeia da polimerase

Para a análise e identificação genotípica de cada paciente para o gene *TP53* foram feitas duas reações de PCR. As duas reações são necessárias pelo fato de ambos os conjuntos de primers apresentarem temperatura de anelamento diferentes.

A solução de amplificação por PCR consistiu em 25ng de DNA genômico extraído das amostras do sangue periférico, 0,2mM de cada *primer*; 1U/mL de Taq DNA-polimerase; tampão 1X para PCR contendo; 0,2mM de dNTP e 4,5mM de MgCl_2 e 18,8 μL de água (Mili-Q). As concentrações iniciais e finais de cada reagente estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Concentrações e volumes dos reagentes empregados na reação de PCR

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume por reação (µL)
Tampão	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50 mM	4,5 mM	1,0
dNTP	10 mM	0,2mM	0,5
Primers	10 mM	0,2 mM	0,5 + 0,5
Taq-polimerase	5,0 U/mL	1 U/mL	0,2
DNA	-	25 ng	1
H ₂ O Milli-Q	-	-	18,8
Total (µL)			25

Para a amplificação das regiões de interesse, *primers* específicos *forward* e *reverse* foram utilizados para cada alelo variante em estudo. As reações foram realizadas no termociclador TC-312 (*Techne*), padronizadas e otimizadas a partir de Storey e colaboradores (1998), com algumas modificações para o volume de reação, concentração da enzima e condições da termociclagem. Essas condições foram descritas em trabalhos semelhantes (Granja, 2005; Hamú et al., 2007; Lima et al., 2006; Costa e Guillo, 2012), Tabela 6 e 7. Para cada reação foi feito um controle negativo nas mesmas condições, como garantia de que os reagentes estavam livres de contaminações de DNA exógeno.

Tabela 6. Sequências de *primers* para identificação do polimorfismo em *TP53*.

Primers	Sequência dos primers (5'→3')	Tamanho do fragmento (PB)
P53Arg/72	F - TCC CCC TTG CCG TCC CAA R - CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141
P53Pro/72	F - GCC AGA GGC TGC TCC CCC R - CGT GAC AGT CAC AGA CCT	177

Fonte: Storey et al., 1998.

Tabela 7. Protocolo de termociclagem usado nas reações de PCR.

Estágios	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Números de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação Cíclica	94	1	
Anelamento	60 Arg/54 Pro	1	35
Extensão Cíclica	72	1	
Extensão Final	72	5	1
Repouso	4	∞	NA

NA – não se aplica

Fonte: STOREY et al., 1998.

4.7. Análise dos produtos de PCR

Para análise dos amplicons, géis de agarose (2%) foram preparados contendo 1,5 μL de brometo de etídio. Em cada canaleta do gel, amostras contendo 15 μL de DNA e 5 μL de tampão de amostra (Azul de Bromofenol e Glicerol) foram adicionadas. Como marcador de peso molecular, utilizou-se o *ladder* de 100pb da Invitrogen. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um campo elétrico constante de 120V, 40mA em gel de agarose e tampão TBE 1X por 45 minutos. Em seguida, as imagens foram capturadas e fotodocumentadas para análise dos fragmentos amplificados.

Os resultados das reações foram interpretados adotando os seguintes critérios: amostras com um único fragmento 141 pb correspondiam a um indivíduo homocigoto para Arg, enquanto que a presença de um amplicon de 177pb correspondia a um indivíduo homocigoto para Pro. Nas amostras em que se observou uma banda de 141 pb para a reação do alelo arginina e outra de 177 pb para a reação do alelo prolina, a amostra correspondia a um indivíduo heterocigoto.

4.8. Análise Estatística

O perfil das amostras foi descrito para as diferentes fases da doença, segundo as variáveis: idade, sexo, intervalo entre o diagnóstico e início do tratamento, resposta citogenética, resposta molecular e status atual do tratamento. A frequência encontrada foi calculada em porcentagem. O teste exato de Fisher baseado em um procedimento de Monte Carlo foi utilizado para investigar possível correlação entre os genótipos encontrados e as variáveis estudadas. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 95% ($P < 0,05$). Para análise estatística foi utilizado o *software* R Core Team, versão 2.15.2, Viena, Austrália.

5. RESULTADOS

5.1. Características descritivas do grupo amostral

O presente trabalho contou com a participação de 85 pacientes portadores de LMC. Estudou-se o histórico da doença através da análise dos prontuários dos mesmos. A média de idade foi de 51 anos e 8 meses. Sendo que 44 (52%) indivíduos eram do sexo masculino e 41 (48%) do sexo feminino.

A Tabela 8 apresenta as características clínicas dos 85 pacientes com LMC em fase crônica, acelerada e crise blástica acompanhados até os 18 meses de tratamento com imatinibe. Pacientes que não responderam ao tratamento com imatinibe e que no período dentro de 18 meses já estavam em uso de outro medicamento (nilotinibe e dasatinibe), também foram inclusos, caracterizando os pacientes com resistência ao imatinibe.

Fase crônica

A fase crônica consistiu-se de 69 pacientes com uma média de idade de 53 anos e 4 meses. Sendo que 52% eram do sexo feminino e 48% do sexo masculino. A média do intervalo entre o diagnóstico e início do tratamento com imatinibe foi de 14 meses e oito dias. Durante o estudo dos pacientes na fase crônica 74,7% apresentaram algum tipo de resposta citogenética, 15,5% não apresentaram resposta e 9,8% não foram avaliados.

Na investigação molecular BCR/ABL 51% apresentaram algum tipo de resposta e 21,5% não obtiveram resposta e 27,5% não foram avaliados.

De 34 pacientes que apresentaram algum tipo de resistência o que levou a suspensão do imatinibe, 26,5% dos casos se deram por efeitos colaterais e 73,5% por falha terapêutica ao medicamento. No status atual de tratamento 60,9% dos pacientes continuam em uso de imatinibe e 39,1% fazem uso de medicamentos de segunda geração.

Fase acelerada

Na fase acelerada foram encontrados oito pacientes, com uma média de idade de 43 anos e 2 meses. Destes, 50% eram do sexo masculino e 50% feminino. A média do intervalo entre o diagnóstico e início do imatinibe foi de 3 meses e 4 dias. Durante o tratamento 57% dos pacientes apresentaram algum tipo de resposta citogenética e 43% não

apresentam. Quanto à investigação molecular, 37,5% (3) apresentaram RMM, 50% (4) não obtiveram resposta e 12,5% (1) não foi avaliado.

De oito pacientes que apresentaram algum tipo de resistência, que levou a suspensão do imatinibe, 37,5% dos casos se deram por efeitos colaterais e 62,5% por falha terapêutica ao medicamento.

Durante o estudo 37,5% (3) dos pacientes apresentaram resposta ao tratamento fazem uso de imatinibe e 62,5% (5) não responderam ao tratamento e fazem uso atual de medicamentos de segunda geração.

Crise Blástica

Apenas um paciente do sexo masculino com idade de 30 anos estava na crise blástica, o qual apresentou RCC e RMM, não apresentando nenhum tipo de resistência ao tratamento, o mesmo continua com imatinibe.

Tabela 8. Características clínicas de 85 pacientes com LMC de acordo com as fases da doença, após 18 meses.

	Fase Crônica %(n)	Fase Acelerada %(n)	Crise Blástica %(n)
Idade (anos)	53,4±15,8	43,2±13,0	30
Sexo			
Masculino	52 (36)	50 (4)	100 (1)
Feminino	48 (33)	50 (4)	0
Intervalo entre o diagnóstico e início de imatinibe (meses)	14,8±23,4	3,4±3,5	1
Resposta Citogenética até os 18 meses (indivíduos)			
Completa (RCC)	62 (44)	43 (3)	100 (1)
Parcial (RCP)	8,5 (6)	0	0
Menor (RCMe)	2,8(2)	14 (1)	0
Mínima (RCMi)	1,4 (1)	0	0
Ausência de resposta (SR)	15,5 (11)	43 (3)	0
Ausência de avaliação citogenética	9,8 (7)	0	0
Resposta molecular até os 18 meses (indivíduos)			
Completa (RMC)	20 (13)	0	0
Maior (RMM)	31 (20)	37,5 (3)	100 (1)
Ausência de resposta (SR)	21,5 (14)	50 (4)	0
Ausência de avaliação molecular	27,5 (18)	12,5 (1)	0
Suspensão do imatinibe por:			
Efeitos colaterais (indivíduos)	26,5 (9)	37,5 (3)	0
Falha terapêutica (indivíduos)	73,5 (25)	62,5(5)	0
Status atual (tratamento)			
Nilotinibe	17,4(12)	25 (2)	0
Dasatinibe	21,7(15)	37,5 (3)	0
Imatinibe	60,9 (42)	37,5 (3)	100 (1)

*Sete pacientes não foram incluídos na tabela por não apresentar a fase da doença no diagnóstico.

**seis de doze pacientes que apresentaram efeitos colaterais continuaram em tratamento com imatinibe

Para quatro pacientes o imatinibe foi suspenso por apresentar tanto efeitos colaterais como falha terapêutica.

5.2. Determinação dos genótipos

Determinaram-se os genótipos de 85 pacientes em estudo. Em todas as amostras, os fragmentos de interesse foram amplificados nas condições já descritas. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, apresentando padrões de bandas conforme a figura 8.

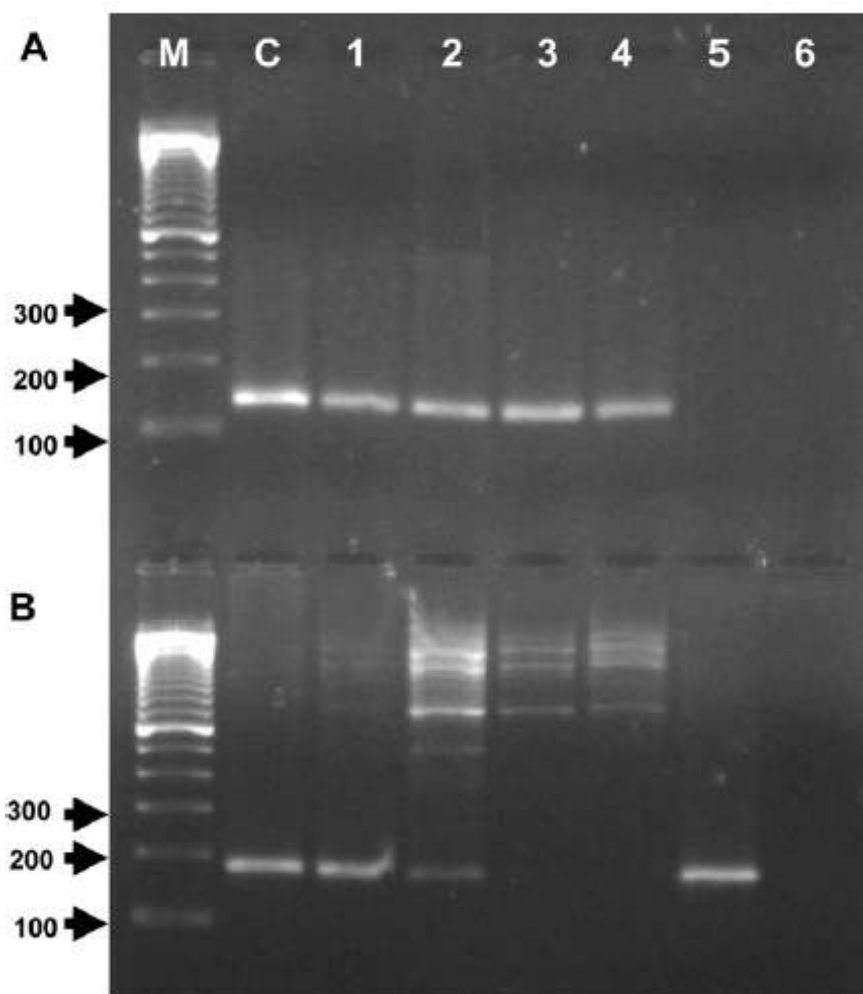


Figura 8. Genotipagem de cinco pacientes. M – marcador; C - controle positivo; os indivíduos 1 e 2 são Arg/Pro; os indivíduos 3 e 4 são Arg/Arg e o indivíduo 5 é Pro/Pro; 6 - controle negativo da reação.

