

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

---

**Manoela Marques Ortega**

**IDENTIFICAÇÃO DAS DELEÇÕES E MUTAÇÕES DO GENE  
P53 EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Campinas

2002

i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**Manoela Marques Ortega**

**IDENTIFICAÇÃO DAS DELEÇÕES E MUTAÇÕES DO GENE  
P53 EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Tese apresentada à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do **Título de Mestre** em Clínica Médica, Área de Concentração em Ciências Básicas

**Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

Campinas

2002

UNIDADE BC  
CHAMADA T/UNICAMP  
Or8i  
EX  
TOMBO BC/ 49351  
PROC 16.837/02  
C DX  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 04/06/02  
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

CM00168296-0

BIB ID 242718

Or8i

Ortega, Manoela Marques

Identificação das deleções e mutações do gene p53 em pacientes com mieloma múltiplo. / Manoela Marques Ortega. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Carmen Silvia Passos Lima, Fernando Ferreira Costa  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mieloma múltiplo. 2. Cromossomos. 3. Gene. 4. Mutação (Biologia). I. Carmen Silvia Passos Lima . II. Fernando Ferreira Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a):** *Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima* X

---

---

**Membros:**

---

1. Professor Doutor Paulo Eduardo de Abreu Machado

2. Professor Doutor Cármino Antonio de Souza

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data:** 26.02.2002

---



*"...Ditoso o homem que se aplica à sabedoria e se ocupa na inteligência, que presta atenção nos caminhos dela, e pensa nas suas veredas. Saindo à sua procura como um explorador, e pondo-se à espreita nos seus acessos..."*

Eclesiastes 14,15-22

*Aos meus pais,*

*Arnaldo e Luzia pelo amor, incentivo, confiança, apoio para qualquer decisão e principalmente, por me ensinarem à viver. Com seu exemplo de vida, ensinaram-me que não existe sucesso sem causa.*

*À minha irmã, Milena, pela amizade e apoio incondicionais.*

*Ao meu marido,*

*Wesley, que sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos, com estímulo e compreensão nas horas difíceis, com vibração nos momentos alegres e de novas conquistas. É difícil encontrar palavras que possam expressar todo meu amor e gratidão...*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

---

**À Dra. Carmen Silvia Passos Lima, pela orientação e postura profissional, pelos seus ensinamentos, apoio, confiança, amizade, por ter acreditado em mim e principalmente pela satisfação da realização de um trabalho de pesquisa.**

**Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pelo incentivo, pois, acreditando em meu potencial fez-me crescer cientificamente.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Profa. Dra. Irene Lorand-Metze e ao Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, responsáveis pelos Ambulatórios de Onco-Hematologia e pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea, respectivamente, pelas facilidades oferecidas durante a realização deste trabalho.

Ao Serviço de Apoio Didático do HEMOCAMP, em especial a Sandra de Souza e Ricardo Coutinho, pela colaboração na elaboração de tabelas, figuras, gráficos, e diagramação deste trabalho.

A Helimar Machado, Roberto Zulli e Eliana Cristina Martins Miranda por ajudarem na preparação das análises estatísticas deste estudo.

À Nicete Romano por todo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

Aos médicos, em especial à Dra. Daniela Ramos Fabri, à Dra. Fabíola Traina, ao Dr. Erich Vinícius de Paula e ao Dr. Paulo Vidal Campregher, que souberam compreender o possível valor deste trabalho e colaboraram no atendimento aos pacientes e na execução dos aspirados de medula óssea.

À Mônica Barbosa de Melo, por me apresentar à Biologia Molecular.

À Maristela Zocca e Maria Helena Médola de Carvalho, pelo exemplo de companheirismo.

À Adriana da Silva Santos Duarte, por me ensinar como deve ser um pesquisador de verdade e pela amizade verdadeira.

Aos amigos, funcionários e estagiários do Hemocentro, que proporcionaram-me amizade e apoio, pela atenção que sempre me dispensaram. Sem a participação de todos, seria impossível a concretização deste trabalho.

À todos os pacientes com Mieloma Múltiplo, que aceitaram participar deste estudo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

**A realização deste estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xxix</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
1. Considerações gerais.....	33
2. Aspectos clínicos.....	33
3. Análise citogenética convencional .....	35
4. Análise citogenética molecular.....	37
5. O gene p53 e a proteína p53 .....	38
6. Análise citogenética molecular do gene p53.....	43
7. Análise molecular do gene p53.....	43
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
1. Aspectos clínicos.....	51
2. Análise citogenética convencional .....	52
3. Análise citogenética molecular do cromossomo 17 e do gene p53 .....	54
4. Análise molecular do gene p53.....	58
5. Aspectos éticos .....	67
6. Análise estatística .....	68

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
1. Aspectos clínicos.....	71
2. Análise citogenética convencional .....	74
3. Análise citogenética molecular do cromossomo 17 e do gene p53 .....	81
4. Análise molecular do gene p53 .....	90
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## ***Lista de Abreviaturas***

---

<b>MM</b>	Mieloma múltiplo
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MP</b>	Melphalan e prednisona
<b>VAD</b>	Vincristina, doxorrubicina e dexametasona
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador do crescimento de células da linhagem granulocítica-monocítica
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
<b>p53</b>	Proteína produzida pelo gene p53
<b>p21</b>	Proteína produzida pelo gene waf1/cip1
<b>DAPI</b>	Diamino fenilindole
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de conformação em hélice simples
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>μl</b>	Microlitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>μg</b>	Micrograma
<b>ng</b>	Nanograma
<b>pmol</b>	Picomol
<b>U</b>	Unidade de medida
<b>M</b>	Molaridade
<b>mM</b>	Milimolar
<b>DP</b>	Desvio padrão



**FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática das atividades da proteína p53.....	42
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática dos padrões esperados de hibridização em cromossomos e núcleos interfásicos com as sondas para o centrômero do cromossomo 17 e para o locus do gene p53.....	57
<b>Figura 3</b>	Cromossomos em metáfase e cariótipo com hiperdiploidia em paciente com mieloma múltiplo .....	78
<b>Figura 4</b>	Cromossomos em metáfase e anormalidades complexas do cariótipo em paciente com mieloma múltiplo.....	79
<b>Figura 5</b>	Curvas de probabilidades de sobrevida global dos pacientes com mieloma múltiplo com cariótipos normais e com anormalidades do cariótipo .....	80
<b>Figura 6</b>	Cromossomos em metáfase e núcleos interfásicos com padrões normais de hibridização para as sondas para o centrômero do cromossomo 17 e para o locus do gene p53 em controle .....	85
<b>Figura 7</b>	Núcleo interfásico de um paciente com mieloma múltiplo com trissomia do cromossomo 17 e três cópias do gene p53.....	86
<b>Figura 8</b>	Núcleos interfásicos de um paciente com mieloma múltiplo com deleção monoalélica e bialélica do gene p53 .....	87
<b>Figura 9</b>	Curvas de probabilidades de sobrevida global dos pacientes com mieloma múltiplo com deleções do gene p53 e dos que não apresentaram a anormalidade gênica .	89
<b>Figura 10</b>	Polimorfismo no éxon 6 do gene p53 em paciente com mieloma múltiplo .....	92
<b>Figura 11</b>	Polimorfismo no íntron 6 do gene p53 em paciente com mieloma múltiplo.....	93

**TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Iniciadores utilizados na reação para a amplificação do éxon 2 do gene da globina beta por meio da reação em cadeia da polimerase .....	59
<b>Tabela 2</b>	Seqüência dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de anormalidades nos éxons 4 a 10 do gene p53 .....	61
<b>Tabela 3</b>	Seqüência dos iniciadores, condições nas reações e os tempos de corrida dos seqüenciamentos realizados no estudo .....	64
<b>Tabela 4</b>	Características clínicas dos 60 pacientes com mieloma múltiplo .....	72
<b>Tabela 5</b>	Características laboratoriais dos 60 pacientes com mieloma múltiplo.....	73
<b>Tabela 6</b>	Freqüências de cariótipos identificados e não identificados de acordo com as porcentagens de plasmócitos e os números de células mononucleares em pacientes com mieloma múltiplo .....	75
<b>Tabela 7</b>	Freqüências de cariótipos normais e anormais de acordo com o momento do estudo, as porcentagens de plasmócitos, os números de células mononucleares e os tipos de culturas realizadas em pacientes com mieloma múltiplo.....	76
<b>Tabela 8</b>	Resultados obtidos da análise de oito pacientes com mieloma múltiplo e deleção do gene p53 por meio do método FISH .....	84

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença neoplásica caracterizada pelo acúmulo de plasmócitos na medula óssea (MO) com conseqüente osteólise, comprometimento da hematopoese e da síntese das imunoglobulinas normais e com a produção de imunoglobulina monoclonal ou de seus fragmentos. A sobrevida observada para pacientes com a doença varia de alguns meses a dez anos ou mais, o que impõe a busca de fatores prognósticos para a identificação de grupos que devam receber tratamento mais agressivo para o controle da doença. As anormalidades do cariótipo foram descritas, em geral, como fatores com valor prognóstico desfavorável. Por outro lado, não se encontram suficientemente estabelecidos os valores prognósticos das anormalidades numéricas do cromossomo 17 e das deleções e mutações do gene p53 em pacientes com MM. Frente ao exposto, estes constituíram os objetivos deste estudo. Para cumprir tais objetivos, foram avaliados 60 pacientes com MM no período de março de 1999 a dezembro de 2000. A avaliação das anormalidades numéricas do cromossomo 17 foi realizada por meio da análise citogenética convencional e do método de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), enquanto que a avaliação das deleções do gene foi realizada por meio do método FISH. As mutações do gene p53 foram investigadas por meio da reação em cadeia da polimerase, do polimorfismo de conformação em hélice simples e de seqüenciamento. Não foram identificadas mutações do gene p53 em qualquer dos pacientes incluídos no estudo. Em contraste, as deleções do gene, predominantemente monoalélicas, foram identificadas em 15,7% deles. Observamos ainda, que os pacientes com a deleção do gene p53 apresentaram menor probabilidade de sobrevida do que aqueles sem a deleção do gene ( $P= 0,0006$ ). A mediana dos tempos de sobrevida global de pacientes do primeiro grupo foi menor do que a observada em pacientes do segundo grupo (7,5 e 17,0 meses, respectivamente;  $P= 0,05$ ). Frente a estes resultados, pudemos concluir que a deleção do gene p53 constituiu um fator preditivo de menor sobrevida, em nossos casos.

Multiple myeloma (MM) is a neoplastic disease characterized by the accumulation of plasma cells in the bone marrow (BM) with consequent osteolysis, compromising hematopoiesis and the synthesis of normal immunoglobins and the production of monoclonal immunoglobulin or its fragments. The survival observed for patients with the disease varies from a few months to ten years or more, which makes the search for prognostic factors for the identification of groups which require more aggressive treatment for the control of the disease. Abnormalities of the karyotype have been described, in general, as factors with desfavorable prognostic value. On the other hand, the prognostic values of the numerical abnormalities of chromosome 17, and of the deletions and mutations of the p53 gene have not been sufficiently established as prognostic values in patients with MM. Thus, these were the objectives of this study. To view these objectives, 60 patients with MM were evaluated in the period of March, 1999 to December, 2000. The evaluation of the numerical abnormalities of chromosome 17 was performed by cytogenetic analysis and by the fluorescence in situ hybridization method (FISH), whilst the evaluation of p53 deletions was performed by FISH. The evaluation of p53 gene mutations was carried out using polymerase chain reaction, single strand conformation polymorphism and the sequencing. No mutations in the p53 gene were detected in any of the patients enrolled in the study. In contrast, deletions of the gene, predominantly monoallelic, were identified in 15.7% of them. Furthermore, we observed that patients with p53 deletions demonstrated a lower probability of survival than those without gene deletion ( $P= 0.0006$ ). The median survival time of the patients of the first group was lower than that observed in the second group of patients (7.5 and 17.0 months, respectively;  $P= 0.05$ ). From these results, we may conclude that deletion of the p53 gene constituted a predictive factor of shorter survival, in our cases.

## ***INTRODUÇÃO***

## **1. Considerações gerais**

Desde a sua primeira descrição na metade do século XIX por John Dalrymple, Henry Bence Jones e William MacIntyre (CLAMP, 1967), o mieloma múltiplo (MM) foi extensivamente investigado em suas características clínicas e laboratoriais. Entretanto, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por ser determinados com exatidão, o que justifica a busca de maiores conhecimentos sobre ele.

A incidência do MM é de aproximadamente quatro casos por 100.000 habitantes por ano ou 13.000 casos por ano, nos Estados Unidos da América (BARLOGIE et al., 2001; MEDEIROS, 2001) e aumenta com a idade, de forma semelhante às demais doenças neoplásicas (BARLOGIE et al., 2001). A distribuição dos pacientes de acordo com a idade apresenta uma média de 65 anos (SMADJA et al., 1995; DRACH et al., 1998; PEREZ-SIMON et al., 1998; BARLOGIE et al., 2001; MEDEIROS, 2001). Os pacientes do sexo masculino são mais frequentemente acometidos do que os do sexo feminino, guardando entre si uma relação de 1,4: 1,0 (BARLOGIE et al., 2001).

Não há dados confiáveis sobre a incidência da doença em nosso meio, como possível consequência das deficiências de diagnóstico ou ainda, da falta de notificação de casos diagnosticados.

## **2. Aspectos clínicos**

O MM é uma doença caracterizada pela proliferação neoplásica de plasmócitos na medula óssea (MO). A formação de tumores de plasmócitos determina a falência da MO, a osteólise, a supressão da síntese das imunoglobulinas normais e a produção de imunoglobulina monoclonal ou de seus fragmentos (BARLOGIE et al., 2001).

Os principais sinais e sintomas da doença incluem a fraqueza, a dor óssea, as fraturas patológicas e o aumento da susceptibilidade à infecções bacterianas. Outra manifestação freqüente é a insuficiência renal determinada principalmente, pela

toxicidade dos fragmentos das imunoglobulinas para o rim (SALMON & CASSADY, 1993; BOCCADORO & PILERI, 1997; BARLOGIE et al., 2001).

