

Artigo / Article

Polimorfismo do gene *tp53* no códon 72 em pacientes com suspeita de LMC

Codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients suspected to have CML

Camila S. Hamú¹Marcus Vinícius P. Oliveira²Antonio Márcio T. C. Silva³Cláudio Carlos Silva³Aparecido Divino Cruz⁴

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença proliferativa do sistema hematopoiético, caracterizada pela expansão clonal de uma célula-tronco primitiva e pluripotente denominada stem cell. Este tipo de leucemia está associado, em 90% dos casos, à translocação t(9;22)(q34;q11). Essa alteração cromossômica estrutural codifica para uma proteína quimérica BCR-ABL, que confere às células leucêmicas uma alta resistência à morte, independente do agente indutor desse processo. A proteína p53 é uma reguladora transcricional induzida por danos no DNA, fato que resulta na parada do ciclo celular com conseqüente ativação de mecanismos de reparo ou mesmo na indução à apoptose. As mutações no gene TP53 são as alterações genéticas mais comuns em tumores malignos humanos. O presente estudo teve como objetivo genotipar e determinar a frequência alélica do polimorfismo do TP53 no códon 72 (arginina - Arg e prolina - Pro), em pacientes com suspeita de LMC, pela Reação em Cadeia da Polimerase. Desta forma, os resultados indicaram que 73,4% (23/30) dos pacientes apresentaram homozigose para arginina (Arg/Arg) e 26,6% (7/30) heterozigose (Arg/Pro). Não foi encontrado nenhum paciente homozigoto para prolina (Pro/Pro). Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo do gene TP53 no códon 72 não é um fator de risco importante para a iniciação, promoção e progressão da LMC. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):346-350.

Palavras-chave: Leucemia mielóide crônica; LMC; polimorfismo; TP53.

Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) foi provavelmente a primeira forma de leucemia reconhecida pela sua distinta individualidade. Em 1960, Nowell e Hungerford detectaram uma consistente anormalidade cromossômica, denominada posteriormente de cromossomo Philadelphia (Ph), e identificado como 22q- em indivíduos que apresentavam esplenomegalia maciça associada à leucocitose idiopática.¹ Em 1973, Rowley observou que o cromossomo Ph era resultante de uma translocação recíproca envolvendo também o cro-

mossomo 9. Atualmente, a anormalidade é descrita citogeneticamente como t(9;22)(q34;q11). Em 1980 constatou-se que o cromossomo Ph apresentava uma única fusão gênica, denominada BCR/ABL. Esta seqüência híbrida de DNA é resultante da união do proto-oncogene ABL (Abelson), presente no cromossomo 9, e do gene BCR (do inglês, Breakpoint Cluster Region), do próprio cromossomo 22. Este gene quimérico, BCR/ABL, é traduzido em uma proteína de 210kDa (p210), com atividade aumentada de tirosina quinase, apresentando grande importância na patogênese da doença.² O estímulo de BCR/ABL leva à proliferação excessiva de

¹Biomédica especialista em Genética, Núcleo de Pesquisas Replicon, Depto. de Biologia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia/GO, Brasil.

²Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás; Docente e pesquisador do Núcleo de Pesquisas Replicon, Depto. de Biologia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia/GO, Brasil.

³Mestre em Genética pela Universidade Federal de Goiás; Docente do Programa de Especialização em Genética e pesquisador do Núcleo de Pesquisas Replicon, Depto. de Biologia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia/GO, Brasil.

⁴Ph.D. pela Universidade de Victoria, Canadá; Docente do Programa de Especialização em Genética e coordenador do Núcleo de Pesquisas Replicon, Depto. de Biologia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia/GO, Brasil.

Local do estudo: Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia, Universidade Católica de Goiás, UCG, Goiânia/GO, Brasil.