5.3. Distribuição das frequências alélicas e genóticas

A tabela 9 apresenta a distribuição das frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo do gene *TP53* de pacientes com LMC com resposta ao tratamento e pacientes com resistência. A frequência dos genótipos Pro/Pro, Arg/Pro e Arg/Arg foi respectivamente 11% (4/35), 43% (15/35) e 46% (16/35) para pacientes com resistência ao tratamento (grupo caso) e 16% (8/50), 62% (31/50) e 22% (11/30) para pacientes com resposta ao tratamento com imatinibe (grupo controle). Quando as variáveis foram comparadas entre si, observou-se que as diferenças se aproximaram da significância estatística ($P= 0,072$). Para esta análise adotou-se o teste exato de Fisher baseado em um procedimento de Monte Carlo com 1 milhão de randomizações. Considerando-se apenas a

frequência de Arg/Arg entre os grupos, observou-se que esse genótipo foi maior nos pacientes resistentes do que nos pacientes que responderam ao tratamento (46% versus 22%).

Em relação às frequências alélicas para o polimorfismo de *TP53*, a variante Arg foi maior do que Pro em ambos os grupos (67% para o grupo caso e 53% para o grupo controle). O alelo Pro foi mais frequente na população de pacientes que responderam ao tratamento do que a população resistente (47% versus 33%). Quando as variáveis foram comparadas entre si através do teste exato de Fisher pode se observar que as diferenças se aproximaram da significância estatística ($P= 0,081$). Neste caso, podemos inferir que pacientes portadores do alelo Pro, responderam melhor ao tratamento do que Arg (tabela 9).

Tabela 9. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas de *TP53* em pacientes com LMC.

	Genótipos				Alelos		
	Pro/Pro %(n)	Arg/Pro %(n)	Arg/Arg %(n)		Pro %(n)	Arg %(n)	
Pacientes com resistência ao Tratamento (Grupo caso)	11%(4)	43%(15)	46%(16)	P=0,072 GL=2	33%(23)	67%(47)	P = 0,081 OR=1,81 IC=0,96-3,41
Pacientes com resposta ao Tratamento (Grupo controle)	16%(8)	62%(31)	22%(11)		47% (47)	53% (53)	

GL= Grau de Liberdade.

5.4. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), afirma que numa população grande, na qual ocorre reprodução ao acaso, e na ausência de forças que mudem as proporções dos alelos, a proporção original de alelos dominantes para recessivos deverá ser mantida de geração para geração. O equilíbrio é consequência direta da segregação de alelos na meiose nos heterozigotos (GRIFFITHS et al.,2009).

O cálculo do HWE incluiu as frequências genótípicas observadas e esperadas a partir da fórmula: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, onde p é a frequência de A; q é a frequência de a . A população do presente estudo encontra-se em EHW ($\chi^2= 1,2$; $P > 0,05$). Foi utilizado o valor crítico de 3,84 e grau de liberdade 2.

5.5. Distribuição do polimorfismo de *TP53* de acordo com as características clínicas da LMC

A tabela 10 apresenta as dados clínicos dos pacientes com LMC, classificados de acordo com as características: resistência e resposta ao tratamento com imatinibe. No critério idade, observou-se uma tendência para o surgimento da doença na faixa etária acima de 40 anos (65,8%) quando comparada ao grupo com idades inferiores à 40 anos (34,2%). Embora a diferença não seja estatisticamente significativo com $P=0,36$.

Quanto ao sexo, não se observou associação da doença com a resposta e resistência ao tratamento ($P=0,82$). No critério fase da doença no diagnóstico e índice Sokal, não se observaram associação ($P=0,47$ e $P=0,72$), respectivamente.

Tabela 10. Associação entre resposta e resistência ao imatinibe com os dados clínicos dos pacientes com LMC.

Características	Resistência ao imatinibe	Resposta ao imatinibe	Análise combinada
Idade no diagnóstico			
Abaixo de 40 anos	14	15	OR (IC)= 1,55 (0,63-3,85)
Acima de 40 anos	21	35	$P=0,36$
Sexo			
Masculino	19	25	OR (IC)= 0,84 (0,35-2,00)
Feminino	16	25	$P=0,82$
Fase da doença			
Crônica	26	43	OR (IC)= 2,06 (0,50-8,40)
Acelerada/Blástica	5	4	$P=0,47$
Índice Sokal			
Alto	5	12	OR (IC)= 0,65 (0,16-2,60)
Intermediário/Baixo	6	22	$P=0,72$

A tabela 11 apresenta a relação de genótipos e alelos com Índice Sokal (Alto x Intermediário/baixo). Para os genótipos, pela a análise do Teste de Fisher, observou-se que Pro/Pro, foi significativamente menor no grupo com Índice Sokal alto do que Intermediário/baixo ($P=0,017$; OR=8,19).

Para as frequências alélicas, observou-se a mesma tendência. O alelo Pro, foi menor no grupo com Índice Sokal alto (8/34) do que no grupo intermediário/baixo (28/56), desta forma configurando um caráter protetor ($P=0,015$; $OR=0,30$) (tabela 11).

Tabela 11. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo de acordo com o Índice Sokal

Índice Sokal	Genótipos			Alelos	
	Pro/Pro %(n)	Pro/Arg %(n)	Arg/Arg %(n)	Pro %(n)	Arg %(n)
Alto (17)	0(0)	47(8)	53(9)	24(8)	76(26)
Intermediário/Baixo (28)	18(5)	64(18)	18(5)	50 (28)	50(28)

$P= 0,017$
 $OR=8,19$
 $IC=0,42-158,3$
 $GL=2$

$P= 0,015$
 $OR=0,30$
 $IC=0,11-0,79$

Para o critério idade acima de 40 anos no diagnóstico da doença, a tabela 12 apresenta a relação entre os genótipos com pacientes que responderam e os que não responderam ao tratamento. Através da análise do Teste de Fisher, observou-se que pacientes homocigotos para o genótipo Arg/Arg são quatro vezes mais susceptíveis a apresentar algum tipo de resistência ao tratamento com imatinibe. Já os pacientes Arg/Pro e Pro/Pro responderam melhor ao tratamento. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($P= 0,040$).

Tabela 12. Relação do polimorfismo de *TP53* em pacientes com idades superior a 40 anos que apresentaram resistência ou resposta ao tratamento.

Genótipos	Resistentes tratamento	ao Resposta tratamento	ao	OR(IC)	P
Pro/Pro	3	6			
Arg/Pro	7	22		4,40(1,33-14,49)	0,040
Arg/Arg	11	7			

5.6. Regressão logística

As variáveis: idade, sexo, fase da doença, genótipos e Índice Sokal foram utilizadas na regressão logística (Tabela 13). Observou-se que somente a variável genótipo foi

significativa ($P= 0,0159$). A razão de Odds Ratio em média foi 10,27, ou seja, o genótipo Arg/Pro respondeu melhor ao tratamento com uma média de dez vezes mais que Arg/Arg. Da mesma forma o genótipo Pro/Pro, respondeu ao tratamento em média dez vezes mais que Arg/Pro.

Tabela 13. Análise da regressão logística multivariada para LMC

Variáveis	Estimativa dos coeficientes da Regressão logística	Erro Padrão da Estatística	p-valor	OR	IC
Idade	0,0274	0,02855	0,3369	1,0278	0,9746-1,0937
Sexo	-0,6796	0,8521	0,4251	0,5067	0,0844-2,5911
Fase da LMC	-1,3729	1,4663	0,3491	0,2534	0,0142-7,2866
Genótipo	2,3294	0,9657	0,0159	10,2719	1,8530-91,5926
Índice Sokal	0,0015	0,6064	0,9980	1,0015	0,2995-3,5351

6. DISCUSSÃO

Embora relativamente rara, a LMC é uma das leucemias mais bem caracterizadas em nível molecular. Estudos recentes contribuíram em definir melhor os eventos moleculares envolvidos na sua iniciação e progressão, relacionando-os com as manifestações clínicas, o curso da doença e sua intervenção terapêutica (KAVALERCHIK, et al., 2008; BAJPAI, et al, 2010).

A proteína TP53 desempenha um papel fundamental na célula, no controle da supressão tumoral, no reparo de danos ao DNA, nas vias metabólicas, regulação do estresse oxidativo, ciclo, crescimento e diferenciação celular, podendo também induzir a célula à apoptose (CHEN et al., 2011; BIANCO, et al., 2011).

Alterações moleculares incluindo os polimorfismos e mutações no gene *TP53* no códon 72 estão relacionadas com o crescimento e desenvolvimento de cânceres (FAGHANI et al., 2011). O polimorfismo de *TP53* tem sido extensivamente investigado como um fator de risco para o surgimento de câncer de pulmão (JIN et al., 1995), bexiga (HY et al., 2011), colorretal (JOSHI et al., 2011), mama (TRIFA et al., 2010), Leucemia Linfocítica Crônica – LLC (MADIJ et al., 2011), LMC (SAILAJA et al., 2009) e LMA (DUNNA et al., 2012).

Alguns autores sugerem que as duas variantes polimórficas (Arg e Pro) possuem diferentes atividades funcionais e sua expressão pode influenciar no risco ou no tratamento do câncer (DUMONT, et al., 2003; SAILAJA et al., 2009).

Siddique e Sabapathy (2006) mostraram a influência do polimorfismo de *TP53* no reparo do DNA. Para os autores, o alelo Pro, mostrou-se mais eficiente na sua capacidade de reparar danos ao DNA que o alelo Arg. O genótipo Pro/Pro está associado com uma melhora na sobrevivência em algumas formas de câncer quando comparado com Arg/Arg (ORSTED et al., 2007).

Adicionalmente, Marin e colaboradores (2000) relataram que a variante de Pro foi mais eficaz na indução da parada do ciclo celular em G1 do que Arg, provavelmente devido à alteração de afinidade de ligação da proteína.

No entanto outros estudos com leucemias realizados em diferentes grupos populacionais sugeriram resultados diferentes dos citados acima. O estudo de Bergamaschi e colaboradores (2004), por exemplo, realizado na Itália, investigou o polimorfismo de *TP53* em pacientes com LMC. Os autores sugeriram que o alelo Pro, representa um fator de risco para o desenvolvimento da LMC e resistência à resposta citogenética primária ao tratamento com imatinibe. Provavelmente este resultado se deve ao fato de que o alelo Pro exibe um potencial apoptótico menor do que Arg, e um aumento na parada do ciclo celular em G1, dessa forma atribuindo às células uma maior longevidade (ORSTED et al., 2007).

Sailaja e colaboradores (2009) investigaram na Índia o polimorfismo de *TP53* em pacientes com LMC e sua influência na progressão e resposta terapêutica. Os autores sugeriram que o genótipo Pro/Pro pode conferir um fator de risco para o desenvolvimento da LMC e uma resposta citogenética mínima.

Entretanto, Hamú e colaboradores (2007), não obtiveram o mesmo resultado. Os pesquisadores investigaram o polimorfismo de *TP53* em pacientes com suspeitas de LMC no Brasil. Por falta de acesso aos prontuários dos pacientes, não foi possível buscar correlações entre os achados moleculares do polimorfismo com a resistência ao imatinibe. Dessa forma, os autores sugeriram que o genótipo Pro/Pro não representa um fator de risco para o desenvolvimento da LMC.

Existem dados limitados sobre a associação do polimorfismo de *TP53* em leucemias (DO et al., 2009). E diferentemente dos resultados encontrados nos trabalhos citados anteriormente, no presente estudo, não encontramos o alelo Pro associado a um pior prognóstico.

No presente estudo, quando os pacientes foram analisados de acordo com os critérios da tabela 9, observou-se que a frequência do alelo Arg foi maior do que Pro em ambos os grupos. Nossos achados estão de acordo com os dados referentes à população caucasiana (SJALANDER et al., 1996) atribuída às grandes contribuições da população europeia (ORSTED et al., 2007) na história da formação da população brasileira (CALLEGARI-JAQUES et al., 2003).

Quando os pacientes foram analisados de acordo com os critérios da tabela 10, observou-se que não houve associação entre o sexo com a resposta e resistência ao

tratamento ($P=0,82$). Para outros genes polimórficos como MDM-2 (SNP 309), um regulador negativo de *TP53*, o sexo está associado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer em idades mais precoce para o sexo feminino (HU et al., 2007). No trabalho de Ellis e colaboradores (2008) os pesquisadores não encontraram associação entre o sexo e os genótipos de *TP53*, em pacientes com LMA ($P=0,83$).

Quanto ao critério Índice Sokal, tabela 11, observou-se que o alelo Pro foi menos frequente no grupo com Índice Sokal alto (8/34) quando comparado ao grupo intermediário/baixo (28/56), ($P=0,015$). Esses dados não corroboram com os resultados apresentados por Bergamaschi e colaboradores (2004), os quais encontraram uma frequência do alelo Pro significativamente maior entre o grupo com o Índice Sokal de alto risco ($P= 0,016$) em pacientes com LMC.