O diagnóstico do MM considera o número de plasmócitos na MO ou plasmocitoma em biópsia tecidual, as concentrações sérica e urinária da imunoglobulina monoclonal e a presença de lesões ósseas líticas (BARLOGIE et al., 2001).

O sistema de estadiamento clínico elaborado por DURIE & SALMON (1975) tem como base uma combinação de fatores relacionados com a massa tumoral, que incluem a concentração da hemoglobina, as quantificações do cálcio sérico, da creatinina sérica e da proteína monoclonal sérica e urinária e a extensão das lesões ósseas líticas. Possibilita a identificação de seis grupos de pacientes (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB), com perspectivas de sobrevida distintas: a sobrevida média de pacientes com estágio IA é de 49 meses, enquanto em pacientes com estágio IIIB é de 14,7 meses (MEDEIROS, 2001).

Durante aproximadamente três décadas, o tratamento de pacientes com a doença foi realizado com a combinação do melphalan com a prednisona, com sucesso limitado pelas freqüentes progressões da doença observadas durante a interrupção da terapêutica (CHEUNG & VAN NESS, 2001; MEDEIROS, 2001). Atualmente, a melhor abordagem terapêutica consiste na administração de ciclos de quimioterapia com vincristina, doxorrubicina e dexametasona (VAD) seguida do transplante autólogo de MO, que possibilita maiores taxas de remissão; remissão de maior duração e maior sobrevida global do que as observadas com a quimioterapia convencional (BOCCADORO & PILERI, 1997).

Embora inegáveis os avanços terapêuticos obtidos nos últimos anos, a sobrevida observada para pacientes com MM varia de alguns meses a 10 anos ou mais, com uma mediana de três anos (BARLOGIE et al., 1989; BOCCADORO & PILERI, 1997; MEDEIROS, 2001), o que impõe a busca de fatores prognósticos para a identificação de grupos de pacientes que devam receber terapêutica mais agressiva.

Os melhores indicadores de prognóstico ao diagnóstico são a concentração da  $\beta 2$  microglobulina, da proteína C reativa, o índice de proliferação dos plasmócitos, o estágio da doença e as anormalidades do cariótipo (GREIPP et al., 1993; WEH et al.,



1993; BATAILLE et al., 1994; FFRENCE et al., 1995; LAI et al., 1995; SAN MIGUEL et al., 1995; BOCCADORO & PILERI, 1997; DAVES et al., 1997; FEINMAN et al., 1997; HAERLACH & LOFFLER, 1997; TRICOT et al., 1997; SEONG et al., 1998; MEDEIROS, 2001).

### **3. Análise citogenética convencional**

Anormalidades cromossômicas foram identificadas em até 60% dos pacientes com MM, por meio da análise citogenética convencional (DURIE, 1992; SAWYER et al., 1995; FEINMAN et al., 1997; TRICOT et al., 1997; CALASANZ et al., 1997; SEONG et al., 1998). Tipicamente, os pacientes com doença avançada e aqueles com recidiva da doença apresentaram maiores freqüências de anormalidades cromossômicas quando comparados àqueles recém diagnosticados (SEONG et al., 1998; SAWYER et al., 1995; FEINMAN et al., 1997). Este achado provavelmente reflete o aumento da atividade proliferativa das células tumorais com a agressividade ou a progressão da doença (DREWINKO et al., 1981).

Mais da metade do número de pacientes com MM e anormalidades do cariótipo apresentaram a hiperdiploidia, enquanto que a pseudodiploidia e a hipodiploidia foram identificadas em menos do que um quarto deles. Os ganhos dos cromossomos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15 e 19 e as perdas dos cromossomos 8, 13, 14 e X foram as anormalidades mais freqüentemente identificadas (SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

Em nosso conhecimento, o único estudo brasileiro sobre a identificação de anormalidades cromossômicas em pacientes com MM, foi conduzido por ZAGO (1975), que identificou a hiperdiploidia como a anormalidade mais freqüente.

Deleções parciais ou completas do braço longo do cromossomo 13 foram identificadas em até 50% dos pacientes com MM (LAI, et al., 1995; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

Já as anormalidades do cromossomo 17, como a monossomia, a trissomia e a deleção da região 17p, foram descritas como achados incomuns na doença (FEINMAN et al., 1997).



Rearranjos cromossômicos comprometendo a região 14q32 foram identificados em 10-40% dos pacientes com MM, por análise citogenética convencional, tendo como parceiros os cromossomos 8, 18, 6, 11 e 16 (DEWALD et al., 1985; GOULD et al., 1988; LAI et al., 1995; SAWYER et al., 1995; CALASANZ et al., 1997; BRIGAUDEAU et al., 1997; NISHIDA et al., 1997; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998). Entretanto, poucas destas translocações foram consideradas rearranjos recorrentes (AVET-LOISEAU et al., 1998), sendo que a mais freqüente foi a t(11;14)(q13;q32), identificada em até 10% dos casos (DEWALD et al., 1985; GOULD et al., 1988; LAI et al., 1995; SAWYER et al., 1995; CALASANZ et al., 1997; BRIGAUDEAU et al., 1997; NISHIDA et al., 1997; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

Os pacientes com anormalidades cromossômicas apresentaram, em geral, menor probabilidade de sobrevida global e livre da doença do que aqueles com o cariótipo normal em inúmeras descrições prévias (WEH et al., 1993; FEINMAN et al., 1997; TRICOT et al., 1997; SEONG et al., 1998; CHANG et al., 1999; MEDEIROS, 2001). Entre as anormalidades do cariótipo, a hiperdiploidia pareceu ter um significado prognóstico melhor do que a hipodiploidia e as anormalidades estruturais dos cromossomos 11 e 13 em pacientes com MM (SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

Desta forma, a análise citogenética convencional é considerada, na atualidade, uma avaliação fundamental a ser realizada em pacientes com MM. Entretanto, este método de estudo dos cromossomos parece limitar a identificação da freqüência real de anormalidades cariotípicas, uma vez que a doença é composta predominantemente de células B diferenciadas com pequena atividade proliferativa. Assim, a maioria dos cariótipos normais em pacientes com MM parece derivar de células hematopoéticas normais e não do clone neoplásico (FEINMAN et al., 1997).

A cultura de apenas células mononucleares da MO (LAI et al., 1995; BRIGAUDEAU et al., 1997) e o estímulo da proliferação de plasmócitos pela interleucina 6 (IL-6) e pelo fator estimulador do crescimento de células da linhagem granulocítica-monocítica (GM-CSF) em cultura (FACON et al., 1993; LAI et al., 1995; SMADJA et al., 1995; BRIGAUDEAU et al., 1997), foram utilizadas como tentativas para

identificar a possível frequência real de anormalidades do cariótipo em pacientes com a doença (FACON et al., 1993; LAI et al., 1995; SMADJA et al., 1995; BRIGAUDEAU et al., 1997). Entretanto, os papéis destas modificações do método básico de cultura de células na proliferação de plasmócitos neoplásicos permanecem incertos (FACON et al., 1993; LAI et al., 1995; SMADJA et al., 1995; BRIGAUDEAU et al., 1997).

#### **4. Análise citogenética molecular**

O método de hibridização *in situ* com a utilização de fluorescência, conhecido como método FISH, foi descrito por Cremer (PODDIGHE et al., 1991) e tem como base a utilização de sondas constituídas por fita de DNA (única ou dupla) marcadas com fluorocromos. Estas fitas ligam-se à regiões específicas do DNA cromossômico e podem ser identificadas como sinais fluorescentes, em microscópio de fluorescência dotado de filtros que possibilitam a visualização das cores azul, vermelha e verde (MECCUCI et al., 1999).

Foi descrito como mais eficaz para identificar anormalidades cromossômicas, em pacientes com MM, do que a análise citogenética convencional, pois pode ser realizado em núcleos interfásicos de preparados celulares ou cortes histológicos de biópsia tecidual, quando cromossomos não foram disponíveis para a avaliação (TABERNERO et al., 1996; ZANDECKI, 1996; FEINMAN et al., 1997).

Ele possibilitou a identificação de anormalidades do cariótipo, como a hiperdiploidia e a hipodiploidia em até 90% dos pacientes com a doença (BARLOGIE et al., 1989; DRACH et al., 1995; TABERNERO et al., 1996; ZANDECKI, 1996; PEREZ-SIMON et al., 1998), indicando que a maioria deles é anormal do ponto de vista citogenético.

Deleções do braço longo do cromossomo 13, em geral com perdas do gene do retinoblastoma (rb-1) e do locus D13S319 foram identificadas em até 45% dos pacientes com MM (CHANG et al., 1999; KÖNISGBERG et al., 2000; ZOJER et al., 2000).

Ainda, a trissomia do cromossomo 17 foi identificada em cerca de 10% (DRACH et al., 1998; AVET-LOISEAU et al., 1999) e a monossomia do cromossomo 17 foi identificada em cerca de 5% (SCHULTHEIS et al., 1999) dos pacientes com a doença, com a utilização de sonda para o centrômero do cromossomo 17. Estes resultados indicaram que as anormalidades numéricas do cromossomo 17 não parecem constituir eventos raros em pacientes com MM.

O método FISH também possibilitou a identificação de deleções do braço curto do cromossomo 17, com perdas do gene p53 em pacientes com MM (DRACH et al., 1998; AVET-LOISEAU et al., 1999; SCHULTHEIS et al., 1999; KÖNISGBERG et al., 2000; CARLEBACH et al., 2000). Entretanto, a variação da frequência da anormalidade gênica, obtida nos diferentes estudos, indicou que o papel desempenhado pelo gene na doença não se encontra estabelecido.

Ainda, o possível acometimento dos genes ciclina D1 e CCND1, localizados na região 11q32 e 14q32, respectivamente, foram identificados por meio deste e de outros métodos moleculares em pacientes com a doença e com a t(11;14)(q13;q32) (BERENSON, 1999; DEWALD et al., 1985; GOULD et al., 1988; LAI et al., 1995; SAWYER et al., 1995; BRIGAUDEAU et al., 1997; CALASANZ et al., 1997; NISHIDA et al., 1997; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

## **5. O gene e a proteína p53**

Os mecanismos fisiopatológicos que determinam a expansão clonal dos plasmócitos no MM são desconhecidos (WILLEMS et al., 1993). No entanto, parece evidente que a desregulação de oncogenes, como o ras, o bcl-2 e o myc, e de genes supressores tumorais, como o do retinoblastoma e o p53, que controlam a proliferação celular e a apoptose, contribuem para a origem da doença (FEINMAN et al., 1997; HALLEK et al., 1998).

O gene p53 humano compreende aproximadamente 20 Kb de DNA genômico, contém 11 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 17, na região 17p13 (PREUDHOMME et al., 1992; FENAUX, 1997; OWEN et al., 1997). Os éxons 2, 4, 5, 7

e 8 codificam 5 grupos de seqüências de aminoácidos (domínios) altamente conservados durante a evolução: domínio I (códon 13 a 19), domínio II (códon 117 a 142), domínio III (códon 171 a 181), domínio IV (códon 234 a 258) e domínio V (códon 270 a 286) (FREBOURG & FRIEND, 1992; LEVINE et al., 1994; CHANG et al., 1995). Estes 5 domínios conservados dentro das regiões codificadoras são considerados essenciais para a função da proteína produzida pelo gene, a p53 (CHANG et al., 1995). O RNA mensageiro apresenta 2,6 Kb e contém uma grande região não codificadora 3', provavelmente comprometida apenas com a estabilização da molécula. Além disso, a região promotora do gene p53 não apresenta nenhuma seqüência de consenso TATA box, CAAT box ou rica em G/C, acima do sítio de iniciação da transcrição, observado em muitos promotores transcritos pela RNA polimerase II (SOUSSE et al., 1990).

A p53 foi originalmente descrita como uma estrutura capaz de formar um complexo oligomérico com o antígeno tumorigênico viral T SV40, em células SV40 transformadas (LANE & CRAWFORD, 1979; FREBOURG & FRIEND, 1992; MAY & MAY, 1999). Posteriormente, a inativação desta proteína, por meio da sua ligação com outras proteínas virais, como as do adenovírus tipo 5, do vírus Epstein-barr, do vírus do papiloma humano e do vírus da hepatite B foram também descritas (LANE & CRAWFORD, 1979; SOUSSE et al., 1990; CHANG et al., 1995; MAY & MAY, 1999). Foi também observado que as proteínas virais bloquearam a habilidade da p53 atuar como um fator de transcrição, impedindo sua ligação ao DNA (LEVINE, 1993) e permitindo com que a célula entrasse em um processo tumorigênico (LANE & CRAWFORD, 1979; LEVINE, 1993). Estes fatos fizeram com que o gene p53 fosse considerado um oncogene dominante. Entretanto, a identificação de mutações do gene e a demonstração de que a sua forma normal era capaz de suprimir a transformação celular iniciada por outros oncogenes indicaram que o gene p53 era um gene supressor tumoral (MAY & MAY, 1999).

A p53 participa de diversos processos celulares, incluindo principalmente a regulação do ciclo celular, o reparo do DNA e a apoptose (CHANG et al., 1995; SIONOV et al., 1999; LAVERDIERI et al., 2000).