Correspondência: Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva.
Av. Universitária, 1.069 – Setor Universitário – Cx. Postal 86
74605-010 – Goiânia-GO – Brasil
Tel./Fax.: (62) 3948-1084
E-mail: msilvajba@uol.com.br.

células da linhagem mielóide. Em conseqüência, há depleção de nutrientes, o que compromete a diferenciação e maturação das células das linhagens eritrocíticas e linfocíticas da medula óssea.³

A LMC é uma doença proliferativa do sistema hematopoiético, caracterizada pela expansão clonal de uma célula-tronco primitiva e pluripotente, denominada *stem cell*, que tem a capacidade de se diferenciar em várias células do tecido sanguíneo. Ao diagnóstico, cerca de 90% dos pacientes apresentam um cariótipo marcador na maioria de suas metáfases em células de medula óssea: o cromossomo Ph. Em LMC Ph-positivo, a translocação é encontrada em todas as linhagens celulares hematopoiéticas, sendo menos freqüente em células B e T.⁴ A LMC é mais freqüente em adultos entre 40 e 60 anos de idade e afeta ambos os sexos, mas com predominância no sexo masculino. A progressão clínica da LMC pode ser em três fases: crônica, acelerada e blástica.⁴ O diagnóstico da LMC, seguindo as normas do Inca (Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde), é feito por meio da anamnese e do exame físico, do hemograma e da plaquetometria, da morfologia do sangue periférico, do mielograma, da citoquímica e da imunofenotipagem, da citogenética da medula óssea, da Reação em Cadeia da Polimerase qualitativa (pesquisa do marcador molecular *BCR-ABL* no sangue periférico ou na medula óssea), da biópsia de medula óssea, incluindo determinação de fibrose medular.⁵ A progressão da LMC é usualmente associada à aquisição adicional de anormalidades citogenéticas, incluindo alterações envolvendo o braço curto do cromossomo 17 (17p). Essa região, mais especificamente 17p13, contém o gene supressor de tumor *TP53*.⁶

A proteína p53 é uma reguladora transcricional induzida por danos no DNA, fato que resulta na parada do ciclo celular com conseqüente ativação de mecanismos de reparo ou mesmo na indução à apoptose. Nestas situações, a p53 tem a capacidade de parar ou mesmo retardar a progressão do ciclo celular nos pontos de checagem (*checkpoints*) para que o DNA possa ser reparado. Caso o dano persista, a célula é eliminada por apoptose. Em tecidos normais, a p53 é mantida em baixos níveis. Tumores possuem uma p53 mutante, uma vez que esta adota uma conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem.⁶ Uma mutação pontual ou mais extensa no gene *TP53* altera de forma significativa a proteína p53, o que resulta na incapacidade de efetuar a parada no ciclo celular ou disparar o mecanismo de apoptose. Mutações que acometem o gene *TP53* são as mais freqüentemente encontradas em cânceres humanos, com aproximadamente 50% a 80% dos casos.⁷ A importância do gene *TP53* está no fato de ser um gene supressor de tumor que aumenta a longevidade celular e inibe o desenvolvimento do câncer. Assim, não só as mutações são importantes como também outros aspectos como, por exemplo, os polimorfismos da proteína codificada por este gene. Estes polimorfismos resultantes de mudanças de códons podem causar altera-

ções sutis ou até mesmo dramáticas na atividade da proteína. Neste contexto, o polimorfismo de p53 mais estudado é o do códon 72, podendo codificar uma proteína com arginina (Arg) ou prolina (Pro) nesta posição. A freqüência alélica de Arg nesse códon, na população caucasiana, é de aproximadamente 70%, enquanto a freqüência de Pro é de 30%, e é produzida por uma única troca nucleotídica de guanina para citosina.⁸

O objetivo do presente estudo foi genotipar e determinar a freqüência alélica do polimorfismo do gene *TP53* no códon 72 (Arg e Pro), em pacientes com suspeita de leucemia mielóide crônica.

Casuística e Métodos

Grupo amostral

Foram incluídos neste estudo pacientes que procuraram o Laboratório de Genética Humana e Citogenética Molecular (LaGene) da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás, nos anos de 2004 e 2005, com indicação clínica para a pesquisa do cromossomo Ph para o diagnóstico de LMC ou para o controle dessa patologia com uso de medicamentos (como, por exemplo, o Glivec®). Adicionalmente, indivíduos saudáveis foram avaliados e constituíram o grupo controle.