Quando subdividimos o grupo amostral quanto à idade (Tabela 12), observamos uma maior frequência dos genótipos Arg/Arg em ambos os grupos quando comparado ao genótipo Pro/Pro. Sailaja e colaboradores (2009) encontraram uma maior frequência do genótipo Pro/Pro e do alelo Pro em um subgrupo de pacientes com LMC do sexo masculino acima de 30 anos de idade.

Para os critérios adotados na tabela 13, observamos que somente o genótipo foi significativo ($P= 0,0159$). O genótipo Pro/Pro responde melhor ao tratamento em média 10 vezes mais que o heterozigoto Arg/Pro e este também responde 10 vezes mais do que o homozigoto Arg/Arg. Dessa forma, os resultados sugerem o genótipo Pro/Pro e alelo Pro, representam um bom fator prognóstico.

Os resultados conflitantes encontrados na literatura podem ser atribuídos às características da população analisada, na medida em que há variações consideráveis na distribuição dos genótipos de *TP53* em várias populações. Beckman e colaboradores (1994) sugerem que as variações étnicas são balanceadas e mantidas por seleção natural influenciada por alguns fatores, como por exemplo, o grau de exposição à radiação ultravioleta.

Estudos em diferentes grupos populacionais mostraram uma diferença significativa na prevalência do alelo Arg com a latitude, mostrando que o polimorfismo está relacionado

a fatores ambientais protegidos pela a seleção natural. Enquanto a frequência do alelo Arg é maior em indivíduos com tom de pele clara e menor em indivíduos com tom de pele mais escura, observa-se um declínio Norte-Sul das frequências de Pro em 17% em europeus da Suécia e 63% em africanos da Nígeria (SJALANDER et al., 1996; BECKMAN et al., 1994). Neste sentido, o polimorfismo é equilibrado, varia com a latitude e raça, e é mantido em diferentes frequências alélicas em toda a população (SULLIVAN et al., 2004).

A população brasileira é formada por uma mistura ampla de três diferentes raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos (PENA et al., 2011). Como consequência da miscigenação ela é hoje uma das populações mais heterogêneas do mundo. A heterogeneidade e miscigenação entre os diferentes grupos étnicos têm implicações importantes para o estudo e análise das frequências de polimorfismos (SUAREZ-KURTZ, 2009).

Entretanto, não acreditamos que nossos resultados sejam interpretados somente com base em resultados de etnia populacional. Uma característica importante de controle da atividade da TP53 é a interação com a proteína MDM2. Estas duas proteínas, assim, formam um circuito de *feedback* auto-regulador no qual a TP53 regula positivamente os níveis de MDM2 e esta por sua vez, regula negativamente os níveis de TP53 (HARRIS e LEVINE, 2005; HU et al, 2007).

Neste sentido, várias pesquisas foram desenvolvidas no objetivo de investigar se a variação polimórfica e interação de TP53 e MDM2 afetava o risco de desenvolver alguns cânceres, porém observaram-se resultados conflitantes.

Ellis e colaboradores (2008) estudaram o efeito interativo dos polimorfismos de TP53 e MDM2 na terapia na LMA e sugeriram que as variantes MDM2 e TP53 interagem para modular respostas genotóxica à terapia e são determinantes de risco para o tratamento da LMA.

Hu e colaboradores (2007) sugeriram que níveis mais elevados de MDM2 para o genótipo GG do SNP309 e oscilação de TP53-MDM2 podem contribuir para a tumorigênese em idade mais precoce de início no sexo feminino.

Já Xiong e colaboradores (2009) não encontraram associação entre o polimorfismo de *TP53* e *MDM2* no desenvolvimento para LMC, mas o genótipo homozigoto GG do SNP 309 de *MDM2* representou um fator de susceptibilidade genética na patogênese da LMA. Phang e colaboradores (2008) também não encontraram associação entre os polimorfismos de *TP53* e *MDM2*, entretanto, o alelo G do SNP309 de *MDM2* foi associado a um risco reduzido de leucemia em chineses.

Entretanto, quanto à divergência dos resultados encontrados na literatura, acreditamos que outros fatores possam interferir. Neste sentido, sugerimos que o gene *TP53* não seja o polimorfismo causal da resposta e resistência ao tratamento com imatinibe, mas ele está muito próximo do gene responsável, e que por efeito da fase de ligação (recombinação) influencia *TP53*. Desta forma, sugerimos que o gene causal da resposta ou resistência por efeito da recombinação estaria ligado ao alelo Pro e não ao alelo Ar

7. CONCLUSÃO

Apesar do número limitado de trabalhos que investigaram a associação do polimorfismo de *TP53* em leucemias, observaram-se resultados conflitantes, os quais podem ser atribuídos às características da população analisada. Em outras leucemias, como a LMA, a interação das proteínas TP53 e MDM-2 pode afetar as respostas genotóxicas ao seu tratamento e contribuir como um fator de risco à terapia.

Quanto ao polimorfismo de *TP53* em LMC, nossos resultados não estão de acordo com os dados da literatura, os quais sugerem que o genótipo Pro/Pro ou alelo Pro, pode conferir risco de desenvolver a doença ou resistência ao tratamento com imatinibe.

Nossos achados sugerem que pacientes Arg/Pro e Pro/Pro do gene TP53, responderam bem ao tratamento e que o genótipo Pro/Pro, representou um indicador para um bom prognóstico. Pacientes homozigotos para o genótipo Arg/Arg são quatro vezes mais susceptíveis a apresentar algum de resistência ao imatinibe. Dessa forma, o genótipo Arg/Arg representou um fator de risco na patogênese da LMC, contribuindo para um pior prognóstico da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, M.S.; VARMA, N.; VARMA, S.; RANA, K. S.; MALHOTRA, P. Cytogenetic & molecular analysis in adult chronic myelogenous leukaemia patients north in India, **India journal of medical research**, v. 135, n. 1, p. 42-48, 2012.

ALVES, R. C. Análise de pacientes com leucemia mielóide crônica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 166-177, 2009.

ANSCHAU, F.; SCHIMITT, V.M.; GONÇALVES, M. A. G.; GARICOCHEA, B. Associação entre o polimorfismo no codon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.10, p. 607-12, 2005.

ARTIGAS, C. G.; MELO, A.; ROA, J.C.; QUIJADA, I.; VITTINI, C.; CABRERA, M. E.; RISUENO, C. Transcritos de fusion del gen BCR/ABL em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. **International Journal of Morphology**, v. 21, n.13, p. 200-209, 2003.

BACCO, A. D.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S. L.; COTTER, T. G. Molecular abnormalities in Chronic Myeloid, **The oncologist**, v. 5, p. 405-415, 2000.

BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUS, A.; SIMONSS, B.; APPERLBAUM, F.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; CORTES, J.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOROWITZ, M.; HUGLES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; NIEDERWISER, D.; SILVER, R.; HEHLMANN, R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leucemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1809-1820, 2006.

BAJPAI, P.; TRIPATHI, A. K.; AGRAWAL, D. Genetic polymorphism of CYP3A5 in Indian chronic myeloid Leukemia patients, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.336, p. 49-54, 2010.

BARBOZA L. P., J. M. SOUZA, F. V. SIMÕES, I. C BRAGANÇA & E. ABDELHAY. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.

BECKMAN, G.; BIRGANDER, R.; SJALANDER, A.; SAHA, N.; HOLMBERG, P. A.; KIVELA, A.; BECKMAN, L. Is p53 polymorphism maintained by Natural Selection?, **Human heredity**, v. 44, p. 266-270, 1994.

BERGANTINI, A. P. F.; CASTRO, F. A.; SOUZA, A. M.; 2005. Leucemia Mielóide Crônica e o sistema Faz-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p.120-125, 2005.

BERGAMASCHI, G.; MERANTE, S.; ORLANDI, E.; GALLI, A.; BERNASCONI, P.; CAZZOLA, M. TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic myeloid leukemia, **Haematologica**, v. 89, n. 7, p. 868-869, 2004.

BHAMIDIPATI, P. K.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J.; CRONELISSON, A. M.; JABBOUR, E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia, **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 4, n. 2, p. 102-117, 2013.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BRANDES, A.; LERNER, T. G.; GONÇALVES-FILHO, R. P.; SOUZA, A. M. B.; BARBOSA, C. A. Análise de polimorfismo no códon 72 do gene TP53 em mulheres inférteis com e sem endometriose, **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 33, n. 1, p. 37-42, 2011.

BOCCHIA, M.; GENTILI, S.; ABRUZZESE, E.; FANELLI, A.; JULIANO, F.; TABILIO, A.; AMAKILI, M.; FORCONI, F.; GOZZETE, A.; RASPADORI, D.; AMADORI, S.; LAURIA, F. Effect a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with Chronic Myeloid Leukemia and persistent residual disease a multicentre observational trial. **The Lancet**, v. 365, p.657-662, 2005.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Chronic Myeloid Leukemia: natural history and classification, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 3-7, 2008.

BRANFORD, S.; HUGHES, T. P.; RUDZKI, Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics, **British Journal of Haematology**, v. 107, p. 587-599, 1999.

BRANFORD, S. Chronic Myeloid Leukemia: Molecular Monitoring in Clinical Practice American Society of Hematology, **hematology**, p. 376-383, 2007.

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. Nilotinib: A second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia, **Leukemia research**, v. 34, p. 129-134, 2010.

BURGESS, D. J. Targeted therapy re-enABLeD? **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 3099, 2011.

CALLEGARI-JAQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETI, S. G.; FERREIRA, S. E. ; HUTZ, M. H. Historical

genetecs: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population, **American Journal of Human Biology**, v. 15, p. 824-834, 2003.

CAVALCANTI, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA R. C. P53 e as neoplasias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CENTRO COCHRANE DO BRASIL. Leucemia mielóide crônica, São Paulo, p. 32, 2005.

CHAUFAILLE, M. L. L. F. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosino quinase, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 13-19, 2008.

CHEN, X. LIU, F.; LI, B.; WEI, Y-G.; YAN, L-N.; WEN, T. F. p53 codon 72 polymorphism and liver cancer susceptibility: A meta-analysis of epidemiologic studies, **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 9, p. 1211-1218, 2011.

CHU, S.; HOLTZ, M.; GUPTA, M.; BHATIA, R. BCR/ABL kinase inhibitor by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34⁺ cells, **Blood**, v. 103, n. 8, p. 3167-3174, 2004.

COHEN, M. H.; WILLAMS, G.; JOHSON, J. R.; DUAN, J. GOBBURU, J.; RAHMAN, A.; BENSON, K.; LEIGHTON, J.; KIM, S. K.; WOOD, R.; ROTHMANN, M. CHEN, G.; MAUNG, K.; STATEN, A. M.; PAZDUR, R. Approval Summary for Imatinib Mesylate Capsules in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia, **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 935-942, 2002.

COSTA, K. A.; GUILLO, L. A. TP53 codon 72 polymorphism in pigmentary phenotypes, **journal of biosciences**, n. 37, v. 1, p. 33-39, 2012.

CORNELISON, A. M., KANTARJIAN, H., CORTES, J., JABBOUR, E. Outcome of Treatment of Chronic Myeloid Leukemia With Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors After Imatinib Failure. **Clinical lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 11, n. S1, p. 101-110, 2011.

CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia, **Hematology oncology clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 569-584, 2004.

CORTES, J.E. JONES, D.; O'BRIEN, S.; JABBOUR, E.; KONOPLEVA, M.; FERRAJOLI, A.; KADIA, T.; BORTHAKUR, G.; STIGLIANO, D.; SHAN, J.; KANTARJIAN, H. Nilotinib As Front-Line Treatment for Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Early Chronic Phase, **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 392-397, 2009.

CREWS, L. A.; JAMIESON, C. H. M. Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell Biology. **Current hematologic malignancy reports**, v. 7, n. 2, p. 125-132, 2012.

DEININGER, MW.; GOLDMAN, JM.; MELO, JV.; The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.96, p. 3343-3356, 2000.

DEININGER, M. W.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2640-2653, 2005.

DEININGER, M. W. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib, **American Society of Hematology Education Book**, v. 1, p. 419-426, 2008.

DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. The inhibitors of tyrosine kinase, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 37-40, 2008.

DÍAZ-REGANÓ, I. R. Neoplasias hematológicas. In: **Tratado de geriatría para residentes**., Sociedad Española de Geriatría y Gerontología (SEGG); vários autores. 1 ed. España: Sociedad Española de Geriatría y Gerontología, 2007. 820p.

DO, T. N.; UCISIK-AKKAYA, E.; DAVIS, C. MORRISON, B. A.; DORAK, M. T. TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility, **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 195, p. 31-36, 2009.

DOBBIN J. A. e M. I. P. GADELHA. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48 (3) : 429-438, 2002.