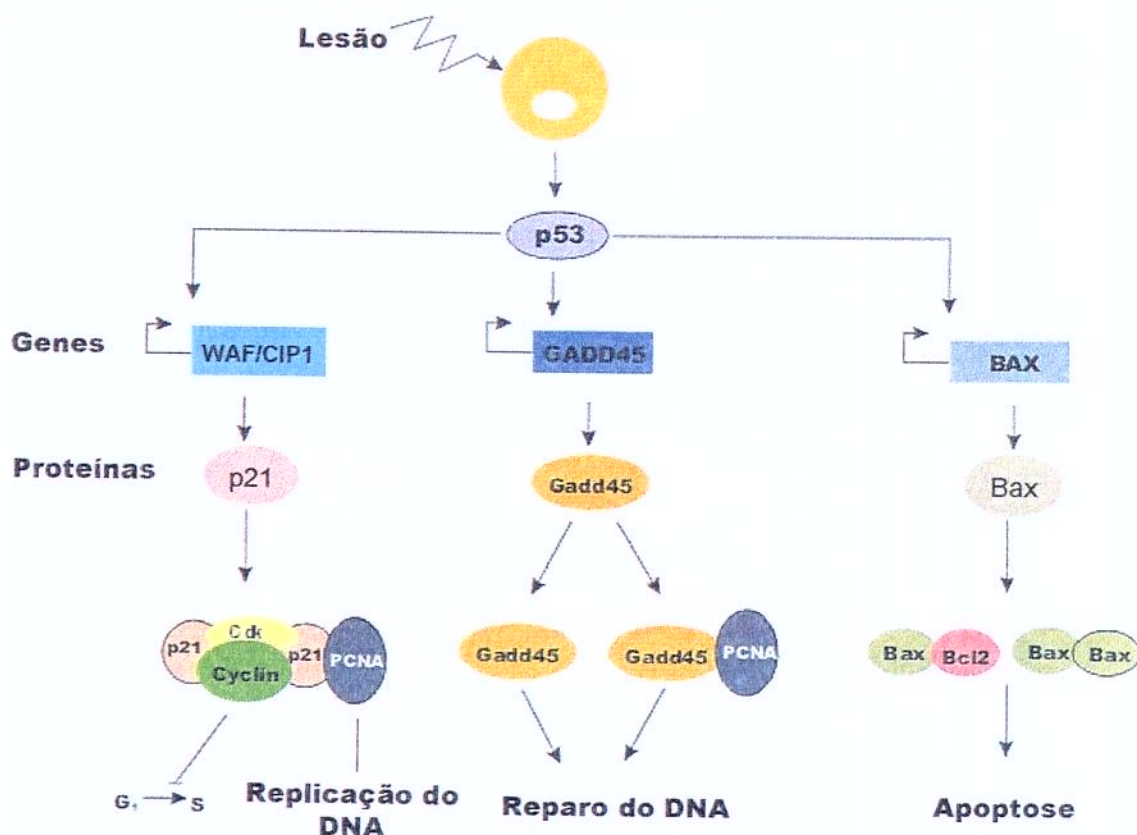
Em resposta à lesão do DNA celular, ela induz e restringe o crescimento celular a fase G1 do ciclo celular (CHANG et al., 1995), o que possibilita o reparo do DNA ou a indução da morte celular por apoptose, em casos em que o DNA não possa ser reparado. Sua ação é exercida pela ativação dos genes *waf1/cip1*, *gadd45* e *bax* e pela supressão do gene *bcl2* (KASTAN et al., 1992; EL-DEIRY et al., 1993; MIYASHITA et al., 1994; MIYASHITA & REED, 1995; SANCHEZ & ELLEDGE, 1995).

A proteína produzida pelo gene *waf1/cip1*, a p21, é um inibidor do complexo ciclina/quinases dependentes de ciclinas (CDK), com ação na fosforilação e na inativação da proteína RB na fase G1 do ciclo celular. A proteína RB não fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F requerido na produção da maquinaria de síntese de DNA, bloqueando o ciclo celular antes da passagem da fase G1 para a fase S, possibilitando o reparo do DNA (CHANG et al., 1995; SIONOV et al., 1999; LEVINE, 1995). A p21 pode também interferir diretamente com a síntese do DNA, durante a fase S, interrompendo o processo de replicação, ligando-se ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um co-fator essencial na replicação do DNA ou impedindo que o PCNA ative a DNA polimerase delta, uma das principais polimerases (CARSON & LOIS, 1995; CHANG et al., 1995; SIONOV et al., 1999).

A proteína *gadd45*, produto do gene *gadd45* ("growth arrest and DNA damage"), compete com a p21 pela ligação ao PCNA, podendo também inibir, a síntese do DNA durante a fase S (SANCHES & ELLEDGE, 1995).

O mecanismo do gene p53 na determinação da apoptose ainda não está bem estabelecido. No entanto, a regulação da apoptose pode ser feita por um mecanismo celular que determina o desequilíbrio entre os produtos dos genes *bax* e *bcl2*. As proteínas *bax* e *bcl2* são homólogas e formam heterodímeros *bax:bcl2* mas, apresentam efeitos opostos na apoptose. O gene *bcl2* protege a célula da apoptose, enquanto que o *bax* atua como um indutor da apoptose (SANCHEZ & ELLEDGE, 1995). Em resposta às lesões no DNA, o gene p53, como indutor do gene *bax* e supressor do gene *bcl-2*, causa uma mudança da proporção *bax:bcl2*, o que induz a célula à apoptose (SANCHEZ & ELLEDGE, 1995).





**Figura 1:** Representação esquemática das atividades da proteína p53 produzida em resposta à lesão do DNA celular. A proteína p53 restringe o crescimento celular à fase G1 do ciclo celular, o que possibilita o reparo do DNA ou a indução da morte celular por apoptose, em casos em que o DNA não possa ser reparado (SANCHEZ & ELLEDGE, 1995)

## 6. Análise citogenética molecular do gene p53

A deleção do gene p53 foi inicialmente descrita por DRACH et al. (1998), em pacientes com MM, por meio do método FISH, com a utilização de uma sonda específica para o locus do gene. Os autores identificaram a deleção, predominantemente monoalélica, do gene em até 55% dos pacientes com a doença. Observaram ainda, que os pacientes com a anormalidade gênica apresentaram menor sobrevida do que os demais. Entretanto, não puderam explicar o efeito biológico da perda de um único alelo do gene supressor tumoral na origem ou progressão do MM.

Por outro lado, a presença de apenas alelos em número normal (CARLEBACH et al., 2000) e a identificação da deleção do gene com frequências menores de ocorrência foram posteriormente descritas em pacientes com MM (AVET-LOISEAU et al., 1999; SCHULTHEIS et al., 1999; KÖNIGSBERG et al., 2000). Entretanto, estes autores não avaliaram o impacto da anormalidade gênica na sobrevida dos seus pacientes (AVET-LOISEAU et al., 1999; SCHULTHEIS et al., 1999; CARLEBACH et al., 2000) ou a avaliaram em associação a outros fatores prognósticos (KÖNIGSBERG et al., 2000), o que impossibilitou a obtenção de conclusões consistentes sobre o assunto.

## 7. Análise molecular do gene p53

A maioria das mutações no gene p53, em doenças, está localizada em sua região hidrofóbica, constituída pelos éxons 5 a 8, entre os códons 130 e 290 (HOLLSTEIN et al., 1991). Entretanto, análises recentes possibilitaram a identificação de mutações nos éxons 4 e 9 do gene em pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni (HARRIS & HOLLSTEIN, 1993) e de polimorfismos no éxon 4 e mutações no éxon 10 em pacientes com leucemia mieloide aguda (MELO, 1998).

Também mutações em íntrons do gene p53 já foram descritas em pacientes com câncer, indicando que estas regiões parecem regular a sua atividade (SAMESHIMA et al., 1990; TAKAHASHI et al., 1990; LAI et al., 1993; AVIGAD et al., 1997; LAVERDIERE et al., 2000).

As mutações do gene p53 foram identificadas em menos do que 20% dos pacientes com MM, sendo que a maioria delas é do tipo "missense", com a mudança da identidade de um único aminoácido (PORTIER et al., 1992; PREUDHOMME et al., 1992; NERI et al., 1993; WILLEMS et al., 1993; CORRADINI et al., 1994; IMAMURA et al., 1994; FENAUX, 1997; OLLIKAINEN et al., 1997; OWEN et al., 1997). Pouco se conhece a respeito da expressão do gene p53 em plasmócitos de pacientes com MM. No entanto, a mutação de ponto do gene p53 foi descrita como um evento tardio e associado com um curso mais agressivo da doença (PORTIER et al., 1992; PREUDHOMME et al., 1992; WILLEMS et al., 1993; NERI et al., 1993; CORRADINI et al., 1994; IMAMURA et al., 1994; FENAUX, 1997; OLLIKAINEN et al., 1997; OWEN et al., 1997). Em nosso conhecimento, não há descrições sobre a ocorrência de mutações intrônicas do gene p53 em pacientes com MM.

Ainda, o impacto das mutações no gene p53 na sobrevida de pacientes com a doença permanece incerto (PREUDHOMME et al., 1992; NERI et al., 1993; BROWN et al., 1994; OWEN et al., 1997; MEDEIROS, 2001).

Tendo constatado que as frequências de anormalidades numéricas do cromossomo 17 e de deleção da região 17p13, por meio da análise citogenética convencional e do método FISH, não estão definidas em pacientes com MM, as frequências de mutações do gene p53 também não estão definidas em pacientes com MM do nosso meio e que o impacto das anormalidades no gene p53, por deleção e por mutação, na sobrevida dos pacientes com MM, não se encontram estabelecidos, foram definidos os objetivos deste estudo.



## ***OBJETIVOS***

Avaliar um grupo de pacientes, portadores de MM, atendidos no ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da UNICAMP, no período de março de 1999 a dezembro de 2000, tendo como objetivos:

- Determinar as frequências das anormalidades numéricas do cromossomo 17 e da deleção da região 17p13, por meio da análise citogenética convencional,
- Determinar as frequências das anormalidades numéricas do cromossomo 17 e da deleção do gene p53, por meio do método FISH,
- Determinar a frequência e os tipos de mutações do gene p53,
- Correlacionar as anormalidades do cromossomo 17 e do gene p53 obtidas com as probabilidades de sobrevida global dos pacientes do estudo.

## ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

Foram estudados todos os pacientes com MM, recém diagnosticados e com progressão da doença, acompanhados no Ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da UNICAMP, no período de 10 de março de 1999 a 14 de dezembro de 2000. O diagnóstico dos pacientes em progressão da doença foi feito no período de 1988 a 1999, quando este estudo teve início. Dez doadores de MO e um doador de sangue constituíram os controles para os estudos citogenético molecular e molecular, respectivamente.

### **1. Aspectos clínicos**

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

O diagnóstico da doença foi estabelecido de acordo com os critérios convencionais apresentados por BARLOGIE et al. (2001) e o estadiamento da mesma (estádios I, II e III; A ou B), obedeceu os critérios de DURIE & SALMON (1975). Os critérios utilizados para o diagnóstico e o estadiamento da doença estão apresentados nos Anexos 1 e 2.

O tratamento dos pacientes foi realizado com a administração de ciclos mensais de melphalan e prednisona (MP) até dezembro de 1997, de acordo com o protocolo institucional vigente naquele período. Após esta data, seis ciclos mensais com vincristina, doxorrubicina e dexametasona, VAD (BARLOGIE et al., 1984) foram administrados a todos os pacientes com exceção daqueles com idade maior do que 60 anos e com o estágio I da doença.

Foram considerados em progressão da doença, os pacientes que apresentaram citopenias atribuídas à infiltração da MO por plasmócitos ou o aumento de 50% ou mais na concentração da proteína monoclonal sérica ou urinária, durante o seguimento clínico, independentemente de terem ou não terem obtido remissão completa.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo, o estágio da doença, o tipo de terapêutica recebida, o tempo de acompanhamento no serviço e a situação no dia 30 de abril de 2001 (vivo, óbito ou perda de seguimento).

## **2. Análise citogenética convencional**

### **2.1. Cultura de células da medula óssea**

O método utilizado para este propósito foi o descrito por BRIGAUDEAU et al. (1996), com modificações. Foram obtidas amostras de 3,0 a 5,0 ml de sangue medular em heparina de cada paciente do estudo, ao diagnóstico ou durante a progressão da doença. Amostras de 1,0 ml foram também obtidas para a realização de esfregaços de MO para a determinação do número de plasmócitos. As células das primeiras amostras foram diluídas em meio RPMI 1640 (Cultilab ou Gibco) suplementado com 20% de soro bovino fetal (Cultilab ou Gibco) em proporção 1:1. As células mononucleares foram obtidas a partir das células da MO por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/ml-Sigma), a 1.500 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente. A camada de células mononucleares da interface foi coletada em tubo estéril e lavada em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal por três vezes, por meio de centrifugações a 1.500 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente. O botão de células foi ressuspenso em 1,0 ml de meio de cultura RPMI completo (80 ml de meio RPMI 1640, 20% de soro bovino fetal, 1,0 ml de heparina-Roche, 1,0 ml de penicilina-estreptomicina-Sigma). A quantificação das células mononucleares obtidas foi realizada em contador automatizado de células (Cell Dyn 1600; Abbott). Dois tipos de culturas foram realizados, sempre que possível: as não estimuladas e as estimuladas por IL-6 e GM-CSF (10 ng/ml de cada estimulante). Tivemos como meta a colocação de  $5,0 \times 10^6$  células mononucleares em cada cultura, com 10 ml de meio RPMI 1640. Quando o número de células mononucleares obtidos foi suficiente para apenas um tipo de cultura, optamos pela cultura estimulada por citocinas. As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Ao final do período de

cultura, 400 µl de demecolcine na concentração de 1,0 µg/ml foi adicionada durante 20 minutos. A seguir, as células foram tratadas com solução hipotônica de cloreto de potássio (0,075 mol/L) por 20 minutos, fixadas em solução metanol-ácido acético glacial (3:1) por três vezes, durante 30 minutos e distribuídas em lâminas de vidro, após flambagem em bico de "Bunsen", para o melhor espalhamento dos cromossomos.

O material foi processado para a obtenção de bandas G com o uso de tripsina e EDTA (Sigma). A coloração utilizada foi a de Wright. As metáfases e os núcleos interfásicos restantes foram conservados em freezer a - 20°C, para análise posterior pelo método FISH.

Amostras de MO em heparina, obtidas de dez indivíduos normais (doadores de MO), que serviram como controles, foram colocadas em cultura de acordo com o método descrito por SWANSBURY (1997). Os núcleos e os cromossomos obtidos foram utilizados para avaliar a eficácia da hibridização das sondas usadas pelo método FISH e para definir os valores de corte para as diferentes anormalidades numéricas do cromossomo 17 e do gene p53.