Assim, houve a participação de sessenta indivíduos, distribuídos em dois grupos: (1) casos, com trinta pacientes e (2) controle, com trinta indivíduos saudáveis. A participação foi voluntária e sigilosa. Após as devidas explicações dos responsáveis pela pesquisa, todos os participantes concordaram em doar amostras, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Reação em cadeia da polimerase

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (*PCR – Polymerase chain reaction*), fez-se extração do DNA a partir da cultura celular de medula óssea para o grupo dos casos e sangue periférico para o grupo controle, por meio do kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega Corporation, EUA). Para a amplificação das regiões de interesse, utilizaram-se *primers* específicos (Quadro 1), com um protocolo de termociclagem distinta para cada polimorfismo Arg e Pro (Quadro 2).

Quadro 1. Seqüência dos *primers* usados na PCR para amplificação do polimorfismo de p53

Primer*	Seqüência (5' → 3')	Tamanho do Amplicon (pb)
Polimorfismo		
P53Pro+/p53-	5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC 5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT	177
P53+/Arg-	5' TCC CCC TTG CCG TCC CAA 5'CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141

*Sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda.

Quadro 2. Protocolo de Termociclagem para fragmentos de Pro (P) e Arg (A)

Etapas dos ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
	94	1	
Amplificação cíclica	54 P e 60 A	1	35
	72	1	
Extensão final	72	5	1
Armazenamento	4	00	00

Os fragmentos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 8% em TBE 1X, em campo elétrico constante de 10 V/cm por duas horas. Para a visualização do DNA amplificado, foi feita coloração do gel em solução de nitrato de prata, posteriormente seco em um Model GD2000 Hoefer® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), à temperatura de 60°C por quatro horas.

Estatística

Os dados da genotipagem, tanto dos casos como dos controles, foram calculados com o auxílio do *software GenePop web version 3.4*. A utilização deste programa permitiu avaliar as frequências alélicas e genotípicas das populações de casos e de controles, o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a sua diferenciação gênica e genotípica.

Resultados

No grupo teste foram analisadas trinta amostras de pacientes com idade entre 2 e 85 anos (média = 43,5 anos), sendo 17 do sexo masculino e 12 do sexo feminino. Neste grupo, 76,7% dos pacientes apresentaram homozigose para arginina (Arg/Arg) e 23,3%, heterozigotos (Arg/Pro). Não foi encontrado nenhum paciente homozigoto para prolina.

No grupo controle também foram analisadas trinta amostras de indivíduos saudáveis, com idade entre 19 e 74 anos (média = 37,0 anos), sendo 26 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Destes, 70,0% apresentaram homozigose para arginina (Arg/Arg), 23,3%, heterozigose (Arg/Pro) e 6,7%, homozigose para prolina (Pro/Pro).

A distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo do *TP53* estão representadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. O alelo *TP53Arg* foi o mais encontrado no grupo amostral e nos controles (p = 0,8833 e 0,8167,

Tabela 1. Distribuição das frequências alélicas nos grupos caso e controle

Alelo	Caso: % (n)	Controle: % (n)
p53Arg	88,33 (53)	81,67 (49)
p53Pro	11,67 (7)	18,33 (11)
Total	100 (60)	100 (60)
$\chi^2 = 1,63$	GL: 2	p=0,44

Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas nos grupos caso e controle

Alelo	Caso: % (n)	Controle: % (n)
p53Arg/Arg	76,7 (23/30)	70,0 (21/30)
p53Arg/Pro	23,3 (7/30)	23,3 (7/30)
p53Pro/Pro	0 (0/30)	6,7 (2/30)
Total	100 (30)	100 (30)
$\chi^2 = 1,51$	GL: 2	p=0,47

Tabela 3. Distribuição das frequências observadas e esperadas para os grupos caso e controle

Genótipo	Casos		Controles	
	Esperado	Observado	Esperado	Observado
p53Arg/Arg	23,36	23	19,93	21
p53Arg/Pro	6,29	7	9,14	7
p53Pro/Pro	0,35	0	0,93	2
Total		30		30
$\chi^2 = 2,98$		GL: 4		p=0,5

respectivamente). Ao aplicar o teste de Hardy-Weinberg, observou-se que as populações não se encontram em equilíbrio para o códon 72 de *TP53* (p = 0,561). A distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas encontra-se na Tabela 3.