DUMONT, P. LEU, J. I. J.; PIETRA III, A. C. D.; GEORGE, D. L.; MURPHY, M. The codon 72 have polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential, **Nature genetics**, v. 33, p. 357-365, 2003.

DUNNA, N.R.; VURE, S.; SAILAJA, K.; SUREKHA, D.; RAGHUNADHARAO, D.; RAJAPPA, S.; VISHNUPRIYA, S. TP53 codon 72 polymorphism and risk of acute leukemia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 347-350, 2012.

EDLUND, K. LARSSONB, O.; AMEURC, A.; BUNIKISC, I.; GYLLENSTENC, U.; LEROYD, B.; SUNDSTROMA, M.; MICKEA, P.; BOTLINGA, J.; SOUSSIB, T. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors, **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 24, p. 9551-9556, 2012.

ELLIS, N. A.; HUO, D.; YILDIZ, O.; WORRILOW, L. J.; BANERJEE, M.; BEAU, M. M. L.; LARSON, R. A.; ALLAN, J. M.; ONEL, K. *MDM2* SNP309 and *TP53* Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility, **Blood**, v. 12, n. 3, 741-749, 2008.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURSROCK, R.; KANTARJAN, H. M. The biology of chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.

FERREIRA, P. A. **Modulação das vias de sinalização para a indução de morte de células leucêmicas**. 2010. 149 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular - Bioquímica), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

FUNKE, M.; VANEUZA, M. C.; LIMA, D.; SETUBAL, D.; BITENCOURT, M.; BONFIN, M.C. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, p. 159-165, 2005.

GADZICKI D., N. NEUHOFF, D. STEINEMANN, M.JUST , G. BÜSCHE, H. KREIPE, L. WILKENS & B. SCHLEGELBERGER. *BCR-ABL* gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, n. 159, p.164-167, 2005.

GALIMBERTIA, S.; CERVETTIA, G.; GUERRINIA, F.; TESTIA, R.; PACINIA, S.; FAZIA, R.; SIMIB, P.; PETRINIA, M. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment, **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 162, p. 57-62, 2005.

GREGOR, J. M. M.; HARWOOD, C. A.; BROOKS, L.; FISHER, S. A.; KELLY, D. A.; O'NIONS, J.; YOUNG, A. R.; SURENTERAN, T.; BREUER, J.; MILLARD, T. P.; LEWIS, C. M.; LEIGHT, I. M.; STOREY, A. CROOK, T. Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. **The journal of investigative Dermatology**, v. 119, n. 1, p. 84-88, 2002.

GOLAS, J. M.; LUCAS, J.; ETIENE, C.; GOLAS, J.; DISCAFANI, C.; SRIDHARAN, L.; BOGHAERT, E.; ARNDT K.; YE, F.; BOSCHELLI, D. H.; LI, F.; TITSCH, C.; HUSELTON, C.; CHAUDHARY, I.; BOSCHELLI, F. SKI-606, a Src/Abl inhibitor with in vivo activity in colorn tumor xenograft models. **Cancer research**, v. 65, n. 12, p. 5358-5364, 2005.

GONZALÉS, D. M.; CABRERA, S. J.; HURLE, A. D. G. Farmacogenética en oncologia, **medicina clínica**, n. 131, v. 5, p. 184-195, Jul, 2008.

GOLDMAN, J. M. Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, London, v. 355, n. 9209, p. 1031-1032, 2000.

GRANDO, A. C.; WAGNER, S. C. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mieloide crônica por Real time – PCR. **Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 6, p. 433-440, dez. 2008.

GRANJA, F. **Avaliação do potencial de uso dos perfis genéticos de GSTO1 e P53 como marcadores de predisposição ao câncer da tireóide e como preditores de resposta ao tratamento**. 2005. 114f. Tese (Doutorado em clínica médica), Faculdade de Ciências médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. 9. ed. New York: Ed. Guanabara Koogan, 2009. 726p.

HAMÚ, C. S.; OLIVEIRA, M. V. P.; SILVA, A. M. T. C.; SILVA, C.C.; CRUZ, A.D. Polimorfismo do gene tp53 no códon72 m pacientes com suspeita de LMC. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n 4, p. 346-350, 2007.

HASFORD, J.; PFIRRMANN, M.; HEHLMANN, R.; ALLAN, N. C.; BACCARANI, M.; KLUIN-NELEMANS, J. C.; ALIMENA, G.; STEEGMANN, J. L.; ANSARI, H. A. – New prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa: **Journal Natural Cancer Institute**, 90: 850, 1998.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors prognostic, **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 52-57, 2008.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops, **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2899-2908, 2005.

HEHLMANN, R.; ANSARI, H.; HEIMPEL, H.; HOSSFELD, D. K.; KOLB, H. J.; LUFFLER, H.; PRALLE, H.; QUEISSER, W.; REITER, A.; HOCHHAU'S, A.; HU, W.; FENG, Z.; MA, L.; WAGNER, J.; RICE, J. J.; STOLOVITZKY, G.; LEVINE, A. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells, **Cancer research**, v. 67, n. 6, p.2757–2765, 2007.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic Myeloid Leukaemia, **Lancet**, v. 370, p.342-350, 2007.

HOCHHAUS, A. Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. **Expert Opinion**. v. 8, n. 18, p. 3257-3264, 2007.

HU, W.; FENG, Z.; MA, L.; WAGNER, J.; RICE, J. J.; STOLOVITZKY, G.; LEVINE, A. J. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells, **Cancer research**, v. 67, n. 6, p. 2757-2765, 2007.

HY, L.; YANG, M. C.; HUANG, C. H.; WU, W. J.; YU, T. J.; LUNG, F. W. Polymorphisms of TP53 are markers of bladder cancer vulnerability and prognosis, **Urologic Oncology**, v. 11, 2011.

GERMAN CML-STUDY GROUP – Comparative analysis of the impact of risk profile and of drug therapy on survival in CML using Sokal's index and a new score: **British Journal of Haematology**, v. 97, p. 76-85, 1997.

INCA. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**/ Instituto Nacional de Câncer.- Rio de Janeiro, 2010.

JABBOUR, E.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Treatment selection after imatinib resistance in chronic myeloid leukemia, **Target oncology**, v. 4, p. 3-10, 2009.

JABBOUR, E.; PARIKH, S. A.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. Chronic Myeloid Leukemia: Mechanisms of Resistance and Treatment, **Hematology/ oncology clinics of North America**, v. 25, p. 981-995, 2011.

JAISWAL S., D. TRAVER, T. MIYAMOTO, K. AKASHI, E. LAGASSE, I. L. WEISSMAN. Expression of BCR-ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p.10002-10007, 2003.

JAMUR, V. R. **Estudo citogenético de pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com mesilato de imatinibe**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas), Departamento de genética, Universidade Federal do Paraná. 2005.

JIN, X.; WU, X.; ROTH, J. A.; AMOS, C. I.; KING, T. M.; BRANCH, C.; HONN, S. E.; SPITZ, M. R. Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype, **Biochemical Pharmacology**, v. 16, n. 9, p. 2205-2208, 1995.

JOSHI, H.; BHANOT, G.; BORRESEN-DALE, A. L.; KRISTENSEN, V. Potential tumorigenic programs associated with TP53 mutation status reveal role of VEGF pathway, **British journal of cancer**, v. 107, n. 10, p. 1722-1728, 2012.

KALIDAS, M.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia. **Jama**, Chicago, v. 286, p. 895-898, 2001.

KANTARJIAN, H.; SHAH, N. P.; HOCHHAUS, A.; CORTES, J.; SHAH, S.; AYALA, M.; MOIRAGHI, B.; SHEN, Z.; MAYER, J.; PASQUINI, R.; NAKAMAE, H.; HUGUET, F.; BOQUÉ, C.; CHUAH, C.; BLEICKARDT, E.; BRADLEY-GARELIK, M. B.; ZHU, C.; SZATROWSKI, T.; SHAPIRO, D.; BACCANI, M. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia, **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2261-2270, 2010.

KANTARJIAN, H. M.; KEATING, J. M.; SMITH, T. L.; TALPAZ, M.; McCREDIE, K. B. – Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia: The **American Journal of Medicine**, v. 88, n. 1, 1990.

KAVALERCHIK, E.; GOFF, D.; JAMIESON, C. H. M. Chronic myeloid leukemia stem cells, **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 17, p. 2911-2915, 2008.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M. Questions raised by the Benelux CML Study Group: results from the randomized study with hydroxyurea alone versus hydroxyurea combined with low-dose interferon-alpha2b for chronic myeloid leukemia, **Blood**, v. 92, n. 8, p. 2984-2987, 1998.

KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C; et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **New English Journal of Medicine**, v.346, p.645-652, 2002.

KANTARJIAN, H. M.; GILES, F.; CARDAMA, A. Q.; CORTES, J. Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia, **Clinical cancer research**, v. 13, n. 4, p. 1089-1097, 2007.

KANTARJIAN, H.; SHAH, N. P.; HOCHHAUS, A.; et al. Dasatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, **New English Journal of Medicine**, v. 362, p. 2260-2270, 2010.

KOCHETHU, G.; DELGADO, J.; PEPPER, C.; STARCZYNSKI, J.; HOOPER, L.; KRISHNAN, S.; FEGAN, C.; PRATT, G. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia, **Leukemia research**, v. 30, p. 1113-1118, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1513 p.

LEVINE, A.; FINLAY, C. A.; INDS, P. W. P53 is a tumor suppressor gene, **Cell**, v. S116, p. S67-S69, 2004.

LEVINE, A. J p53, the Cellular Gatekeeper Review for Growth and Division, **Cell**, v. 88, p. 323-331, 1997.

LEVINSON, N, M.; BOXER, S. G. Inhibitor Bosutinib and an Isomer of Bosutinib Binding to the Abl Tyrosine Kinase Domain, **Plosone**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

LEWIN, B. **Genes VII**. Artmed Editora, Porto Alegre, 2001

LIMA, J.M.; SERAFIM, P.V.P.; SILVA, I. D. C. G.; FORONES, N. M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arq Gastroenterol**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 8-13, 2006.

LOMBARDO, L. J.; LEE, F. Y.; CHEN, P. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6- 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl) - (2-mehtylpyrimidin-4-ylamino) thiazole- 5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **Journal of Medical Chemistry**, v. 31, p. 6658-6661, 2004.

LOPES N. R.; ABREU, M. T. L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mielóide crônica, **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 449-453, 2009.

LOWENBERG B. Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1399–1401, 2003.

MAJID, A.; RICHARDS, T.; DUSANJH, P.; KENNEDY, D. B.; MIALL, F.; GESK, S.; SIEBERT, R.; WAGNER, S. D.; DYER, M. J. S. TP53 codon72 polymorphism in patients with chronic lymphocytic leukaemia: identification of a subgroup with mutated IGHV genes and poor clinical outcome, **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 529–540, 2011.

MARIN, M. C.; JOST, C. A.; BROOKS, L. A. IRWIN, M. S.; IRWIN, M. S.; O'NIONS, J.; TIDY, J. A.; JAMES, N.; MCGREGOR, J. M.; HARWOOD, C. A.; YULUG, I. G.; VOUSDEN, K. H.; ALLDAY, M. J.; GUSTERSON, B.; IKAWA, S.; HINDS, P. W.; CROOK, T.; KAELIN, W. G. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behavior, **Nature genetics**, v. 25, p. 47–54, 2000.

MELO, J. N.; HUGHES, P. T.; APPERLEY, J.F. Chronic myeloid leukemia, **Hematology**, p. 132-152, 2003.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Farmacogenética**, cap. I, v. 39, n. 4, p. 515-521, 2006.

MELO, J. V.; DEININGER, M. D. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation, **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 545-568, 2004.

MOEN, M. D.; MCKEAGE, K.; PLOKSER, G.; GREG, L.; SIDDIQUI, M. A. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia, **Drugs**, v. 67, p. 299-320, 2007.

MORALES, C.; TORRES, V.; VALENCIA, J. E.; RIBÓN, G.; MANRIQUE, R. D. Leucemia mieloide crónica: diagnóstico y tratamiento. **Revista CES Medicina**, v. 24, n. 1, p. 97-108, 2010.

MUGHAL T. I. & J. M. GOLDMAN. Leucemia mieloide crónica: STI 571 magnifica el dilema terapéutico. **European Journal of Cancer**, v. 1, p. 303-310, 2001.

NUNOBIT, O.; UEDA, M.; TOJI, E.; YAMAMOTO, M.; AKASHI, K.; SATO, N. Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis, **Pathology Research International**, p. 1-8, 2011.