Foram computados os números de células mononucleares obtidas do total de pacientes inseridos no estudo e dos pacientes avaliados ao diagnóstico e durante a progressão da doença. Foram também computadas as frequências de culturas de células mononucleares não estimuladas e estimuladas por citocinas.

## **2.2. Obtenção do cariótipo**

As imagens dos cromossomos em metáfase foram captadas por um sistema automatizado de análise (Cytovision version 4.4, Applied Imaging Corporation), que possibilitou o pareamento e a ampliação do tamanho dos mesmos, facilitando a identificação das anormalidades cromossômicas.

Foram analisados todos os cromossomos em metáfase existentes para cada paciente. Um número mínimo de cinco metáfases foi exigido para a identificação do cariótipo. A identificação de uma anormalidade cromossômica numérica só foi possível, quando presente em pelo menos três metáfases. Os resultados desta análise foram

descritos obedecendo as normas do *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (MITELMAN, 1995).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a identificação e a não identificação do cariótipo. Foram também distribuídos de acordo com as frequências de cariótipos normais, cariótipos anormais e dos diferentes tipos de anormalidades do cariótipo. As probabilidades de sobrevida global em pacientes com cariótipo normal e anormal foram comparadas.

### **3. Análise citogenética molecular do cromossomo 17 e do gene p53**

#### **3.1. Procedimentos técnicos**

Foram utilizadas as lâminas recém preparadas contendo núcleos interfásicos e cromossomos em metáfase de pacientes e controles obtidas de material fixado e congelado do laboratório de Citogenética do Hemocentro da UNICAMP.

O método FISH foi realizado de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante das sondas (Vysis, Inc.). De forma sucinta, o DNA contido nas lâminas dos preparados cromossômicos e núcleos interfásicos foi desnaturado em solução 70% formamida/2XSSC pH= 7,0-8,0, a 76°C durante 5 minutos. A seguir, a desidratação das lâminas foi realizada por lavagens em etanol 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada, à temperatura ambiente.

Para a hibridização, foi utilizada a sonda para o locus p53, marcada com fluorocromo da cor vermelha e a sonda para o centrômero do cromossomo 17, marcada com fluorocromo da cor verde (Vysis, Inc). Estas foram diluídas em tampão próprio e água estéril e, a seguir, foram desnaturadas a 76°C por 5 minutos.

Imediatamente após a desnaturação, 10 µl da solução das sondas (5µl de cada sonda) foram aplicadas na área de hibridização do preparado celular. A área de hibridização foi coberta com lamínula de vidro. A lâmina contendo os preparados celulares e cromossômicos e as sondas foi incubada em câmara escura umedecida com solução 50% formamida/2XSSC a 37°C, por um período de 14 a 16 horas.

Após a incubação, a lamínula foi retirada e a lâmina foi lavada para a remoção do excesso de sonda e fluorocromo, em três banhos consecutivos de solução de lavagem 50% de formamida/2XSSC pH = 7,0-8,0 a 46°C, por dez minutos cada e em um banho de 2XSSC pH = 7,0 a 46°C, também por 10 minutos. Posteriormente, lavada em solução de 2XSSC/Tween 20 pH= 7,0 a 46°C durante 5 minutos. Após secagem em estufa aquecida a 37°C, o material recebeu 10 µl do contracorante de núcleos e cromossomos diamino fenilindole (DAPI) (125 ng/ml) e cobertura com lamínula de vidro.

### **3.2. Interpretação dos resultados**

Os loci p53 foram visualizados como dois sinais fluorescentes vermelhos (um sinal para cada locus p53) e os centrômeros do cromossomo 17 como dois sinais fluorescentes verdes (um sinal para cada centrômero). Os núcleos interfásicos e os cromossomos apresentaram a coloração azul.

Cada núcleo interfásico e cromossomos em metáfase receberam uma classificação de acordo com o número de sinais fluorescentes. Estes foram identificados por meio de um microscópio de fluorescência marca Olympus BX60 com lâmpada HBO 100 W equipado com filtros para o DAPI, o isotiocianato de fluoresceína e o isotiocianato de rodamina, filtros duplos e triplos e de um sistema computadorizado para a captação das imagens, através de uma câmara CCD e do analisador de imagem Cytovision version 4.4 (Applied Imaging Cooperation).

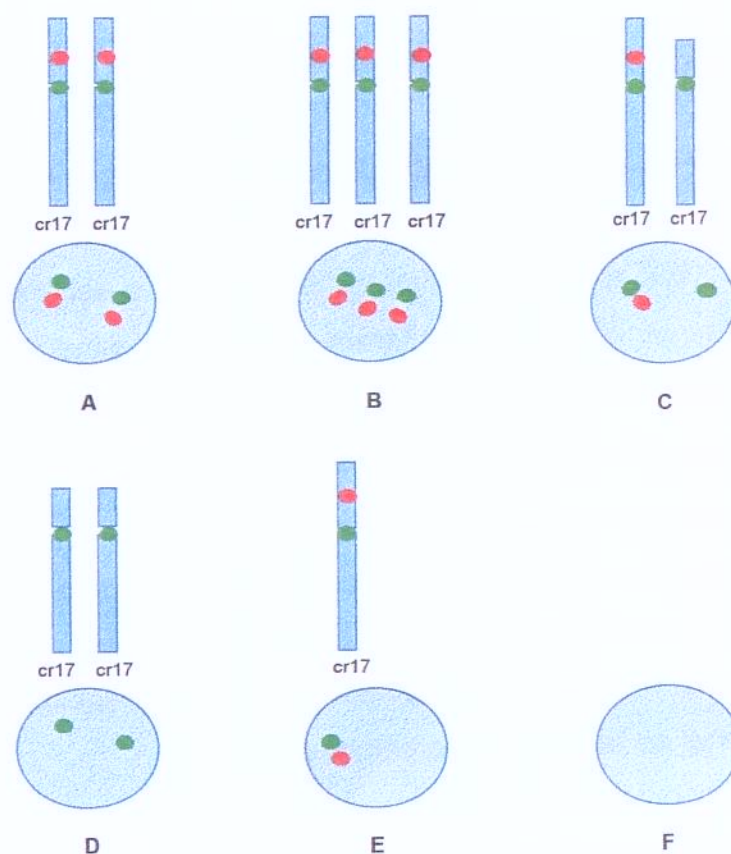
Todos os cromossomos em metáfase e duzentos núcleos interfásicos foram avaliados de cada paciente e controle.

Os controles foram distribuídos de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com padrão normal e com ganhos e perdas de sinais para o centrômero do cromossomo 17 e para o locus do gene p53. Foram considerados como indicativos de anormalidade numérica do cromossomo 17 e do gene p53 em pacientes, os valores que foram maiores do que a média dos valores obtidos na avaliação dos núcleos interfásicos dos controles, acrescidos de três desvios padrão desta média (ANASTASI et al., 1990).



Os pacientes foram distribuídos de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com padrão normal e com ganhos e perdas de sinais para o centrômero do cromossomo 17 e para o locus do gene p53. Foram também distribuídos de acordo com as frequências de anormalidades numéricas do cromossomo 17 e do gene p53, com correlações destas anormalidades com aspectos clínicos.

A representação esquemática dos resultados esperados, com a utilização das sondas especificadas, está apresentada na Figura 2.



**Figura 2:** Representação esquemática dos padrões esperados de hibridização em cromossomos em metáfase e núcleos interfásicos, com a utilização da sonda para o locus p53 (•) e da sonda para o centrômero do cromossomo 17 (•), sendo: (A) dois cromossomos 17 e dois loci p53 normais; (B) trissomia do cromossomo 17 e três cópias do gene p53; (C) deleção monoalélica do gene p53; (D) deleção bialélica do gene p53; (E) monossomia do cromossomo 17 com conseqüente deleção monoalélica do gene p53; (F) núcleo interfásico não informativo

## **4. Análise molecular do gene p53**

### **4.1. Extração do DNA a partir de leucócitos**

Foram colhidos 3 a 5 ml de MO de cada paciente, por meio de punção aspirativa, em frasco estéril com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 10%. A amostra foi centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos a 4°C, para a separação do plasma. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma mistura das soluções de cloreto de amônio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144 M (5,0 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01 M (0,5 vez o volume de células). Após o repouso em gelo por 5 minutos, o hemolisado foi centrifugado por 15 minutos a 2.800 rpm a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, repetiu-se o mesmo procedimento acima e o botão de células obtido foi ressuspenso em 1 ml de DNAzol (Gibco). Após 1-2 dias, o DNA foi precipitado em etanol absoluto, lavado em etanol 70% e solubilizado em NaOH 8 mM a 37°C, proporcional ao tamanho do precipitado.

### **4.2. Avaliação da integridade do DNA**

A integridade do DNA foi avaliada por meio da amplificação do éxon 2 do gene da globina beta humana, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). O procedimento foi realizado de acordo com a descrição de SAIKI et. al. (1985), com algumas modificações.

De forma sucinta, para a amplificação do fragmento do gene foram utilizados 0,4-1,0 µg do DNA a ser estudado, 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 20,0 pmoles de cada iniciador (Tabela 1), 10 mM da mistura desoxirribonucléica – dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL), em volume final de 50,0 µl.

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados na reação para a amplificação do éxon 2 do gene da globina beta por meio da reação em cadeia da polimerase

Iniciadores	Seqüência (5' – 3')	Sentido
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	"sense"
P109	CCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	"anti-sense"

A reação foi conduzida inicialmente, por um ciclo a 94°C durante cinco minutos, para a inativação da atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática e posteriormente, por 35 ciclos de amplificação em termociclador automático PT100 (MJ Research). Cada ciclo foi realizado sob as seguintes condições: 94°C durante 30 segundos (para separação das hélices de DNA); 55°C durante 30 segundos (para ocorrer a ligação complementar entre os iniciadores e o DNA) e 72°C durante um minuto e 30 segundos (para a síntese da nova fita de DNA, através da enzima *Taq* DNA polimerase). Ao término dos 35 ciclos, o produto de amplificação foi mantido a 72°C durante sete minutos (período final da síntese de DNA). A seguir, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Após as reações de amplificação, 8µl do produto da PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose 2% com brometo de etídeo, para a visualização do fragmento amplificado sob luz ultravioleta. Foram utilizados como controle positivo e negativo, amostras de DNA obtidas de sangue periférico de um indivíduo normal e mistura sem DNA, respectivamente.

Um fragmento de DNA, com 365 pares de bases (pb) foi observado em amostras com DNA íntegro. Foram consideradas amostras com DNA degradado ou obtido em escassas quantidades, àquelas nas quais os fragmentos não puderam ser identificados.

### **4.3. Rastreamento das mutações do gene p53 por PCR-SSCP**

A amplificação dos éxons 4 a 10 do gene p53 foi realizada por PCR, com a utilização de 1,0 µg de DNA genômico, 20,0 pmoles de cada iniciador (Clontech - Palo Alto, CA), 10,0 mM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), tampão da enzima (10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50,0 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% gelatina) e 2,5 unidades de Taq polimerase (Gibco-BRL) em um volume final de 50,0 µl. Foram realizados 35 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (x°C), e extensão (72°C) em aparelho Termociclador PT100 (MJ Research). O último ciclo teve o período de extensão prolongado por sete minutos. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% - 2,0% com brometo de etídeo, para a visualização do fragmento amplificado sob luz ultravioleta.

A sequência dos iniciadores, as temperaturas de anelamento e os tamanhos dos fragmentos amplificados para o rastreamento das anormalidades nos éxons 4 a 10 do gene p53 estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Seqüência dos iniciadores (Clontech-Palo Alto, CA), tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento utilizados para o rastreamento de anormalidades nos éxons 4 a 10 do gene p53

Éxon	Seqüência	Fragmento Amplificado	T.A. (°C)
PU4	5'-CAC CCA TCT ACA GTC CCC CTT GC-3'	307 pb	58
PD4	5'-CTC AGG GCA ACT GAC CGT GCA AG-3'		
PU5	5'-CTC TTC CTG CAG TAC TCC CCT GC-3'	211pb	58
PD5	5'-GCC CCA GCT GCT CAC CAT CGC TA-3'		
PU6	5'-GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC-3'	185pb	65
PD6	5'-GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC-3'		
PU7	5'-GTG TTG TCT CCT AGG TTG GCT CTG-3'	139pb	63
PD7	5'-CAA GTG GCT CCT GAC CTG GAG TC-3'		
PU8	5'-ACC TGA TTT CCT TAC TGC CTC TGG C-3'	200pb	62
PD8	5'GTC CTG CTT GCT TAC CTC GCT TAG T-3'		
PU9	5'-GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC-3'	102 pb	59
PD9	5'-CCC AAG ACT TAG TAC CTG AAG GGT G-3'		
PU10	5'-TGT TGC TGC AGA TCC GTG GGC GT-3'	131 pb	60
PD10	5'-GAG GTC ACT CAC CTG GAG TGA GC-3'		

PU: iniciador sense; PD: iniciador anti-sense; T.A.: temperatura de anelamento; pb: pares de bases

O rastreamento das anormalidades no gene foi realizado por polimorfismo de conformação em hélice simples (SSCP), conforme originalmente descrito por Orita et al. (1989 a e b). Optou-se pelo uso do método não radioativo com a utilização do equipamento "PhastSystem"-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

À uma alíquota de 2 µl do produto da reação foram adicionados 2 µl de uma solução contendo formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol. Esta mistura foi desnaturada a 95°C por 5 minutos, mantida em gelo até o momento da aplicação e 0,3 µl foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% homogêneo (éxon 4) e 20% homogêneo (éxons 5 a 10), de tamanho 43 x 50 x 0,45 mm, em tampão acetato 0,112M e Tris 0,112M pH 6,4. A corrida foi realizada em tampão L-Alanina 0,88M, Tris 0,25M em 3% agarose IEF (isoeletrofocalização), pH 8,8. As condições da corrida eletroforética foram as seguintes:

#### **Éxons 5, 6, 7, 8, e 9**

- (1) Pré-corrida: 400 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 10 Vh;
- (2) Aplicação das amostras: 25 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 15°C, 2 Vh;
- (3) Corrida:
  - éxons 5, 6, 7 e 9: 150 V; 5,0 mAmp; 1,0 W; 15°C; 150 Vh
  - éxon 8: 150 V; 5,0 mAmp; 1,0 W; 15°C; 200 Vh

#### **Éxons 4 e 10**

- (4) Pré-corrida: 400 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 4°C, 10 Vh;
- (5) Aplicação das amostras: 25 V, 5,0 mAmp, 1,0 W, 4°C, 2 Vh;
- (6) Corrida:
  - éxons 4: 400 V; 5,0 mAmp; 1,0 W; 4°C; 10 Vh
  - éxon 10: 90 V; 5,0 mAmp; 1,0 W; 4°C; 200 Vh

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

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

1. Ácido tricloacético 20% por 5 minutos a 26°C;
2. Glutaraldeído 5% por 5 minutos a 50°C;
3. Água deionizada por 2 minutos a 50°C (2X);
4. Nitrato de prata 0,4% por 8 minutos a 40°C;
5. Água deionizada por 30 segundos a 30°C;
6. Carbonato de Sódio 2,5%, contendo formaldeído 0,01% por 30 segundos a 30°C, seguida por outra incubação por 5 minutos a 30°C;
7. Ácido Acético 5% por 2 minutos a 50°C;
8. Glicerol 13% por 3 minutos a 50°C.