Discussão

A ciência busca entender a dinâmica fisiopatológica que envolve a iniciação, promoção e progressão dos cânceres humanos. Para isso, inúmeras pesquisas são realizadas em todas as partes do mundo. Buscam-se respostas para questionamentos como: Qual a idade mais susceptível a um determinado câncer? Qual o sexo mais atingido? Quais as alterações celulares e moleculares características de cada tumor maligno? Isso tudo na tentativa de diminuir a incidência desta patologia em especial ou mesmo encontrar terapêuticas eficazes para o seu combate, diminuindo assim a mortalidade e a morbidade dos cânceres.

Algumas pesquisas retratam o gene *TP53* como um fator importante na gênese de vários tumores. Alterações deste gene ou mesmo determinados polimorfismos são considerados fatores de risco para a população no que se refere às patologias neoplásicas.⁹ Isso porque o *TP53* é um gene supressor de tumor que se encontra mutado em praticamente todos os cânceres humanos. Os genes supressores de tumor têm a função de controlar negativamente a proliferação e a sobrevivência celular. Estima-se que os sinais da p53 estão comprometidos em pelo menos 50% de todos os cânceres.⁸

A proteína quimérica BCR/ABL, formada a partir da fusão dos genes homônimos, confere à célula leucêmica uma alta resistência à morte celular independentemente do agente indutor desse processo. Neste contexto, o mesilato de

imatinibe (Glivec®) tem a função de bloquear a atividade de quinase da proteína BCR/ABL, levando à remissão da LMC em quase todos pacientes. Dos trinta pacientes que participaram deste estudo, sete eram portadores de LMC e estavam em tratamento com o Glivec®. Desses sete pacientes, 71,4% eram Arg/Arg e 28,6% Arg/Pro.

Em um estudo relativamente recente,¹⁰ avaliou-se a resistência ao mesilato de imatinibe. Foram incluídos no estudo 44 pacientes portadores de LMC que não apresentavam resposta ao imatinibe. Um total de 29,7% desses pacientes era Pro/Pro, enquanto no grupo controle apenas 21,6% apresentavam essa característica genética. A frequência do alelo Pro foi de 28,8% em 52 amostras, 23,5% em 34 pacientes com resposta ao imatinibe e em 55,0% dos pacientes com resistência ao imatinibe. Concluiu-se que o alelo Pro representa um fator de risco para o desenvolvimento da LMC e a uma resistência à resposta citogenética primária ao tratamento com o imatinibe, evento que ocorre devido ao fato de as células leucêmicas expressarem a proteína p53Pro72 mais resistentes à apoptose induzida pelo imatinibe, do que as exclusivamente p53Arg72.¹⁰ Talvez isso se deva ao fato de que o alelo Pro apresente um potencial apoptótico menor que a Arg, conferindo às células uma maior longevidade. Portanto, indivíduos com LMC e alelos Pro/Pro possuem um prognóstico ruim porque a p53Pro é um supressor de tumor mais fraco que a Arg.¹⁰

Adicionalmente, em outro estudo,⁶ as mutações do gene *TP53* são consideradas as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 60% das neoplasias. Nas hemopatias malignas essas alterações são observadas com menor frequência que em tumores sólidos, estando, porém, diretamente relacionadas com aqueles casos que apresentam evolução clínica desfavorável.⁶ Aparentemente, há uma perda residual do alelo *TP53* selvagem durante a progressão da LMC para a crise blástica. Praticamente metade dos casos onde há perda do 17p não demonstra inativação do *TP53*. No entanto, a perda do 17p e a inativação do *TP53* podem ser fatores para um prognóstico ruim. Mutações no gene *TP53* ocorrem em aproximadamente 5% dos casos de LMC em fase crônica, e em 15% a 23% na fase blástica, mas em alguns casos as anormalidades citogenéticas precedem essas alterações. Esses achados sugerem que mutações no gene *TP53* são um segundo evento na progressão da LMC.¹¹ Estes dados sugerem a realização de um estudo mais extenso sobre a p53 em LMC, englobando alterações citogenéticas, polimorfismos, expressões gênicas.