O'BRIEN, S.; BERMAN, E.; BHALLA, K.; COPELAN, E. A.; DEVETTEN, M. P.; EMANUEL, P. D. ERBA, H. P.; GREENBERG, P. L.; MOORE, J. O.; PRZEPIORKA, D.; RADICH, J. P.; SCHILDER, R. J.; SHAMI, P.; SMITH, B. D.; SNYDER, D. S.; SOIFFER, R. J.; TALLMAN, M. S.; TALPAZ, M.; WETZER, M. National Comprehensive Cancer Network, Chronic myelogenous leukemia, **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 5, n. 5, p. 474-496, 2007.

O'HARE, T.; CHRISTOPHER, A.; DEININGER, E. N.; DEININGER, M. W. N. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia, **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2242-2249, 2007.

OHANIAN, M.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. Tyrosine kinase inhibitors in acute and chronic leukemias. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 13, p. 927-938, 2012.

OTERO L., G. B. CAVALCANTE JR., C. E. KLUMB, M. A. M. SCHEINER, E. P. S. MAGLUTA, T. S. FERNANDEZ, M. L. M. SILVA, V. PIRES, G. V. ANDRADE, R. C. MAIA & D. TABAK. Chromosome 17 abnormalities and mutation of the *TP53* gene: Correlation between cytogenetics, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 40-43, 2005.

ORSTED D. D.; BOJESSEN, S.E.; TYBJAERG-HANSEN, A.; NORFESTGAARD, B.G. Tumor Suppressor p53 Arg72Pro Polymorphism and Longevity Cancer Survival, and Risk of Cancer in the General Population. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p.1295-301, 2007.

OLIVIER, M; HOLLSTEIN, M; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use, **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, p. 1-16, 2010.

PAGNANO, K. B. B. Leucemia mieloide crônica – causas de falha so tratamento com mesilato de imatinibe, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 22-26, 2008.

PANG, B. H.; LINN, Y. C.; LI, H.; SABAPATHY, K. MDM2 SNP309 G allele decreases risk but does not affect onset age or survival of Chinese leukaemia patients, **European journal of cancer**, v. 44, p. 760-766, 2008.

PENA, S. D. J.; PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. S. G.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected,**Plosone**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2011.

PETERSON, L.F.; MITRIKESKA, E.; GIANNOLA, D.;LUI, Y.;SUN, H.; BIXBY,D.; MALEK, S. N.; DONATO, N.J.; WANG, S.; TALPAZ, M. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells, **Leukemia**, v. 25, p. 761-769, 2011.

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**, n. 84, n. 8, p.2391-2411, 1994.

PUTTINI, M.; COLUCCIA, A.M.; BOSCHELLI, F.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; DONELLA-DEANA, A.; AHMED, S.; REDAELLI, S.; PIAZZA, R.; MAGISTRONI, V.; ANDREONI, F.; SCAPOZZA, L.; FORMELLI, F.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11314-11322, 2006.

RAANANI P., I. BEN-BASSAT, S. GAN, L. TRAKHTENBROT, Z. MARK, O. ASHUR-FABIAN, S. ITSKOVICH, F. BROK-SIMONI, G. RECHAVI, N. AMARIGLIO & A. NAGLER. Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients –

comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. **European Journal of Haematology**, 73 : 243-250, 2004.

RADIVOYEVITCH, T.; HLATKY, L.; LANDAW, J.; SACHS, R. K.; Modelagem quantitativa da leucemia mielóide crônica: percepções de radiobiologia, **Blood**, v. 119, n. 19, p. 4363-4371.

RAYMOND, O. U.; PHILIP, M. G. B. Chronic myelogenous leukemia, **Hematologic malignancies**, v. 6, n. 4, p. 241, 1999.

ROBBINS, P. p53 and Breast Cancer, **International Journal of Surgical Pathology**, v. 4, n. 2, p. 93-110, 1996.

SAILAJA, K.; SUREKHA, D.; RAO, D. N.; RAO, D, R.; BALAKRISHNA, B.; VISHNUPRIYA, S. TP53 Codon 72 polymorphism and risk of chronic myeloid leukemia, **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 13, p. 316-320, 2009.

SAGLIO, G.; KIM, D.W.; ISSARAGRISIL, S. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **New English Journal of Medicine**, v. 362, p. 2251-2259, 2010.

SAMBROOK, J. RUSSELL, D. W. **Molecular cloning a laboratory manual**, 3 ed. 2001, p. 6.28-6.30.

SANCHÉZ-ORTEGA, I.; SERVITJE, O.; ARNAN, M.;ORTI, G.; PERALTA, T.; MARENZA, F.; DUARTE, R. F.; Dasatinib as Salvage Therapy for Steroid Refractory and Imatinib Resistant or Intolerant Sclerotic Chronic Graft-versus-Host Disease, **Biol blood marrow transplant**, v. 18, p. 309-329, 2012.

SATO, Y.; TSURUMI, T. Genomic guardian p53 and viral infections, **Review s in medical virology**, v. 10, p. 1738-1746, 2012.

SAVAGE, D. G; ANTMAN, K. H. Imatinib mesylate -a new oral targeted therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n.9, p. 683-93, 2002.

SAWYERS, C. L. Chronic Myeloid Leukemia, **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 13, p. 1330-1340, 1999.

SHARMA, A.; BAHL, A.; RAINA, V.; KUMAR, L.; GUPTA, R. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a limited Indian experience, **Asia-Pacific journal of clinical oncology**, v. 8, n. 4, p. 375-379, 2012.

SHEN, H.; LIU, Z.; STROM, S.; SPITZ, M. R.; LEE, J. E.; GERSHENWALD, J. E.; ROSS, M. I.; MANSFIELD, P. F.; DUVIC, M.; ANANTHASWAMY, H. N.; WEI, Q. p53 Codon 72 Arg homozygotes are associated with an increased risk of cutaneous melanoma, **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 6, p. 1510-1514, 2003.

SIDDIQUE, M. e SABAPATHY, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism, **Oncogene**, v. 25, p. 3489-3500, 2006.

SJALANDER, A.; BIRGANDER, R.; SAHA, N.; BECKMAN, L and BECKMAN, G p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. **Human Heredity**, v.46, p. 41-48, 1996.

SOKAL, J. E.; COX, E. B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G.A.; ROBERTSON, J.E.; TSO, C. Y.; BRAUN, T.J.; CLARKSON, B.D.; CERVANTES, F.; ROZMAN, C. prognostic Discrimination in "Good Risk" Chronic Granulocytic Leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p.789-799, Abr. 1984.

SOVERINI, S.; HOCHHOUS, A. NICOLINI, F. E.; GRUBER, F.; LANGE, T. SAGLIO, G. PANE, F.; MULLER, M. C.; ERNST, T.; ROSTI, G.; PORKKA, K. BACCARANI, M.; CROSS, N. C. P.; MARTINELLI, G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet, **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1208-1215, 2011.

STEIN, B.; SMITH, B. D. Treatment Options for patients with chronic myeloid leukemia who are resistant to or unable to tolerate imatinibe, **Clinical therapeutics** , v. 32, n. 5, p.805-820, 2010.

STEINBERG, M. Dasatinib: A Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia and PhiladelphiaChromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia, **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 11, p. 2289-2308, 2007.

STOKLOSA, T.; GOLAB, J. Prospect for p53-based cancer therapy, **Acta biochimica polonica**, v. 52, n. 2, p. 321-328, 2005.

STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I.M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. role of a p53 polymorphism in development of human papilomavirus-associated cancer. **Nature**. New York, v. 21, n. 393, p. 229-234, 1998.

SULLIVAN, A.; SYED, B.; GASCO, M.; BERGAMASCHI, D.; TRIGIANTE, G.; ATTARD, M.; HILLER, L.; FARRELL, P. J.; SMITH, P.; LU, X.; CROOK, T.

Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. **Oncogene**, V. 23, P. 3328-2337, 2004.

SULLIVAN, C.; PENG, C.; CHEN, Y.; LI, D.; LI, SHAOGUANG, L.; Targeted therapy of chronic myeloid leukemia, *Biochemical pharmacology*, v. 80, p. 584-591, 2010.

SUAREZ-KURTZ, G. Farmacogenômica e a diversidade genética da população brasileira. **Cad. Saúde Pública**, n. 25, v. 8, p. 1650-1651, 2009.

SHIH, L. Y.; KUOA, M. C.; KUO, C. Y.; LIND, T. H.; BAIE, L. Y.; CHENG, T. Y.; WANG, M. C.; LIN, T. L.; LAN, Y. J.; CHEN, C. C.; YANG, Y.; HSIAO, P. C.; LAI, C. L.; CHANG, C. H.; LIN, T. H. Emerging kinetics of BCR-ABL1 mutations and their effect on disease outcomes in chronic myeloid leukemia patients with imatinib failure, **Leukemia research**, v. 37, p. 43-49, 2013.

TIWARI, A. K.; SODANI, K.; WANG, S. R.; KUANG JR, Y. H.; ASHBY, C. R.; CHEN, X. CHEN, Z. S. Nilotinib (AMN107, Tasigna®) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters, **biochemical pharmacology**, v. 78, p. 153-161, 2009.

TRIFA, F; KARRAY-CHOUAYEKH, S.; MABROUK, I.; BACCOUCHE, S.; KHABIR, A.; SELAMI-BOUDAWARA, T.; GARGOURI, A.; MOKDAD-GARGOURI, R. Haplotype analysis of p53 polymorphisms: Arg72Pro, Ins16bp and G13964C in Tunisian patients with familial or sporadic breast cancer, **Cancer epidemiology**, v. 34, n. 2, p. 184-188, 2010.

VOLGELSTSEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature** , v. 408,p. 307-310, 2000.

ORSTED, D. D.; BOJESSEN, S.E.; HANSEN, T.; NODERSTGAARD, G. N. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. **The Journal Experimental Medicine**, v. 204, p. 1295-1301, 2007.

OIJEN, M. G. C. T.; SLOOTWEG, P. J. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 2138-2145, 2000.

XIONG, X.; WANG, M.; WANG, L.; LIU, J.; ZHAO, X. TIAN, Z.; WANG, J. Risk of MDM2 SNP309 alone or in combination with the p53 codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia, **Leukemia Research**, v. 33, p. 1454-1458, 2009.

WANG, Y. C.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. K.; YEN, Y. C.; LIN, P. *p53* polimorfismo no códon 72 em pacientes com câncer de pulmão de Taiwan: Associação com a susceptibilidade ao câncer de pulmão e Prognóstico, **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 129, 1999.

WHIBLEY, C. PHOAH, P. D. P.; HOLLSTEIN, M. *p53* polymorphisms: cancer Implications, **nature**, v. 9, p 95-107, 2009.

WENG, Y.; LU, L.; YUAN, G.; GUO, J.; ZHANG, Z.; XIE, X.; CHEN, G.; ZHANG, J. *p53* codon 72 polymorphism and Hematological Cancer Risk: An Update Meta-Analysis, **Plosone**, v. 7, n. 9, e-45820, 2012.

WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; BREITERNSTEIN, W.; BRUGGEN, J.; COWAN-JACOB, S. W.; RAY, A. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 7, p. 129-141, 2005.

WOESSNER, D. W.; LIM, C. S.; DEININGER, M. W. Development of an Effective Therapy for CML, **Cancer Journal**, v. 17, n. 6, p. 477-486, 2011.

ZHUO, W.; ZHANG, Y.; XIANG, Z.; CAI, L.; CHEN, Z. Polymorphisms of TP 53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12226 cases and 10782 controls, **Journal of experimental & Clinical cancer research**, v. 28, p.115, 2009.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1

Termo de consentimento livre e esclarecido:

Farmacogenética aplicada ao câncer no SUS: Quimioterapia individualizada e especificidade molecular para o Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica.

Pesquisador Principal: Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Investigador Clínico: Dr.º Renato Sampaio Tavares

Dr^a Adriana do Prado Barbosa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

O abaixo-assinado _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico Renato Sampaio Tavares e da pesquisadora Elisângela de Paula Silveira Lacerda.

OBJETIVO

1 - O objetivo do estudo é avaliar se os pacientes com Leucemia Mielóide Crônica respondem bem ao medicamento Glivec – do Laboratório Norvartes e correlacionar os resultados obtidos com o seu genótipo (informação genética) para o gene da CYP3A4/5, responsável por uma enzima do complexo Citocromo, responsável pela metabolização de quimioterápicos, entre eles o Glivec.

PROCEDIMENTOS

2 - Para a participação no estudo, você será convidado a ir ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Goiás, para verificar sua condição de saúde. Você será submetido a um exame completo, verificando pulso, temperatura e pressão arterial. Será feito um exame eletrocardiográfico (exame do coração). Serão coletadas amostras de sangue para análise dos genes metabólicos para o Glivec;

3 - Será coletada 1 amostra de sangue de 6mL para extração do DNA e investigação do gene responsável pela metabolização do medicamento em uso (Glivec), através de agulha introduzida em veia superficial para a realização de exames laboratoriais pré e pós-estudo.