#### 4.4. Caracterização das anormalidades no gene p53

Para a avaliação das anormalidades de mobilidade eletroforética no gene p53 foi utilizado o "Thermosequenase™ Cycle Sequencing kit" (Amershan Life Science, Inc., Cleveland, Ohio), com a utilização dos mesmos iniciadores da reação de PCR.

As reações de seqüenciamento seguiram o método de SANGER et. al. (SANGER et al., 1977). Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados 2-5 µl da reação de PCR purificado, acrescentando-se 2µl de tampão (26mM tris-HCl pH 9,5 6,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2µl (8U) de enzima *Thermo Sequenase* Polymerase, 1µl do iniciador sense (10pmol) ou anti-sense, e o volume final foi completado para 20µl de água deionizada estéril. Este volume foi dividido em quatro tubos do tipo "eppendorf", cada um deles contendo 2µl de uma solução com os quatro nucleotídeos (G, A, T, C) misturados na mesma proporção (Nucleotide Master Mix) e 0,5µl de [ $\alpha$ -33P]ddNTP (1500Ci/mmol, 450µCi/ml), onde d=A, T, C ou G. As seqüências dos iniciadores, as condições nas



reações e os tempos de corrida dos seqüenciamentos realizados para cada éxon seqüenciado estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Seqüência dos iniciadores, condições nas reações e os tempos de corrida dos seqüenciamentos realizados no estudo

Éxon	Iniciadores da reação de PCR	Condições da reação*	Tempo de corrida
4	5'-CAC CCA TCT ACA GTC CCC CTT GC-3' (→)	30" 94°C	curta: 1 hora
		30" 58°C	longa: 2 horas e 30 minutos
		1' 72°C	
6	5'-GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC-3' (→)	30" 94°C	2 horas
		30" 65°C	
		1' 72°C	
6	5'-GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC-3' (←)	30" 94°C	1 hora
		30" 65°C	
		1' 72°C	
9	5'-GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC-3' (→)	30" 94°C	1 hora
		30" 60°C	
		1' 72°C	

\* condições repetidas em 35 ciclos, contando com 3' de desnaturação inicial a 94°C

→ iniciador sense; ← iniciador-anti-sense

Aos produtos da reação de seqüenciamento foram adicionados 4 µl de "stop solution". A concentração do gel utilizado para a eletroforese do seqüenciamento foi de 6%. Este gel é composto por 5,7g/0,3g de Acrilamida/Bis-acrilamida, 42-50g de Uréia 7-8,3M, 5ml de tampão 20X tolerante ao glicerol e aproximadamente 45 ml de água, perfazendo um total de 100 ml de gel. O tampão citado acima é composto por 216g de Tris, 72g de Taurina, 4g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O e água deionizada suficiente para 1000ml de tampão. O tampão de corrida é o mesmo, porém diluído a uma concentração de 0,8X. Para a montagem do gel, utilizou-se placas de 33 x 40 cm, com gradiente de espessura de 0,25 a 0,75 mm. A voltagem utilizada para a pré-corrida de uma hora foi 80V e após a aplicação das amostras no gel, passamos para uma voltagem de 65V e a corrida se desenvolveu sob uma temperatura de 55°C. Depois de seco a uma temperatura de 80°C por uma hora, o gel foi submetido a exposição em filme de raio X (Hyperfilm-Amersham) por aproximadamente 3-7 dias à temperatura ambiente.

#### **4.5. Caracterização da anormalidade no íntron 6 do gene p53**

Para melhor caracterizar a anormalidade encontrada no íntron 6 do gene p53 de um paciente do estudo, foi extraído o RNA das células mononucleares de uma segunda amostra de MO obtida após o início do tratamento quimioterápico. Cerca de 10 ml de MO foi diluída em 10 ml de meio RPMI (Gibco). As células mononucleares foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/ml-Sigma), conforme descrito para a separação de células mononucleares da MO. Ao botão de células obtido foi acrescentado 1 ml do reagente Trizol (Gibco), segundo a metodologia especificada pelo próprio fabricante.

A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro (Gene Quant) por leitura da densidade óptica nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

A amostra de RNA total foi transcrita reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) e a amplificação do éxon 6 do gene p53 foi realizada por PCR, utilizando-se 2,0µl de cDNA.

O produto da PCR foi purificado com o Kit Concert<sup>TM</sup> Rapid PCR Purification System (Gibco BRL), seguindo as normas do fabricante. Após a purificação foram quantificados com a utilização de um marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder - Gibco-BRL), por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualização das bandas sob luz ultra violeta. A comparação da intensidade das bandas obtidas com as bandas do marcador permitiu estimar a quantidade de cDNA presente na amostra.

A reação de seqüenciamento do éxon 6 do gene p53 foi realizada por método automatizado. Para tal, foram utilizados 20 ng/μl do produto da PCR purificado para uma reação de 10 μl, contendo 3 μl de "Big Dye Terminator Ready Reaction" (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Kit), 1,6 pmol de um dos oligonucleotídeos iniciadores (sense ou antisense) utilizados na PCR e água destilada para completar o volume final.

As condições da reação de seqüenciamento foram: desnaturação inicial a 96°C por 10 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos a 57°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, sendo processados 25 ciclos em aparelho Termociclador Perkin GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 9700.

Para a purificação da reação seqüenciamento, 40ul de isopropanol 75% foram adicionados, agitando-se vigorosamente. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos, a T°C ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 125 μl de etanol 70%, agitando-se. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 minutos, a T°C ambiente e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi então incubada a 65°C por 5-10 minutos, para a evaporação do etanol residual.

O seqüenciamento automatizado foi realizado e analisado no seqüenciador automático ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para a classificação das anormalidades estruturais do gene p53 obtidas no estudo, foi considerada como mutação, a anormalidade gênica que determinou a produção de proteína p53 anômala e por polimorfismo, a anormalidade que não alterou a produção da proteína (COTTON & SCRIVER, 1998).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com as anormalidades do gene p53 identificadas.

## **5. Aspectos éticos**

Os estudos citogenético e molecular foram realizados em amostras de MO obtidas por ocasião da coleta para o estudo citológico necessário à confirmação diagnóstica ou para a confirmação da progressão da doença. Nenhum material adicional foi coletado.

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

## **6. Análise estatística**

Em comparações de variáveis contínuas entre grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (ALTMAN, 1991b). As comparações das distribuições de freqüências foram avaliadas por meio do teste da probabilidade exata de Fischer ou teste do Qui quadrado (ALTMAN, 1991c). Para os cálculos das curvas de sobrevida global foi utilizado o método de Kaplan-Meier e para a comparação das curvas de sobrevida foi utilizado o teste de Breslow (ALTMAN, 1991a).

Para o cálculo da sobrevida global dos pacientes foi considerado o tempo entre a data do diagnóstico e a data do óbito de qualquer natureza ou da última avaliação do paciente no serviço. Está análise foi realizada com base nos dados obtidos até 30 de abril de 2001.

Para todas as análises estatísticas foram utilizados os programas computacionais S-Plus 2000 Professional Release 1, Copyright 1988-1999, MathSoft, Inc. e SPSS for Windows, version 10, SPSS Inc, 2000, Chicago, IL, USA.

## ***RESULTADOS***

## 1. Aspectos clínicos

Foram avaliados 59 pacientes com MM e um paciente com leucemia plasmocitária.

Estes apresentaram a idade entre 29,0 e 79,0 anos, com mediana e média da distribuição de 57,5 e 57,7 anos, respectivamente. Cerca da metade do número de casos apresentou a idade maior do que 60 anos.

A distribuição dos pacientes por sexo mostrou um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino, guardando entre si uma relação de 1,2:1.

Identificamos a exposição prévia dos pacientes a agentes químicos, como os pesticidas, os herbicidas e o benzeno em cerca de 60% dos casos que forneceram informações consistentes a este respeito.

Observamos que 65% dos pacientes que puderam ser estadiados apresentaram a doença avançada (estádio III). O estadiamento não foi realizado em seis casos devido a não realização de um ou mais exames necessários a esta definição.

Cerca de 70% dos pacientes do estudo foram avaliados do ponto de vista citogenético e molecular no momento do diagnóstico.

Nenhum tratamento foi administrado a cinco pacientes devido ao óbito precoce ou a perda do seguimento clínico e a um paciente com MM do estágio I que não apresentou sintomas ou evidência da progressão da doença.

Os pacientes foram seguidos por períodos que variaram de 2 dias a 140 meses, com mediana e média da distribuição de 16 e 26 meses, respectivamente.

As características clínicas e laboratoriais dos 60 pacientes estudados estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Os dados relativos ao diagnóstico, à idade, ao sexo, ao estágio da doença, às datas do diagnóstico e dos estudos citogenético e molecular e o momento da realização dos estudos citogenético e molecular estão apresentados no Anexo 4.

**Tabela 4:** Características clínicas dos 60 pacientes com mieloma múltiplo estudados

Variáveis	Número de pacientes (%)
Idade (anos)	
≤ 50	16 (26,7)
50-60	17 (28,3)
≥ 60	27 (45,0)
Sexo	
masculino	32 (53,3)
feminino	28 (46,7)
Exposição à agentes químicos	
sim	30 (50,0)
não	20 (33,3)
NA	10 (16,6)
Estádio	
I	6 (10,)
II	12 (20,0)
III	36 (60,0)
NR	6 (10,0)
Momento do estudo	
diagnóstico	39 (65,0)
progressão	21 (35,0)
Terapêutica administrada	
MP	11 (18,3)
MP+VAD	14 (23,3)
VAD	29 (48,3)
NR	6 (10)
Situação clínica	
óbito	24 (40,0)
vivo	33 (55,0)
perda de seguimento	3 (5,0)

NA: não analisada; NR: não realizada; MP: melphalan e prednisona; VAD: vincristina, doxorrubicina e dexametazona



**Tabela 5:** Características laboratoriais dos 60 pacientes com mieloma múltiplo estudados

Variáveis	Número de pacientes (%)
Plasmócitos MO (%)	
< 10	14 (23,3)
≥ 10	38 (63,3)
NA	8 (13,3)
Hemoglobina (mg/dl)	
< 8,5	23 (38,3)
8,5 e 10,0	15 (25,0)
> 8,5	21 (35,0)
NA	1 (1,6)
Cálcio sérico (mg/dl)	
> 12	7 (11,6)
≤ 12	47 (78,3)
NA	6 (10,0)
Lesões líticas	
Ausentes	14 (23,3)
Moderadas	24 (40,0)
Avançadas	15 (25,0)
NA	7 (11,6)
Componente monoclonal	
IgG	28 (46,6)
IgA	13 (21,6)
secretor de cadeias leves	4 (6,6)
não secretor	1 (1,6)
NA	14 (23,3)
Creatinina sérica (mg/dl)	
≥ 2	19 (31,6)
≤ 2	39 (65,0)
NA	2 (3,3)

MO: medula óssea; NA: não analisado

## 2. Análise citogenética convencional

### 2.1. Cultura de células da medula óssea

Foram obtidas amostras de MO dos 60 pacientes inseridos no estudo. Entretanto, o material recebido de dois deles foi impróprio para a avaliação. Trinta e sete e 21 das 58 amostras apropriadas foram obtidas de pacientes ao diagnóstico e durante a progressão da doença, respectivamente.

A mediana e a média das porcentagens de plasmócitos obtidos da avaliação citológica da MO foram de 22,5% e 29,7% respectivamente.

Os números de células mononucleares obtidos destas amostras variaram de  $1,8 \times 10^6$  a  $130,1 \times 10^6$  células/ml, com mediana e média da distribuição de  $15,4 \times 10^6$  e  $22,3 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. As amostras obtidas em 87,9% dos casos foram consideradas adequadas para a realização de culturas de células, pois apresentaram números de células mononucleares maiores ou iguais a  $5,0 \times 10^6$ /ml, tido como necessário para a obtenção de cromossomos em metáfase para a análise do cariótipo.

Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas dos números de células mononucleares obtidas de amostras de MO de pacientes ao diagnóstico e de pacientes durante a progressão da doença ( $19,1 \times 10^6$ /ml e  $10,2 \times 10^6$ /ml;  $P = 0,20$ ).

Em amostras de 18 pacientes (31,0%), as culturas realizadas foram apenas as não estimuladas. Em amostras de 12 pacientes (20,7%) foram realizadas apenas as culturas estimuladas. Ambas as culturas, não estimuladas e estimuladas, foram realizadas em amostras de 28 pacientes (48,3%). Desta forma, foram realizadas 48 culturas não estimuladas e 42 culturas estimuladas.

Os números de células mononucleares obtidas para as culturas e os tipos de culturas realizadas em cada caso inserido no estudo estão apresentados no Anexo 5.