Mutações no gene *TP53* parecem não apresentar grande importância com o desenvolvimento de leucemias, mas podem determinar um prognóstico menos favorável, principalmente se o paciente apresentar um genótipo homocigoto para prolina.

Diferentemente dos resultados encontrados por outros pesquisadores,¹⁰ o presente estudo não encontrou o genótipo Pro/Pro nos pacientes avaliados. Isso sugere que este

genótipo não se trata de um fator de risco relevante para o desenvolvimento de LMC. Adicionalmente, não foi possível buscar correlações entre os achados moleculares do polimorfismo com a resistência ao mesilato de imatinibe e a fase da patologia em que o paciente se encontrava, por falta de acesso aos prontuários. Porém, baseado em outros achados,¹⁰ pode-se sugerir que os pacientes deste estudo apresentam um bom prognóstico, já que nenhum deles era homocigoto para prolina.

Conclusão

Das amostras analisadas, encontrou-se uma prevalência do genótipo Arg/Arg, independente da presença ou não de LMC, sendo o genótipo mais frequente tanto nas amostras como nos controles. A frequência observada do genótipo Arg/Arg foi de 23,0%, a de Arg/Pro 7,0%, enquanto a esperada seria de 23,36% para Arg/Arg, e 6,29% para Arg/Pro. Aparentemente, não existe correlação entre o risco de desenvolvimento da leucemia e a presença do genótipo homocigoto Arg/Arg ou heterocigoto. Faz-se necessária a realização de estudos mais amplos e com diferentes técnicas na tentativa de se encontrar uma correlação importante ou mesmo descartá-la definitivamente.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a proliferative disorder of the hematopoietic system characterized by clonal expansion of a primitive and pluripotent stem cell. In this type of leukemia, up to 90% of all cases is associated to a specific chromosomal translocation, t(9;22)(q34;q11). The genomic alteration results in a chimeric protein, BCR-ABL, that confers a high resistance leukemia cells to death, independent of the induction mechanism of this process. Protein p53 is a transcriptional factor expressed after DNA damage which ceases cell cycle progression and consequently activates repair mechanisms or even induces apoptosis. Mutations of TP53 are the most common genetic alterations in malignant tumors in humans. The main objective of the current study was to genotype and determine the allelic frequency of the TP53 polymorphism at codon 72 in patients suspected of having CML using a PCR-based assay. The frequencies of the genotypes among the cases were: 73.4% (23/30) and 26% (7/30) for homozygous arginine (Arg-72) and heterozygous proline/arginine (Pro/Arg-72), respectively. Homozygous proline (Pro-72) was not observed in the current study. The results obtained suggest that the TP53 polymorphism at codon 72 is not an important risk factor for the initiation, promotion, nor progression of CML.. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):346-350.

Key words: Chronic myeloid leukemia; CML; polymorphism; TP53.

Referências Bibliográficas

1. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia: advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003, 349(15):1451-64.
2. Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, Fanelli A, Luliano F, Tabilio A, et al. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *The Lancet.* 2005;9460(365):657-62.
3. Carvalho PVB, Lourenço GJ, Zocca M, Pagnano KBB, Lorand-Metze I, Souza CA, et al. Expression of p190 BCR-ABL fusion gene in a patient with chronic myeloid leukemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2003;25(3):173-6.
4. Barboza LP, Souza JM, Simões FV, Bragança IC, Abdelhay E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2000;22(2):89-98.
5. Condutas do Inca, Leucemia Mielóide Crônica. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2003;49(1):5-8.
6. Cavalcanti Junior GB, Klumb CE, Maia R. p53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2002;48(3):419-27.
7. Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia molecular.* São Paulo: Ateneu, 2004.
8. Donehower LA. p53 guardian and suppressor of longevity? *Exp. Gerontol.* 2005;40:7-9.
9. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol.* 2006;43(1):8-13.
10. 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(7):868-9.
11. Otero L, Cavalcanti Junior GB, Klumb CE, Scheiner MAM, Magluta EPS, Fernandez TS, et al. Chromosome 17 abnormalities and mutation of the TP 53 gene: correlation between cytogenetics, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. *Genetics and Molecular Biology.* 2005;28(1):40-3.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 25/08/2006

Aceito após modificações: 10/06/2007