4 - O material obtido será exclusivamente para esta pesquisa e que esta amostra será armazenada por 5 anos em nosso Laboratório de Pesquisa (Laboratório de Genética Molecular e Citogenética) da UFG e declaramos que toda nova pesquisa a ser feita com o seu material, um novo projeto será submetido para a aprovação do CEP e CONEP.

INFORMAÇÕES NECESSÁRIAS

5 - Você deve obter todas as informações necessárias, inclusive da utilização das amostras de sangue coletadas durante o estudo e os riscos que poderá estar sujeito, tendo condições de decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

Independente de sua vontade e permissão, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida em função de:

- a) Ocorrência de eventos adversos que sejam considerados clinicamente significativos pelo médico responsável e prejudiciais à saúde do voluntário;
- b) Ocorrência de qualquer doença que, a critério do médico, prejudique sua participação no estudo;
- c) Não cumprimento das normas estabelecidas;
- d) Qualquer outro motivo que, a critério médico, seja para seu próprio bem estar ou dos demais participantes;
- e) Da suspensão do estudo;

BENEFÍCIOS

7 - Sua participação no estudo é de caráter experimental, não tendo objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Não estão previstos procedimentos ou tratamento alternativo, a não ser seu atendimento e tratamento em função de intercorrências relacionadas ao estudo. Sua participação é muito importante e desta forma estará contribuindo efetivamente na garantia da qualidade do medicamento oferecido ao paciente.

POSSÍVEIS RISCOS

8 - *Cada voluntário deve compreender que a participação neste tipo de estudo envolve riscos que podem ser imprevistos, relacionados ou não ao estudo em questão. Equimoses ou hematomas (manchas roxas) transitórios no local de venopunção podem ocorrer.*

DESISTÊNCIA

9 - Sua participação neste estudo é voluntária, tendo a liberdade de desistir no momento que desejar sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico nesta Instituição. Caso você desista, deverá informar imediatamente sua decisão ao médico ou pesquisador responsável.

10 - A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do HC/UFG.

CONFIDENCIALIDADE

11 - Os registros que possam identificá-lo serão mantidos em sigilo. A UFG não o identificará por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o pesquisador principal, o patrocinador do estudo, os membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades dos órgãos regulamentares envolvidos, terão acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o objetivo de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem violar a condição de que as informações não podem ser divulgadas. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está

autorizando tal acesso, mesmo que desista do estudo.

INTERCORRÊNCIAS

12 - Qualquer malefício que você venha sofrer em decorrência direta de sua participação no estudo, receberá tratamento gratuito. Não haverá qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus da indenização prevista no Seguro de Vida.

13 - Durante e até seis meses após a realização deste estudo o voluntário está coberto por um seguro de vida, em relação a eventuais efeitos adversos que possam ter se originado da administração do medicamento.

14 - A coleta de sangue por tempos prolongados, por intermédio de uma única veia, pode levar à uma inflamação da mesma (tromboflebite) com dor e inchaço locais (quando aplicável).

ESCLARECIMENTOS DE DÚVIDAS

15 - Poderá contactar o Comitê de Ética em Pesquisa para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico pelos telefones (19) 3521-8936.

16 - Você tem a liberdade de contatar o Dr. Renato Sampaio Tavares e a Dra Adriana do Prado Barbosa para receber informações adicionais, relacionadas à pesquisa ou quanto aos seus direitos como voluntário.

17 - É condição indispensável para participação no ensaio clínico o paciente que esteja em tratamento com o mesilato de imatinibe (glivec) ou outros quimioterápicos.

RESSARCIMENTO

18 – Você será ressarcido das despesas e tempo despendido na realização do estudo clínico após a consulta de alta. Caso desista ou seja dispensado antes do término do estudo você receberá proporcionalmente ao tempo despendido. A desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

19 - O Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da UFG o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional e prestará qualquer

tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

Declaro que li atentamente este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo, recebendo explicações sobre o estudo, que responderam por completo minhas dúvidas. Também estou certificando que toda a informação prestada, incluindo minha história médica, é verdadeira até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe, auditores, Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas mesmas condições determinadas.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste estudo.

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura do Médico e do Pesquisador Principal

Goiânia, ____/____/____.

TELEFONES PARA CONTATO:

A qualquer momento, em caso de dúvidas, você poderá entrar em contato com a equipe da presente pesquisa através dos telefones abaixo:

Geneticista: Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda – Fone: (62) 3521-1481

Médico: Renato Sampaio Tavares - Fone: (62) 3240-1900

Médica: Adriana do Prado Barbosa – Fone: (62) 3269-8400

Pesquisador: Jeany Camelo Santos - Fone: (62) 81515307

Comitê de Ética - fone: (62) 3521-8936

9.2. Anexo 2

Protocol 6

Rapid Isolation of Mammalian DNA

MAMMALIAN DNA PREPARED ACCORDING TO THIS PROTOCOL is 20–50 kb in size and suitable for use as a template in PCRs. The yields of DNA vary between 0.5 and 3.0 µg/mg tissue or 5 and 15 µg per 300 µl of whole blood.

MATERIALS

CAUTION: Please see Appendix 12 for appropriate handling of materials marked with <!>.

Buffers and Solutions

Please see Appendix 1 for components of stock solutions, buffers, and reagents. Dilute stock solutions to the appropriate concentrations.

Cell lysis buffer

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
1 mM EDTA (pH 8.0)
0.1% (w/v) SDS

Store the buffer at room temperature, but chill an aliquot to 0°C in readiness for Step 2.

Ethanol

Isopropanol

Potassium acetate solution

60 ml of 5 M potassium acetate
11.5 ml of glacial acetic acid <!>
28.5 ml of H₂O

The resulting solution is 3 M with respect to potassium and 5 M with respect to acetate.

Store the buffer at room temperature.

Red blood cell lysis buffer

20 mM Tris-Cl (pH 7.6)

Store the buffer at room temperature.

TE (pH 7.6)

Enzymes and Buffers

DNase-free RNase (4 mg/ml)

Proteinase K (20 mg/ml)

Optional, please see Step 3 and Appendix 4.

Special Equipment

Aspiration device connected to a vacuum line

Microfuge pestle

This is available from Sigma in both hand-operated and motor-driven versions.

Mortar and pestle, prechilled with liquid nitrogen <1>

Water bath preset to either 55°C or 65°C

Cells and Tissues

Mammalian tissue or whole blood of interest

METHOD

1. Prepare tissue or whole blood for genomic DNA isolation.

FOR TISSUE

- a. Dissect 10–20 mg of tissue.
- b. Either mince the tissue finely with a razor blade/scalpel or freeze the tissue in liquid nitrogen and then grind it to a powder in a mortar prechilled with liquid nitrogen, as described in Protocol 1.

FOR BLOOD

- a. Transfer 300- μ l aliquots of whole blood to each of two microfuge tubes. Add 900 μ l of red blood cell lysis buffer to each tube and invert the capped tubes to mix the contents. Incubate the solution at room temperature for 10 minutes, occasionally inverting the tubes.
 - b. Centrifuge the tubes at maximum speed for 20 seconds at room temperature in a microfuge.
 - c. Discard all but 20 μ l of each supernatant.
 - d. Resuspend the pellets of white cells in the small amount of supernatant left in each tube. Combine the resuspended cell pellets in a single tube.
2. Transfer the minced tissue or the resuspended white blood cell pellets to a microfuge tube containing 600 μ l of ice-cold cell lysis buffer. Homogenize the suspension quickly with 30–50 strokes of a microfuge pestle.
The SDS will precipitate from the ice-cold cell lysis buffer producing a cloudy solution. This precipitation will not affect isolation of DNA.
 3. (*Optional*) Add 3 μ l of proteinase K solution to the lysate to increase the yield of genomic DNA. Incubate the digest for at least 3 hours but no more than 16 hours at 55°C.
 4. Allow the digest to cool to room temperature and then add 3 μ l of 4 mg/ml DNase-free RNase. Incubate the digest for 15–60 minutes at 37°C.
 5. Allow the sample to cool to room temperature. Add 200 μ l of potassium acetate solution and mix the contents of the tube by vortexing vigorously for 20 seconds.

6.30 Chapter 6: Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA

6. Pellet the precipitated protein/SDS complex by centrifugation at maximum speed for 3 minutes at 4°C in a microfuge.
A pellet of protein should be visible at the bottom of the microfuge tube after centrifugation. If not, incubate the lysate for 5 minutes on ice and repeat the centrifugation step.
7. Transfer the supernatant to a fresh microfuge tube containing 600 µl of isopropanol. Mix the solution well and then recover the precipitate of DNA by centrifuging the tube at maximum speed for 1 minute at room temperature in a microfuge.
8. Remove the supernatant by aspiration and add 600 µl of 70% ethanol to the DNA pellet. Invert the tube several times and centrifuge the tube at maximum speed for 1 minute at room temperature in a microfuge.
9. Carefully remove the supernatant by aspiration and allow the DNA pellet to dry in air for 15 minutes.
10. Redissolve the pellet of DNA in 100 µl of TE (pH 7.6).
The solubilization of the genomic DNA pellet can be facilitated by incubation for 16 hours at room temperature or for 1 hour at 65°C.

10. Manuscrito

Manuscrito submetido a revista Leukemia Research

**Analyses of Arg72Pro polymorphism of TP53 on the response to imatinib treatment
in Chronic Myeloid Leukemia patients**

JEANY CAMELO SANTOS

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Laboratório de Bioquímica Celular

Analyses of Arg72Pro polymorphism of TP53 on the response to imatinib treatment in Chronic Myeloid Leukemia patients

Jeany Camelo-Santos^a; Adriana do Prado Barbosa^b; Elisângela de Paula Silveira-Lacerda^c, Lídia Andreu Guillo^{a,*}.

^aLaboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, GO.

^bHospital das Clínicas, UFG, GO.

^cLaboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, GO.

Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, 74001-97, Goiânia, Goiás, Brazil.

Tel.: +55 62 3521-1495.

E-mail address: lidia.guillo@gmail.com (L. A. Guillo)

Abstract

The aim of this work is to investigate the polymorphism at codon 72 of the *TP53* gene in patients diagnosed with Chronic Myeloid Leukemia and their response to imatinib treatment. This study involved 85 CML patients, in which age of diagnosis, gender, disease phase, Sokal score, response and resistance to treatment have been taken into account. According to Sambrook, genomic DNA was extracted from 300 mL of peripheral blood. TP53 codon and 72 genotyping was performed by an allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), which detects Arg or Pro alleles. Frequency genotype distribution Pro/Pro, Arg/Pro and Arg/Arg was respectively 11% (4/35) 43% (15/35) 46% (16/35) for non-responders to imatinib and 16% (8/50), 62% (31/50) and 22% (11/30) for responders to imatinib. For the age of diagnosis, gender and disease phase criteria, no significant association was observed. For age those above 40 years old, it was observed that CML patients carrying the Arg/Arg genotype are four times more susceptible to produce any resistance to imatinib therapy. Our findings suggest that CML patients carrying the Arg/Pro and Pro/Pro genotypes responded well to treatment. Therefore, the Pro/Pro genotype represented an indication of a good outcome. To contrast, genotype Arg/Arg represented a risk factor for genetic susceptibility in the pathogenesis of CML, contributing to an worse outcome.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, codon 72, *TP53*, polymorphisms, imatinib.

1. Introduction

CML is a clonal myeloproliferative expansion of hematopoietic progenitor cells transformed and constitutes 14% of all leukemias with an incidence rate of 1.6 cases per 100,000 persons annually. The LMC progresses through three distinct clinical phases: chronic, accelerated and blast, making their treatment more resistant at each successive stage [1-3]. It is associated with a specific chromosomal translocation known as the Philadelphia (Ph^+), which is detected in 90-95% of patients with CML. The molecular consequence of the translocation is protein tyrosine kinase BCR-ABL [4-6] and based on its role in malignant transformation, BCR-ABL has served as targets for therapeutic intervention in CML [7].

Among the main therapeutic options for CML patients is allogeneic bone marrow transplantation (BMT), tyrosine kinase inhibitors, imatinib (Gleevec), nilotinib and dasatinib [8, 9].