## 2.2. Obtenção do cariótipo

Foram obtidos cariótipos em 40 dos 58 (68,9%) pacientes avaliados por meio da análise citogenética convencional. Cariótipos anormais foram identificados em onze pacientes (19,0%) e cariótipos normais em 29 pacientes (50,0%). O cariótipo não pôde ser avaliado em 18 pacientes (31,0%), uma vez que não foram obtidos cromossomos em metáfase para a análise.

As frequências de cariótipos identificados e não identificados de acordo com as porcentagens de plasmócitos e os números de células mononucleares obtidos de amostras de MO de pacientes do estudo estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6:** Frequências de cariótipos identificados e não identificados de acordo com as porcentagens de plasmócitos e os números de células mononucleares obtidos de amostras de medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo estudados

Variável	Cariótipo identificado número (%)	Cariótipo não identificado número (%)	Valor do <i>P</i>
Plasmócitos (n=52)			
<10%	11 (78,6)	3 (21,4)	1,0
≥10%	28 (73,7)	10 (26,3)	
Células mononucleares (n=58)			
<5,0x10 <sup>6</sup>	5 (71,4)	2 (28,6)	1,0
≥5,0x10 <sup>6</sup>	35 (68,6)	16 (31,4)	

Não houve diferenças significativas entre a obtenção e a não obtenção do cariótipo de acordo com as porcentagens de plasmócitos e os números de células mononucleares obtidas de amostras de MO para a cultura celular.

As freqüências de cariótipos normais e anormais de acordo com o momento do estudo, as porcentagens de plasmócitos, os números de células mononucleares e os tipos de culturas realizadas em amostras de MO de pacientes do estudo estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Freqüências de cariótipos normais e anormais de acordo com o momento do estudo, as porcentagens de plasmócitos, os números de células mononucleares e os tipos de culturas realizadas em amostras de medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo estudados

Variável	Cariótipo normal número (%)	Cariótipo anormal número (%)	Valor do P
Momento do estudo (n= 40)			
diagnóstico	21 (80,8)	5 (19,2)	0,14
progressão	8 (57,1)	6 (42,9)	
Plasmócitos (n= 39)			
<10%	7 (63,7)	4 (36,4)	0,69
≥10%	21 (75,0)	7 (25,0)	
Células mononucleares (n= 40)			
<5,0x10 <sup>6</sup>	4 (80,0)	1 (20,0)	1,0
≥5,0x10 <sup>6</sup>	25 (71,4)	10 (28,6)	
Tipo de cultura (n= 40)			
estimulada	3 (7,5)	2 (5,0)	0,06
não estimulada	6 (15,0)	6 (15,0)	
ambas	20 (50,0)	3 (7,5)	

Não foram observadas diferenças entre a obtenção de cariótipos normais e anormais de acordo com o momento do estudo, as porcentagens de plasmócitos, os números de células mononucleares e o tipo de cultura realizada em amostras de MO de pacientes do estudo.

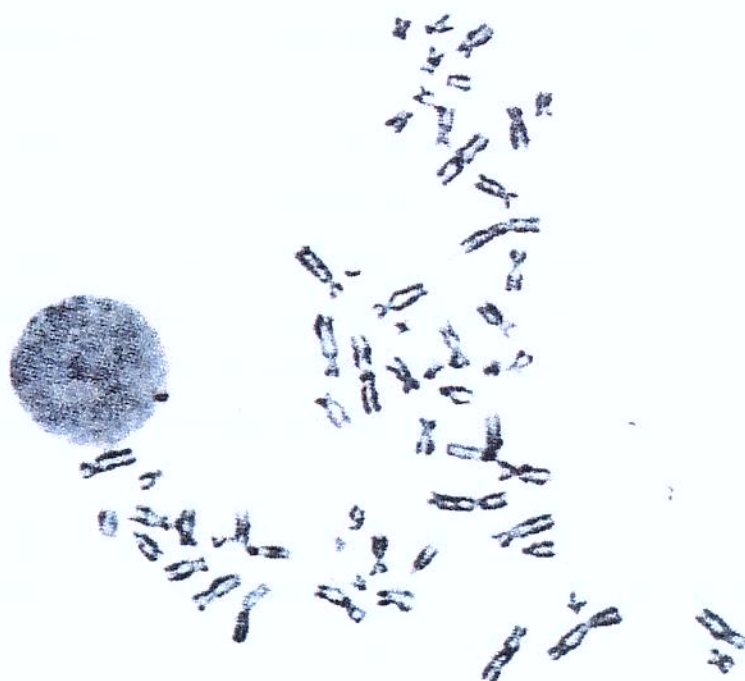
Também não foi observada diferença entre o padrão do cariótipo considerando o total de culturas estimuladas e não estimuladas ( $P=0,65$ ).

A hiperdiploidia foi identificada em dez pacientes (17,2%). A trissomia do cromossomo 17 foi observada em dois pacientes (3,4%; casos nºs 8 e 13; Figura 3) e a monossomia do cromossomo 17 foi observada em um único paciente (1,7%) (caso nº 51, Figura 4). A hipodiploidia, com perda do cromossomo Y, foi identificada em apenas no caso nº 17 (1,7%).

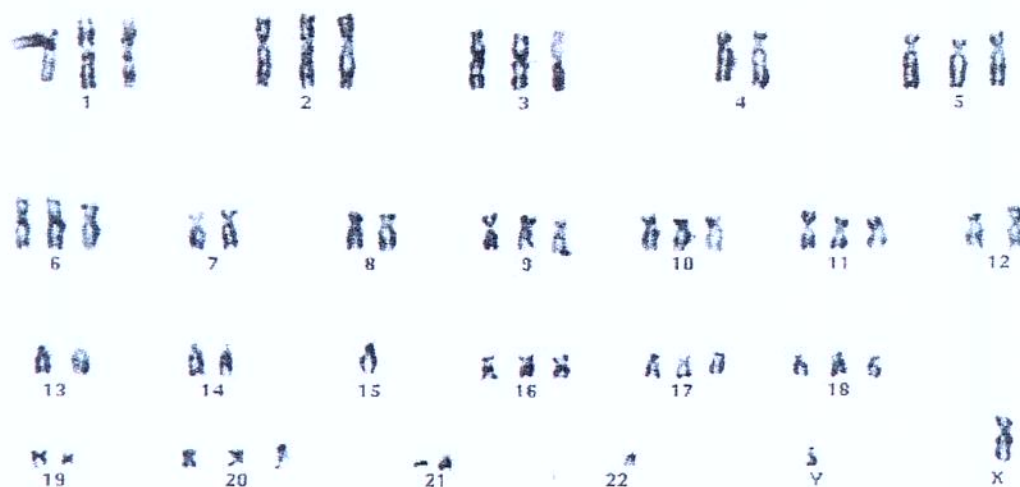
A deleção das regiões 6q21 e 13q14 e uma translocação complexa, aparentemente comprometendo os cromossomos 1 e 7, foram identificadas em um único paciente (caso nº 51, Figura 4).

Os números de cromossomos em metáfases analisados e os cariótipos obtidos em pacientes inseridos no estudo estão apresentados no Anexo 6.

A



B



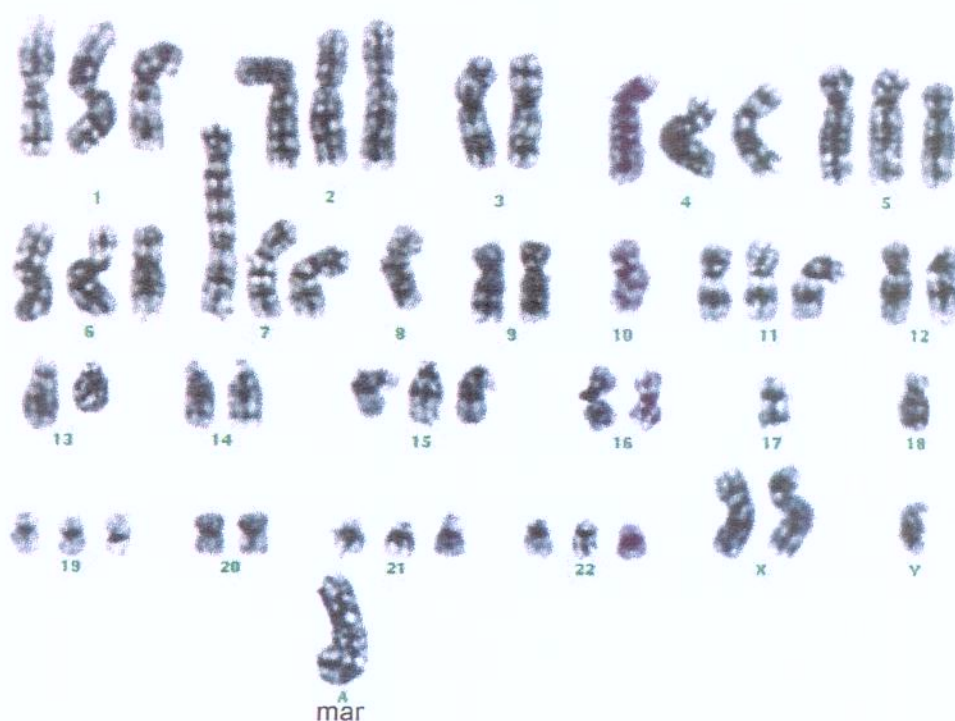
**Figura 3 (A e B):** Cromossomos em metáfase e cariótipo: 56, XY, +1, +2, +3, +5, +6, +9, +10, +11, -15, +16, +17, +18, +20, -22 em paciente com mieloma múltiplo (caso nº 13)



A



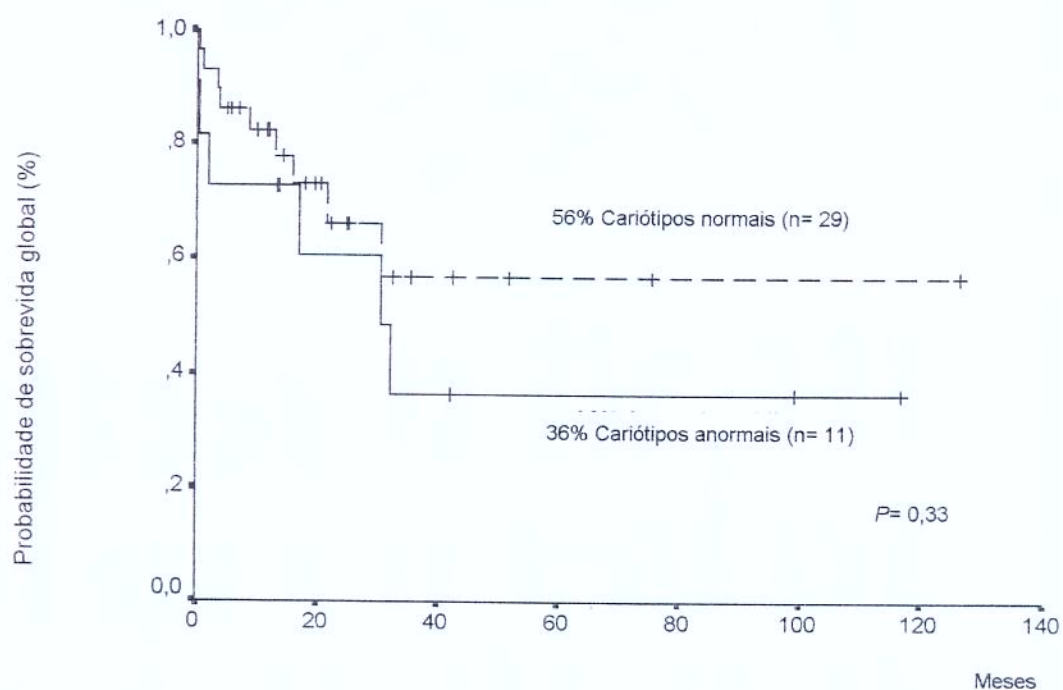
B



**Figura 4 (A e B):** Cromossomos em metáfase e cariótipo: 55, XY, +X, +1, +2, +4, +5, +6, del(6)q21, add(7)q36, -8, -10, +11, del(13)q14, +15, -17, -18, +19, +21, +22, +mar, em paciente com mieloma múltiplo (caso nº 51)

### 2.3. Correlação do cariótipo com a sobrevida global

As probabilidades de sobrevida global aos 140 meses para os pacientes com cariótipo normal e anormal, foram de 56% e 36%, respectivamente. Não houve diferença entre as probabilidades de sobrevida global dos pacientes em relação a estes padrões do cariótipo ( $P=0,33$ ; Figura 5).



**Figura 5:** Curvas de sobrevida global dos pacientes com MM com cariótipos normais e com anormalidades do cariótipo



### 3. Análise citogenética molecular do cromossomo 17 e do gene p53

As avaliações numéricas do cromossomo 17 e do gene p53, por meio do método FISH, foram realizadas em 51 dos 58 pacientes inseridos no estudo e em dez controles. Trinta e quatro e 17 dos 51 pacientes foram avaliados ao diagnóstico e durante a progressão da doença, respectivamente. A análise não foi realizada em sete pacientes devido a escassez de núcleos interfásicos disponíveis.

#### 3.1. Resultados obtidos em controles

Dois sinais fluorescentes verdes (um para cada centrômero do cromossomo 17) foram observados em 89,5% a 96,0% dos núcleos interfásicos avaliados (média±DP: 93,70%±2,45%). Três sinais fluorescentes verdes, indicativos de trissomia do cromossomo 17, foram identificados em 0,0% a 6,5% dos núcleos interfásicos avaliados (média±DP: 1,15%±1,97%). Não foram observados mais do que três sinais fluorescentes verdes em qualquer dos núcleos interfásicos dos controles. Um único sinal fluorescente verde, indicativo da monossomia do cromossomo 17, foi identificado em 2,5% a 6,5% dos núcleos avaliados (média±DP: 4,15%±1,29%).

Considerando que os valores de corte para as anormalidades numéricas do cromossomo 17, foram definidas como o valor da média mais três desvios padrão da média obtida da avaliação de núcleos interfásicos de controles, valores maiores do que 7,0% e 7,5% foram indicativos da trissomia e da monossomia do cromossomo 17, respectivamente, para os pacientes do estudo.