In clinical practice, Imatinib (Gleevec®) has been used since 2001 to treat chronic myeloid leukemia (CML) [10]. Its mechanism of action is based on the inhibition of the chimeric oncoprotein BCR-ABL tyrosine kinase, disrupting downstream signaling pathways related to the malignant transformation [11-13]. Imatinib has proved a promising therapeutic agent, inducing particularly a chronic phase to a hematologic, cytogenetic and molecular response. Unfortunately, a substantial portion of patients develop resistance or are intolerant to imatinib treatment and new options for front-line treatment need to be available [14].

Its more potent tyrosine kinase inhibitors demonstrated efficacy to overcome refractoriness or intolerance to imatinib, except those with T315I mutation [15]. Nilotinib and dasatinib are potent inhibitors of BCR-ABL tyrosine kinase activity [16, 17] and have been introduced into clinics as a second-line option in the treatment of imatinib-resistant patients [18].

Additionally, many authors have addressed the influence of germline codon 72 polymorphism in the tumor suppressor gene *TP53* in clinical response to cancer drugs [19, 20]. The *TP53* is located on chromosome 17p13 encoding a fosfonuclear protein of 53 kD denominated TP53 [21]. This polymorphism is a proline (Pro) to arginine (Arg) substitution in amino acid residue 72 of human TP53 in normal and transformed cells. This

polymorphism results in two homozygous genotypes: Arg/Arg and Pro/Pro while Arg/Pro is heterozygous genotype [22, 23].

Studies reporting the association of the TP53 codon 72 polymorphism with clinical outcomes of leukemias have increasing in recent years [24, 25]. Concerning chronic myeloid leukemia, results are still scarce and inconclusive. Since Bergamaschi et al.'s publication, which showed that the allele proline was more frequent in CML patients than in controls and among CML patients with cytogenetic resistance to imatinib [26], very few citations have addressed the issue. More recently, Sailaja et al.'s [27] showed that the frequency of the homozygous proline genotype was elevated in the CML group compared to the control. However, others have found no association between TP53 polymorphism and the risk for developing CML [28]. Therefore, in this study, patients with CML were genotyped aiming to assess associations between the clinical outcomes and the polymorphism at codon 72 of TP53 gene.

2. Patients and methods

2.1. Study population

This study involved 85 CML patients treated at the Hematology Clinic, HC (Hospital das Clínicas) in Goiânia, Goiás, Brazil, for the diagnosis and control of disease. All patients who were treated with imatinib, individuals with hypersensitivity to imatinib, and individuals using dasatinib or nilotinib, were included in the study. Patients started their treatment by taking a once-daily administration of 400 mg of imatinib mesylate as first-line therapy. The study was approved by the Ethics Research Committee of the Federal University of Goiás.

Age of diagnosis, gender, disease phase, Sokal score, response and resistance to treatment, have been taken into account. Complete blood counts, cytogenetic and molecular analyses were performed every 3 months of therapy during the 18 months. A complete hematological response (CHR) was defined as a reduction in the white-cell count to less than 10,000 per cubic millimeter ($10 \times 10^9/L$) and in the platelet count of less than 450,000 per cubic millimeter ($450 \times 10^9/L$) in conjunction with reversal of splenomegaly, maintained for at least 4 weeks [29,30].

Molecular responses (MR) were obtained by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and performed by an independent laboratory. This technique is the most sensitive method of monitoring circulating leukemic cells. The level of BCR-ABL transcripts was measured and molecular response was categorized as complete (CMR, BCR-ABL mRNA undetectable) or major (MMR, ≥ 3 -log reduction of BCR-ABL mRNA). During imatinib treatment, patients may not respond to initial treatment (termed primary resistant) or may be intolerant to the drug. The National Cancer Institute of Brazil (INCA) guidelines recommended dose escalation (to 800 mg/day) or change to second-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) as nilotinib or dasatinib. In our study, according to the type of TKI, patients were categorized as responders to imatinib or non-responders to second-generation, based on the 18 months of treatment.

2.2 Genotyping Genomic

DNA was extracted from 300 μ L of peripheral blood according to Sambrook [31]. TP53 codon 72 genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR), which detects arginine or proline alleles. Fifty nanograms of template DNA were amplified using primer pairs specific for the two alleles. Primers for arginine (forward 5'-TCC CCC TTG CCG TCC CAA- 3' and reverse 5'-CTG GTG CAG GGG CCA CGC- 30) were used to amplify the 141-bp allele. Primers for proline (forward 5'-GCC AGA GGC TGC TCC CCC- 3' and reverse 5'-CGT GAC AGT CAC AGA CCT- 3') were used to amplify the 177 bp- fragment (Fig. 1). Two PCR assays were carried out in different tubes for each allele. The reaction mixture (25 μ L) contained 0,2 mM of each primer, 2.0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, and 1 unit of Taq polymerase Brazil (Invitrogen, USA). Both PCR conditions and primers were used as previously described in Storey et al [32] with slight modifications to reaction volume, enzyme concentration and thermocycling conditions. Cycling parameters were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for the Arg allele and 54 °C for the Pro allele for 1 min and 72 °C for 1 min followed by a final extension at 72 °C for 5 min. A negative control without a DNA template was included to ensure that no contamination was introduced. The amplification products were analyzed by gel electrophoresis (2% agarose) for 45 min at 120 V and stained with ethidium bromide.

2.3. Statistical method

Genotype analysis of the TP53 codon 72 polymorphism (Hardy–Weinberg equilibrium, allele and genotype distributions, and association analysis) was carried out using the software R Core Team, version 2.15.2, Vienna, Australia. The Fisher's test, based on a Monte Carlo procedure, was used to investigate possible correlations between genotypes and found variables. The significance level for statistical tests was 95% ($P < 0.05$). The Odds ratios (OR) and confidence intervals (CI) and P values were provided by software R Core Team.

3. Results

3.1. Descriptive features of the CML patients

This study involved 85 patients with CML. Table 1 shows the clinical features of 85 CML patients in chronic, accelerated and blast phase following by 18 months to imatinib therapy. The chronic phase consisted of 69 patients with a median age of 53 years and 2 months, of which 52% were female and 48% male. In the accelerated phase, eight patients were found with a mean age of 43 years and 2 months, of which 50% were male and 50% female. Only one male patient of 30 years was in blast crisis.

3.2. Genotypes distribution of TP53 codon 72 polymorphism

The frequency distribution of TP53 codon 72 polymorphisms is presented in Table 2. Frequency genotype distribution Pro/Pro, Arg/Pro and Arg/Arg was respectively 11% (4/35) 43% (15/35) 46% (16/35) for non-responders while 16% (8/50), 62% (31/50) and 22% (11/30) for responders to imatinib. Genotype distribution was in Hardy–Weinberg equilibrium proportion for the study population ($\chi^2 = 1, 12; P > 0, 05$). We used the critical value of 3.84 and degree of freedom 2.

Table 3 shows clinical data CML patients classified according the criteria: non-responders and responders to imatinib. For the age criterion, there is a tendency of an appearance of the disease in the age group above 40 years (65.8%) compared to the group under 40 years of age (34.2%), although not statistically significant ($P = 0.36$).

Table 4 shows genotypes and allele ratios with Sokal score (High x Intermediate/low). For the genotypes, the analysis of the Fisher's test, we found that Pro/Pro was significantly lower in the high Sokal score group than in the Intermediate/low Sokal group ($P = 0.017$, OR = 8.19).

For age 40 years and above in the disease diagnosis criterion, Table 5 shows the relationship between genotypes of responders and non-responders to imatinib treatment. Through the analysis of the Fisher's test, it was observed that Arg/Arg patients are four times more susceptible to produce any resistance to imatinib therapy while Arg/Pro and Pro/Pro patients responded better to treatment. This difference was statistically significant ($P = 0.012$).

3.3. Logistic regression

The variables age, gender, disease phase, genotype and Sokal score were used in the logistic regression (Table 6). It was observed that the genotype was significant ($P = 0.0159$). The odds ratio was 10.27 on average, ie the Arg/Pro genotype was, on average, ten times more responsive to treatment than Arg/Arg. Similarly, the Pro/Pro genotype averaged a response frequency ten times greater than Arg/Pro.

4. Discussion

Although a number of polymorphic genes are potential candidates to be associated with increased risk for CML, data on the role of their contribution to CML susceptibility are not consistent so far. Among them, we decided to investigate the polymorphism at codon 72 of the *TP53* gene due to the central role of the p53 protein in the induction of cell cycle arrest, senescence and apoptosis [33].

Currently, there is limited data on the association of *TP53* polymorphisms in leukemia [34]. In the present work, we first investigated the association of the *TP53* codon 72 polymorphism with clinical parameters (age of diagnosis, gender, disease phase, Sokal score and response or resistance to imatinib treatment) in CML patients. We did not find a significant association of polymorphisms in *TP53* codon 72 with age of diagnosis, gender or disease phase.

When CML patients were analyzed according to selection criteria (Table 2), it was observed that the Arg allele frequency was higher than Pro in both groups. Our findings are in agreement with the data regarding the Caucasian population, the predominant Brazilian population [35].

When patients were analyzed according to the selection criteria of Table 3, we did not find a significant association of polymorphisms in TP53 codon 72 with gender ($P = 0.82$). For other polymorphic genes such as *MDM-2* (SNP 309), the negative regulator of *TP53*, gender has been associated with the development of some cancers at an earlier age for females [36]. Our results indicate that the *TP53* codon 72 polymorphism does not affect the age or gender in CML patients.

According to Table 4, the Pro allele was lower in the group with High Sokal score (8/34) than in the Intermediate/low group (28/56) ($P = 0.015$). This data does not corroborate with the results presented by Bergamaschi et al.'s which found a Pro allele frequency significantly higher among the high-risk Sokal group than the low/intermediate risk group ($P = 0.016$) [Ref. 26].

According to age (Table 5), patients carrying the Arg/Arg genotype who are over 40 years old were four times more resistant to imatinib treatment ($OR = 4.40$; $P = 0.040$). This data does not corroborate the study of Sailaja et al.'s who found a higher frequency of Pro/Pro genotype and Pro allele in male patients above 30 years old [37].

According to the criteria of table 6, only genotype was significant ($P = 0.0159$). Thus, the results suggest the Pro/Pro genotype and Pro allele represent a good prognostic factor.

Studies in different population groups showed a significant difference in the prevalence of the Arg allele with latitude, showing that the polymorphism is related to environmental factors protected by natural selection. While the frequency of the Arg allele is higher in fair skin tone individuals and lower in darker skin tone individuals, there is a decline in Pro frequencies in North-South by 17% in Europe and 63% in Sweden and in Nigeria, Africa [35,38]. Thus, the balance of polymorphism varies with latitude and race, and is maintained in different allelic frequencies for the whole population [39].

However, we do not believe that our results are interpreted based only on ethnic differences. An important feature of controlling the activity of TP53 is the interaction with the protein MDM2. In this regard, several studies were undertaken in order to investigate

whether polymorphic variation and interaction of MDM2 and TP53 affected the risk of developing some cancers. Hu et al.'s suggested that higher levels of MDM2 in the SNP309 GG genotype and oscillation of P53-MDM2 may contribute to tumorigenesis with an earlier age of onset in females [36].

Xiong et al.'s found no significant association between the polymorphism of TP53 and MDM2 in CML development, but the homozygous GG of MDM2 - SNP 309 represented a genetic susceptibility factor in the pathogenesis of AML [40]. Phang et al.'s found no association between polymorphisms of MDM2 and TP53, however, the G allele of SNP309 was associated with a reduced risk of leukemia in Chinese [41].

However, the divergence of the results found in the literature can occur as a result of other confounders. In this sense, it is suggested that the TP53 gene polymorphism would not be a causal response or resistance to treatment, but the TP53 gene influences its effect of phase binding (recombination). Thus, the causal gene of the response or lack of response by the effect of recombination is linked to the Pro allele.

5. Conclusion

Our results are not in agreement with the literature data of CML, which suggests that the Pro/Pro genotype and the Pro allele can confer risk of developing disease or resistance to imatinib treatment.

Our findings suggest that patients Arg/Pro and Pro/Pro, responded well to treatment and that the Pro/Pro genotype represented an indicator of a good prognosis. Genotype Arg/Arg represented a risk factor for genetic susceptibility in the pathogenesis of CML, contributing to a worse prognosis.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

6. References

- [1] Bajpai P, Tripathi AK, Agrawal D. Genetic polymorphism of CYP3A5 in Indian chronic myeloid Leukemia patients, *Mol Cell Bioch* 2010, 336:49-54.
- [2] Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic mielogenous leukemia, *Jama* 2001; 286: 895-8.
- [3] Bergantini APF, Castro FA, Souza AM. Leucemia Mielóide Crônica e o sistema Faz-FasL, *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005, 27:120-5.
- [4] Anand MS, Varma N, Varma S, Rana KS, Malhotra P. Cytogenetic & molecular analysis in adult chronic myelogenous leukaemia patients north in India, *Indian J Med Res* 2012, 135:42-48.
- [5] Jabbour E, Parikh AS, Kantarjian H, Cortes J. Chronic Myeloid Leukemia: Mechanisms of Resistance and Treatment, *Hematol Oncol Clin North Am* 2011, 25: 981-95.
- [6] Crews LA, Jamieson CHM. Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell Biology, *Curr Hematol Malig Rep* 2012, 7:125-32.
- [7] Kantarjian, HM, Giles F, Cardama AQ, Cortes J. Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia, *Clin Cancer Res* 2007, 13:1089-97.
- [8] Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, Fanelli A, Juliano F, Tabilio A, et al. Effect a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with Chronic Myeloid Leukemia and persistent residual disease a multicentre observational trial, *The Lancet* 2005, 365:657-62.
- [9] Grando AC, Wagnser SC. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real time – PCR, *J Bras Patol Med Lab* 2008, 44:433-40.
- [10] Moen MD, McKeage K, Plokser G, Greg L, Siddiqui MA. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs* 2007, 67:299–320.
- [11] Quinta's-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009, 113:1619–30.
- [12] Karvela M, Helgason GV, Holyoake TL. Mechanisms and novel approaches in overriding tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012, 12:381–92.
- [13] Hanctschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:33–44.
- [14] Breccia M, Alimena, G. Nilotinib: A second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia, *Curr Cancer Drug Targets* 2010, 34:129-34.
- [15] Shih LY, Kuo MC, Kuo CY, Lind TH, Baie LY, Cheng TY, et al. Emerging kinetics of BCR–ABL1 mutations and their effect on disease outcomes in chronic myeloid leukemia patients with imatinib failure, *Leuk Res* 2013, 7:43-9.

- [16] Lombardo LJ, Lee FY, Chen P. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-(2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004, 47:6658–61.
- [17] O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005, 65:4500–5.
- [18] Stein B, Smith BD. Treatment options for patients with chronic myeloid leukemia who are resistant to or unable to tolerate imatinib. *Clin Ther* 2010, 32:804–20.
- [19] Sullivan A, Syed B, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004, 23:3328–37.
- [20] Vikhanskaya F, Siddique MM, Lee MK, Broggini M, Sabapathy K. Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin Cancer Res* 2005, 11:4348–56.
- [21] Nunobit O, Ueda M, Toji E, Yamamoto M, Akashi K, Sato N. *Patholog Res Int* 2011, 1-8.
- [22] Orsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen, Noderstgaard GN. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J Exp Med* 2007, 204:1295–301.
- [23] Zhuo W, Zhang Y, Xiang Z, Cai L, Chen Z. Polymorphisms of TP 53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12226 cases and 10782 controls, *J Exp Clin Cancer Res* 200, 28:115.
- [24] Dunna NR, Vure S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk of acute leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, 13:347–50.
- [25] Xiong X, Wang M, Wang L, Liu J, Zhao X, Tian Z, et al. Risk of MDM2 SNP309 alone or in combination with the p53 codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009, 33:1454–8.
- [26] Bergamaschi G, Merante S, Orlandi E, Galli A, Bernasconi P, Cazzola M. TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2004, 89:868–9.
- [27] Sailaja K, Surekha D, Nageswara Rao D, Raghunadha Rao D, Balakrishna B, Vishnupriya S. TP53 codon 72 polymorphism and risk of chronic myeloid leukemia. *Gene Ther Mol Biol* 2009, 13:316–20.

- [28] Hamu CS, Oliveira MVP, Silva AMTC, Silva CC, Cruz AD. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients suspected to have CML. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007, 29:346–50.
- [29] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger EB, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001, 344:1031–7.
- [30] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonss B, Apperlbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leucemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, *Blood* 2006, 1809-20.
- [31] SAMBROOK, J. RUSSELL, D. W. *Molecular cloning a laboratory manual*, 3 ed. 2001p. 6.28-6.30.
- [32] Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papiloma-virus-associated cancer. *Nature* 1998, 393:229–34.
- [33] Hrstka R, Coated PJ, Vojtesek B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathways: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *J Cell Mol Med* 2009, 13:440–53.
- [34] Do TN, Ucisik-Akkaya E, Davis C, Morrison BA, Dorak MT. TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility, *Cancer Genet Cytogenet* 2009, 195:31-6.
- [35] Sjalander A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphism and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 1996, 46:41–8.
- [36] Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G, et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells, *Cancer Res* 2007, 67:2757-65.
- [37] Sailaja K, Surekha D, Nageswara Rao D, Raghunadha Rao D, Balakrishna B, Vishnupriya S. TP53 codon 72 polymorphism and risk of chronic myeloid leukemia. *Gene Ther Mol Biol* 2009, 13:316–20.
- [38] Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, et al. Is p53 polymorphism maintained by Natural Selection? *Hum hered* 1994, 44:266-70.
- [39] Sullivan A, Syed B, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiant G, Attard M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004, 23:3328–37.
- [40] Xiong X, Wang M, Wang L, Liu J, Zhao X, Tian Z, et al. Risk of MDM2 SNP309 alone or in combination with the p53 codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009, 33:1454–8.
- [41] Pang BH, Linn YC, Li H, Sabapathy K. MDM2 SNP309 G allele decreases risk but does not affect onset age or survival of Chinese leukaemia patients, *Eur J Cancer* 2008, 44:760-6.

Table and figure Legends

Table and figure Legends

Figure 1. Detection of PCR product amplification of TP53 codon 72 gene by agarose gel electrophoresis.

Table 1. Features of 85 CML patients treated with imatinib classified according to disease phase.

Table 2. Distribution of TP53 polymorphism in 85 patients with chronic myeloid leucemia.

Table 3. Association between response and resistance to imatinib and clinical outcomes.

Table 4. Distribution of allele and genotype frequencies for polymorphism according to the Sokal score.

Table 5. Association of polymorphism in *TP53* responders and non-responders to imatinib treatment in patients above 40 years old.

Table 6. Multivariate logistic regression of the variables under study in CML patients.

Tables

Table 1

	Chronic phase	Accelerated phase	Blast crisis
Age	53,4±15,8	43,2±13,0	30
Sex			
Male	(36)	(4)	(1)
Female	(33)	(4)	0
Interval between diagnosis and imatinib (months)	14,8±23,4	3,4±3,5	1
Cytogenetic response at 18 months (individuals)			
Complete	62% (44)	43% (3)	100% (1)

Figure 1.

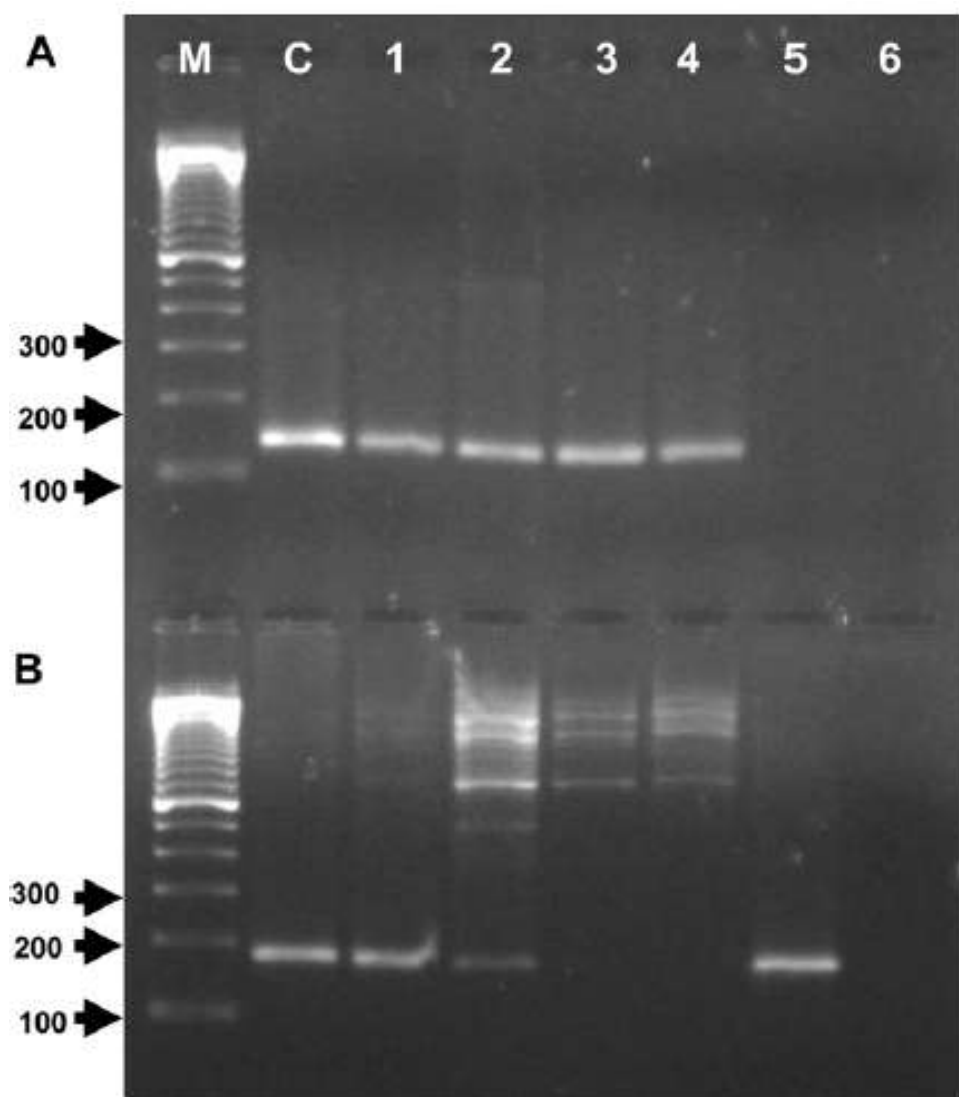


Fig. 1. Detection of PCR product amplification of TP53 codon 72 gene by agarose gel electrophoresis. A. Arginine (Arg) allele. B. Proline (Pro) allele. Lanes 1–5: PCR products of some samples. Arg/Pro genotypes: lanes 1 and 2; Arg/Arg: lanes 3 and 4; Pro/Pro: lane 5. Negative control: line 6. C: positive control for arginine and proline alleles in A and B respectively. M: 100 bp molecular weight marker (arrowheads).

Table 2

Genotypes

Alleles frequency

	Pro/Pro %(n)	Arg/Pro %(n)	Arg/Arg %(n)		Pro %(n)	Arg %(n)	
Non responders (study group)	11% (4)	43% (15)	46% (16)	P=0,072 DF=2	33% (23)	67% (47)	P = 0,081 OR=1,81 IC=0,96-3,41
Responders (control group)	16% (8)	62% (31)	22% (11)		47% (47)	53% (53)	

DF = Degree of Freedom.

Table 3

Features	Non responders to imatinib	Responders to imatinib	Significance
Age at diagnostic			
< 40	14	15	OR (IC) = 1,55 (0,63-3,85)
> 40	21	35	P=0,36
Sex			
Male	19	25	OR (IC) = 0,84 (0,35-2,00)
Female	16	25	P=0,82
Stage of disease			
Chronic	26	43	OR (IC) = 2,06 (0,50-8,40)
Accelerated/Blast	5	4	P= 0,47
Sokal score			
High	5	12	OR (IC) = 0,65 (0,16-2,60)
Intermediate/Low	6	22	P= 0,72

Table 4

Sokal score	Genotypes				Alleles		
	Pro/Pro %(n)	Pro/Arg %(n)	Arg/Arg %(n)		Pro %(n)	Arg %(n)	
High (17)	0(0)	47(8)	53(9)	P= 0,017 OR=8,19 IC=0,42-158,3	24(8)	76(26)	P= 0,015 OR=0,30 IC=0,11-0,79
Intermediate/Low (28)	18(5)	64(18)	18(5)	GL=2	50 (28)	50(28)	

Table 5

Genotypes	Non responders to imatinib	Responders to imatinib	OR (IC)	P
Pro/Pro	3	6		
Arg/Pro	7	22	4,40(1,33-14,49)	0,040
Arg/Arg	11	7		

Table 6

Variables	Estimates of the logistic regression coefficients	Standard error	P	OR	IC
Age	0,0274	0,02855	0,3369	1,0278	0,9746-1,0937
Sex	-0,6796	0,8521	0,4251	0,5067	0,0844-2,5911
CML phase	-1,3729	1,4663	0,3491	0,2534	0,0142-7,2866
Genotype	2,3294	0,9657	0,0159	10,2719	1,8530-91,5926
Sokal score	0,0015	0,6064	0,9980	1,0015	0,2995-3,5351