Dois sinais fluorescentes vermelhos (um para cada locus do gene p53) foram identificados em 86,5% a 96,0% dos núcleos interfásicos (média±DP: 92,95±2,70%). Três sinais fluorescentes vermelhos, indicativos da presença de três cópias do gene p53, foram identificados em 1,0% a 4,0% dos núcleos interfásicos avaliados (média±DP: 2,65%±0,91%). Não foram observados mais do que três sinais fluorescentes vermelhos em qualquer dos núcleos interfásicos dos controles. Um único sinal fluorescente vermelho, indicativo de deleção heterozigótica do gene p53, foi

observado em 1,0% a 5,5% dos núcleos interfásicos avaliados (média±DP: 2,30%±2,01%).

Tendo sido considerado que o valor de corte para as anormalidades numéricas do gene p53 foi definido como os valores maiores do que a média mais três desvios padrão observada em núcleos interfásicos de controles, valores maiores do que 5,5% e 8,5% foram indicativos de três cópias do gene p53 e da deleção monoalélica do gene p53, respectivamente, para os pacientes do estudo.

### 3.2. Resultados obtidos em pacientes

A trissomia do cromossomo 17 foi identificada em sete pacientes (13,7%) avaliados. (casos n°s 8, 10, 13, 14, 28, 50, 52). A anormalidade esteve presente em 9,5% a 49,0% dos núcleos interfásicos (média±DP: 27,57%±16,25%).

Três pacientes (5,9%) apresentaram a tetrassomia do cromossomo em 4,5%, 6,0% e 25,0% dos núcleos interfásicos (casos n°s 2, 6, 44).

A monossomia do cromossomo 17 foi identificada em seis (11,8%) pacientes (casos n°s 16, 20, 21, 25, 47, 49). A anormalidade esteve presente em 10,0% a 13,5% dos núcleos interfásicos (média±DP: 10,70±1,40%).

A distribuição dos pacientes de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos normais e anormais, obtidos com a utilização da sonda para o centrômero do cromossomo 17, está apresentada no Anexo 7.

Onze pacientes (21,7%) apresentaram três cópias do gene p53 em 7,5 a 33,5% (média±DP: 13,82±9,25) dos núcleos interfásicos (casos n°s 7, 8, 10, 14, 15, 26, 28, 35, 45, 50 e 52).

Quatro cópias do gene foram identificadas em três pacientes (5,9%), em 4,5%, 6,0% e 25,0% dos núcleos interfásicos (casos n°s 2, 6, 44).

As deleções do gene p53 foram observadas em oito pacientes (15,7%). Deleções monoalélicas e bialélicas foram identificadas em sete e em um único paciente, respectivamente.

A distribuição destes pacientes de acordo com os números de sinais obtidos com a utilização das sondas para o centrômero do cromossomo 17 e para o locus do gene p53 está apresentada na Tabela 8.

A distribuição dos pacientes de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos normais e anormais, obtidos com a utilização da sonda para o locus do gene p53 está apresentada no Anexo 8.

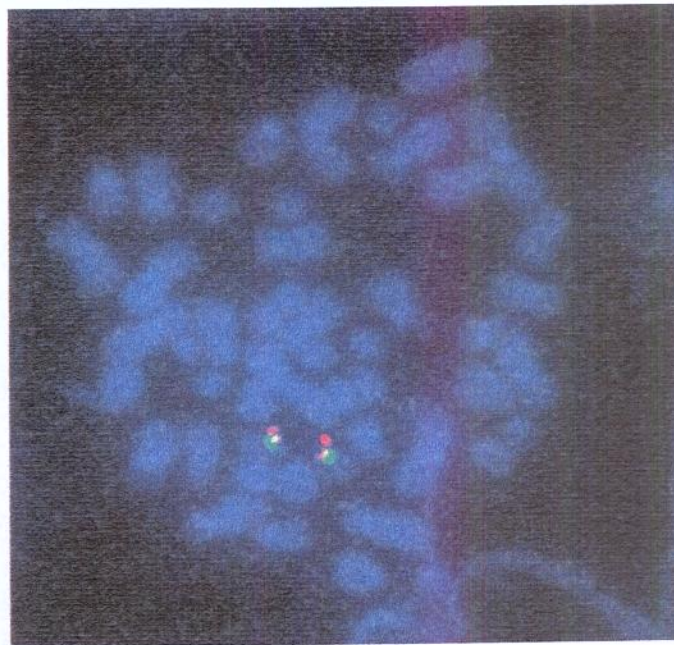
Um padrão de hibridização normal com as sondas utilizadas em um controle está apresentado na Figura 6. A trissomia do cromossomo 17 com três cópias do gene p53 e a deleção monoalélica e bialélica do gene p53 estão apresentadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

**Tabela 8:** Resultados obtidos da análise de oito pacientes com deleção do gene p53 por meio do método FISH, com a utilização de sonda para o centrômero do cromossomo 17 e de sonda para o locus do gene p53

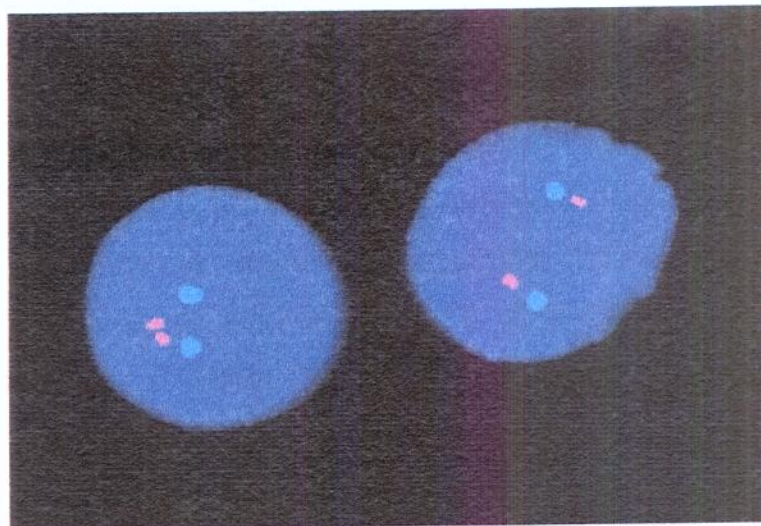
Nº caso	Número de sinais de hibridização (% de núcleos interfásicos)	
	Cromossomo 17	Locus p53
4	++ (89,1)	+ (17,2)
6	++++ (7,0)	+ (12,0)
13	+++ (13,5)	+ (12,0)
17	++ (92,0)	+ (23,5)
21	+ (10,0)	+ (28,0)
23	++ (95,0)	+ (17,0)
46	++ (92,0)	+ (20,5)
51	++ (93,0)	+ (25,5)
		0 (13,5)

0, indica a deleção bialélica; +, indica a deleção monoalélica; ++, indica a presença de dois loci ou cromossomos; +++, indica a trissomia; +++, indica a tetrassomia

A

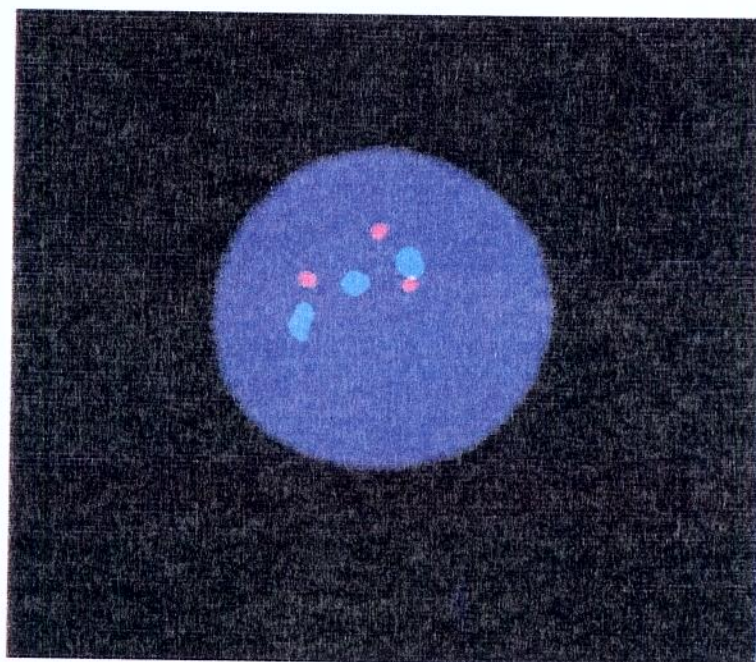


B

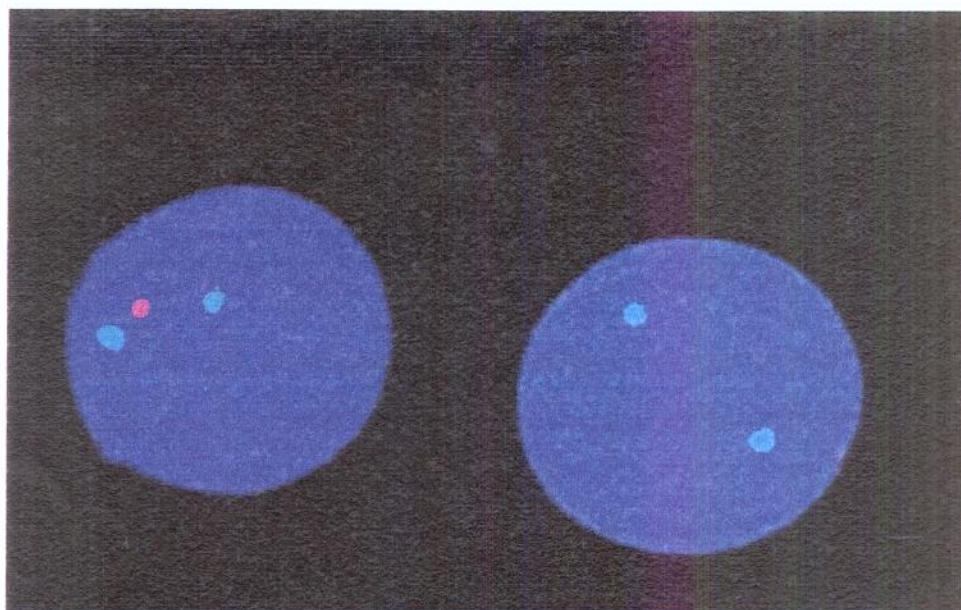


**Figura 6 (A e B):** Cromossomos em metáfase e núcleos interfásicos em um controle avaliado por meio do método de hibridização *in situ* com fluorescência (método FISH), com a utilização simultânea de uma sonda para o centrômero do cromossomo 17 (•) e de uma sonda para o locus do gene p53 (•), indicando padrões normais de hibridização





**Figura 7:** Núcleo interfásico de um paciente com mieloma múltiplo, avaliado por meio do método de hibridização *in situ* com fluorescência (método FISH), com a utilização simultânea de uma sonda para o centrômero do cromossomo 17 (•) e de uma sonda para o locus do gene p53 (•). A presença de três sinais verdes e vermelhos indicou a trissomia do cromossomo 17 e três cópias do gene p53 (caso nº 28)



**Figura 8:** Núcleos interfásicos de paciente com mieloma múltiplo, avaliado por meio do método de hibridização *in situ* com fluorescência (método FISH), com a utilização simultânea de uma sonda para o centrômero do cromossomo 17 (•) e de uma sonda para o locus do gene p53 (•). Os dois sinais verdes e um único sinal vermelho no núcleo esquerdo indicaram a presença de dois cromossomos 17 e a deleção monoalélica do gene p53. Os dois sinais verdes no núcleo da direita indicaram a presença de dois cromossomos 17 e a deleção bialélica do gene p53 (caso nº 51)

### 3.3. Correlações das anormalidades do cromossomo 17 e do gene p53 com os aspectos clínicos

As probabilidades de sobrevida global aos 140 meses para pacientes com cariótipo normal, com ganhos do cromossomo 17 e com a monossomia do cromossomo 17 foram de 52,0%, 34,0% e 22,0%, respectivamente. Não foram observadas diferenças entre as probabilidades de sobrevida considerando os diferentes grupos de pacientes ( $P=0,93$ ).

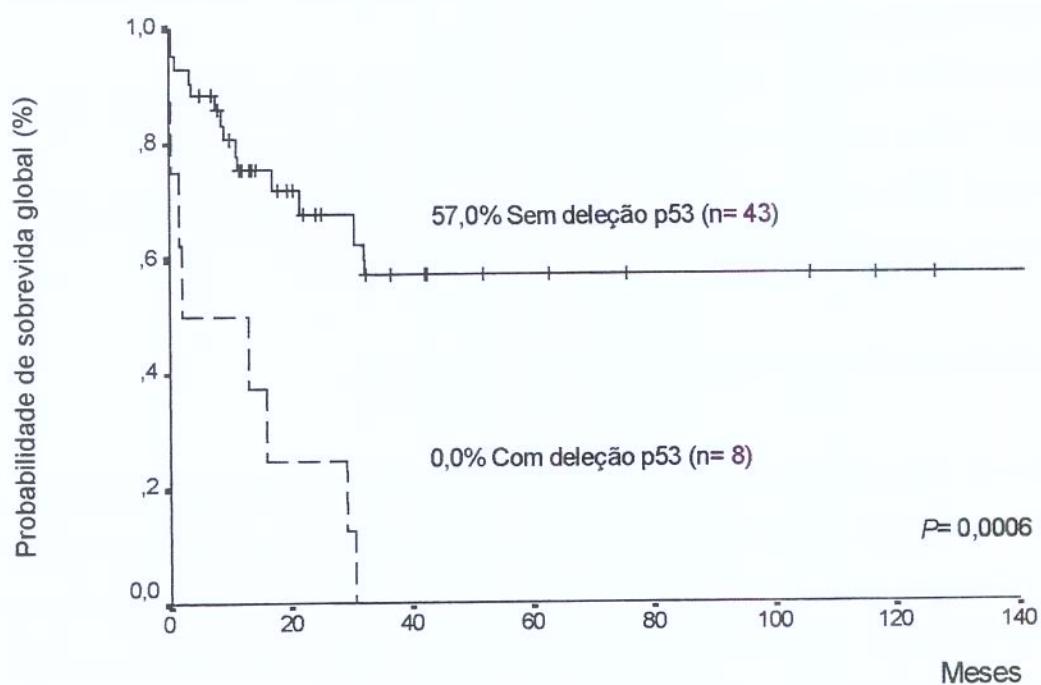
As probabilidades de sobrevida global em pacientes com cópias adicionais e número normal de cópias do gene p53 foram similares (60,0% *versus* 58,0%;  $P=0,80$ ).

Freqüências similares da deleção do gene p53 foram observadas em pacientes com os estádios I e II e em pacientes com o estágio III (6,3% *versus* 23,3%;  $P=0,23$ ) e ainda, em pacientes avaliados ao diagnóstico e durante a progressão da doença (18,0% *versus* 12,0%;  $P=0,70$ ).

A mediana da sobrevida global de pacientes com deleção do gene p53 foi menor do que a observada em pacientes que não apresentaram a anormalidade gênica (7,5 meses *versus* 17,0 meses;  $P=0,05$ ). As probabilidades de sobrevida global aos 140 meses, para os pacientes do primeiro grupo foi também maior do que a observada para os pacientes do segundo grupo (57,0% *versus* 0,0%;  $P=0,0006$ ).

As curvas de probabilidades de sobrevidas global em pacientes com deleção do gene p53 e em pacientes sem esta anormalidade gênica estão apresentadas na Figura 9.





**Figura 9:** Curvas de sobrevida global dos pacientes com MM e deleção do gene p53 e dos pacientes que não apresentaram a deleção do gene, avaliados pelo método de hibridização *in situ* com fluorescência

#### **4. Análise molecular do gene p53**

A análise molecular do gene p53 foi realizada em 38 pacientes ao diagnóstico e em 21 pacientes durante progressão da doença.

Foi obtido DNA de 59 dos 60 pacientes inseridos no estudo. Em um único paciente (caso nº 57) o material recebido foi inadequado para a extração.

Foi colhido DNA em quantidade e qualidade adequadas para a avaliação, de todos os pacientes inseridos no estudo.

##### **4.1. Rastreamento das anormalidades no gene p53**

A análise foi realizada em duplicata de produtos independentes obtidos de DNA extraído da MO de 59 dos 60 pacientes incluídos no estudo. Um padrão de mobilidade eletroforética alterado ao SSCP, foi encontrado em 13 amostras, sendo sete correspondentes ao éxon 4 (Casos nºs 8, 17, 25, 37, 40, 45 e 54), quatro ao éxon 6 (Casos nºs 13, 19, 29 e 60) e dois ao éxon 9 (Casos nºs 7 e 33).

##### **4.2. Caracterização das anormalidades no gene p53**

Um mesmo polimorfismo em homozigose no códon 72 do éxon 4 (CGC→CCC) substituindo uma arginina por uma prolina foi observado nos 7 pacientes que apresentaram padrão de mobilidade eletroforética alterado ao SSCP nesta região do gene.

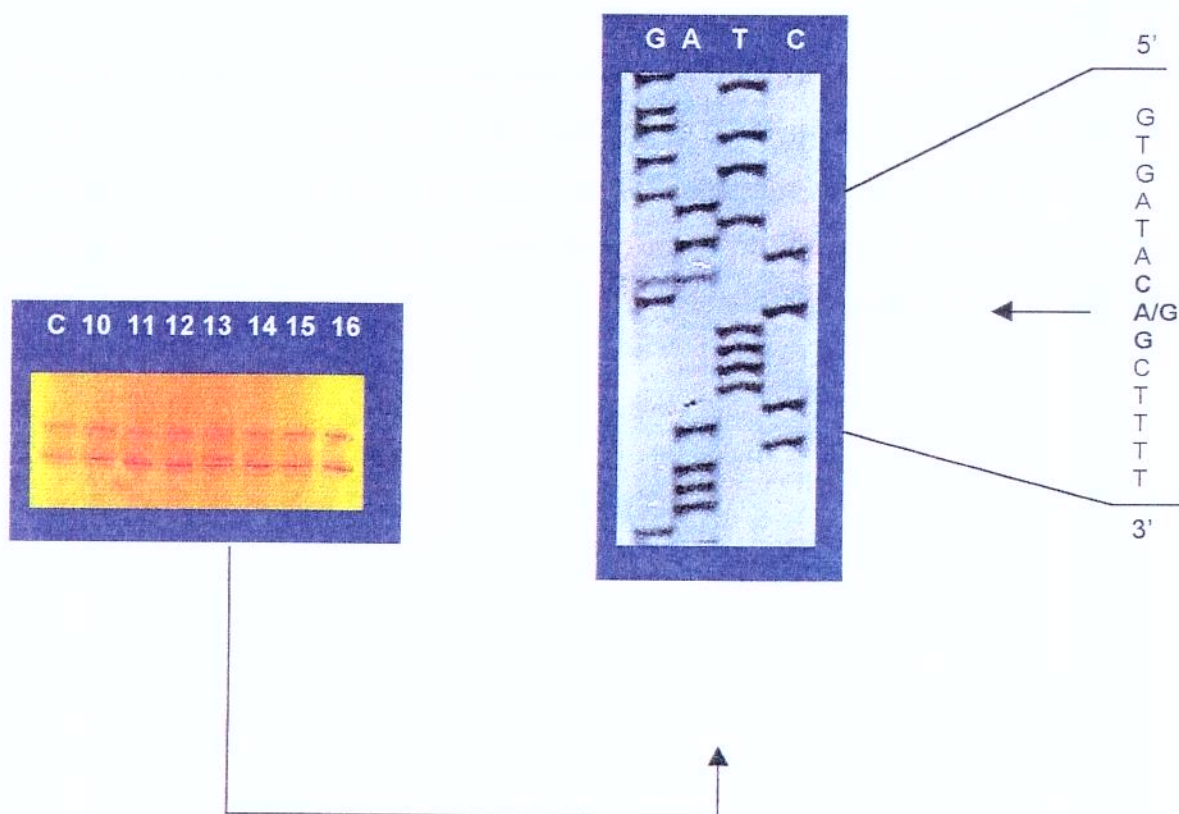
Um mesmo polimorfismo no códon 213 do éxon 6 (CGA→CGC) foi identificado em heterozigose no Caso nº 13 e em homozigose no Caso nº 19, não havendo substituição de aminoácidos (arg→arg).

Um único paciente apresentou a substituição de uma base na posição +31 do íntron 6 do gene p53, havendo a troca de uma adenina por uma guanina (A→G) (caso nº 60). Nenhuma anormalidade no éxon 6 foi observada por seqüenciamento do cDNA deste caso.

Nenhuma outra anormalidade no éxon 6 foi identificada por seqüenciamento do caso nº 29, bem como no seqüenciamento do éxon 9 dos casos nºs 7 e 33, que apresentaram padrão de mobilidade eletroforética alterado ao SSCP nas respectivas regiões do gene.

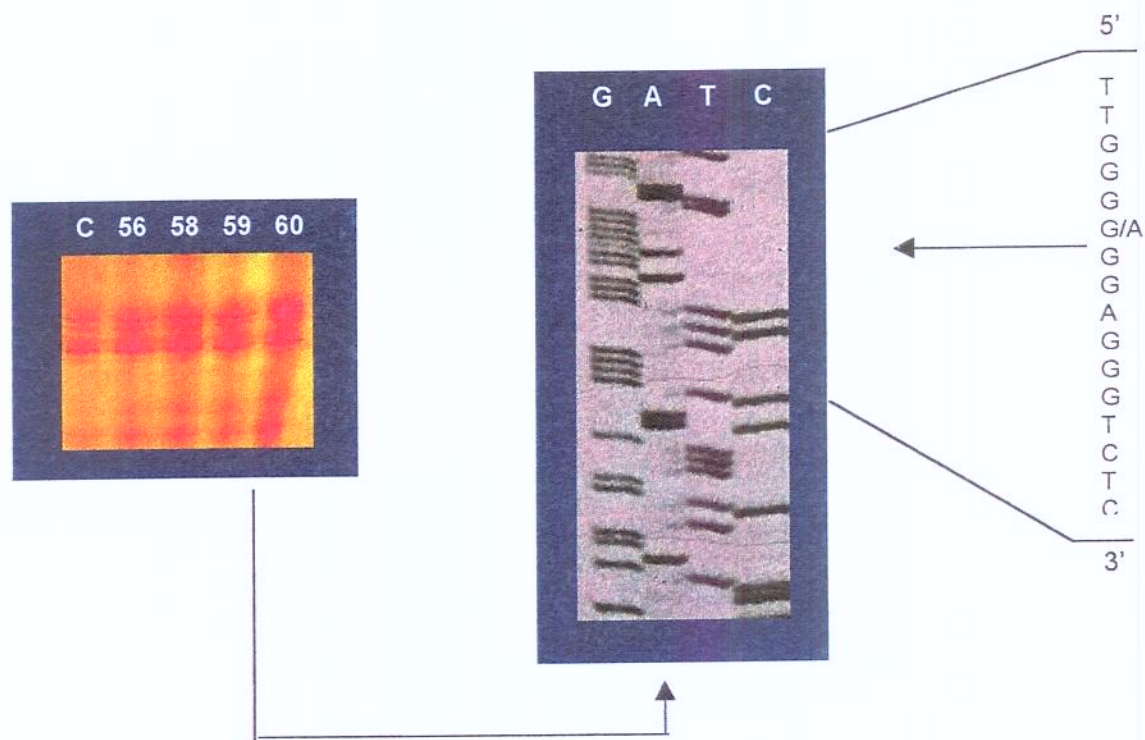
A análise por PCR, SSCP e seqüenciamento do éxon 4 e do éxon 8 não foi possível no caso nº 29 devido à degradação do DNA disponível no momento do estudo.

As anormalidades identificadas por SSCP e sequenciamento do éxon 4 do gene p53 no caso nº 13 do íntron 6 do gene p53 do caso nº 60 estão apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente.



**Figura 10:** À esquerda, os resultados da análise por SSCP não radioativo do produto do PCR contendo o éxon 6 do gene p53. A coluna C representa um indivíduo controle. As colunas 10 a 12 e 14 a 16 representam o DNA de pacientes com MM que apresentaram mobilidade eletroforética normal, enquanto que a coluna 13, representa o DNA de um paciente com mobilidade eletroforética alterada (Caso nº 13). À direita, os resultados obtidos a partir da análise por seqüenciamento da fita "sense" do DNA do éxon 6 do gene p53 do mesmo paciente. O resultado é consistente com um polimorfismo silencioso no códon 213 (CGA→CGG) em heterozigose. A seta indica o local onde ocorreu a o polimorfismo





**Figura 11:** À esquerda, os resultados da análise por SSCP não radioativo do produto do PCR do DNA do éxon 6 do gene p53. O resultado de um indivíduo normal está apresentado na coluna C. Os resultados obtidos em pacientes com MM com mobilidade eletroforética normal estão apresentados nas colunas 56, 58 e 59. O resultado obtido em um paciente com MM com mobilidade eletroforética anormal está apresentado na coluna 60 (caso nº 60). À direita, os resultados da análise por seqüenciamento da fita "sense" do DNA do éxon 6 do gene p53 do mesmo paciente. O resultado foi consistente com um polimorfismo em heterozigose na posição +144 do íntron 6, com a substituição de uma adenina por uma guanina (A→G). A seta indica o local onde ocorreu o polimorfismo

## ***DISCUSSÃO***

O MM foi extensivamente estudado nos últimos anos, particularmente em suas características genéticas. Entretanto, vários de seus aspectos, como as frequências das anormalidades numéricas do cromossomo 17 e das deleções e mutações do gene p53, bem como o impacto destas anormalidades na sobrevida de pacientes com a doença, permanecem indeterminados, o que justificou a realização deste estudo.

Quando os nossos pacientes com MM foram distribuídos por idade, notamos que a idade média foi menor, 57,7 anos, do que a observada em pacientes de países do hemisfério norte, 65,0 anos (SMADJA, et al., 1995; DRACH et al., 1998; PEREZ-SIMON et al., 1998; BARLOGIE et al., 2001; MEDEIROS, 2001).

O controle da exposição ambiental de indivíduos a agentes químicos é insatisfatório no Brasil. Assim, a população brasileira parece ser mais submetida à exposição a pesticidas, a herbicidas e ao benzeno do que as populações do hemisfério norte (LORAND et al., 1984; SHIELDS et al., 1993; RUIZ et al., 1994; QUEIROZ et al., 1997). Como estes fatores podem estar associados com a origem do MM (GOLDSTEIN & STUART, 2000) e cerca de 60% dos nossos pacientes relataram a exposição a agentes químicos, as diferenças observadas entre as idades de nossos pacientes e a daqueles do hemisfério norte podem ter resultado de uma maior incidência da doença em nosso meio ou da manifestação da mesma em idade mais precoce do que a usual.

As diferentes composições etárias das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (VERAS, 1991) poderiam também constituir uma explicação plausível para as diferenças etárias observadas em pacientes dos diferentes estudos.

As distribuições por sexo dos nossos pacientes mostraram um discreto predomínio da doença em pacientes do sexo masculino, semelhante a outros relatos (SMADJA et al., 1995; DRACH et al., 1998; PEREZ-SIMON et al., 1998; BARLOGIE et al., 2001; MEDEIROS, 2001).

Quando os nossos pacientes foram distribuídos por estágio da doença, observamos que cerca de 70% deles apresentaram a sua forma avançada (estádio III), de acordo com as descrições de DURIE & SALMON (1975), LAI et al. (1995), TABERNERO et al. (1996), CALASANZ et al. (1997), TRICOT et al. (1997), DRACH et al. (1998), PEREZ-SIMON et al. (1998) e SMADJA et al. (1998).

Em seu conjunto, os resultados deste estudo indicaram que o MM em nosso meio tem aspectos clínicos semelhantes aos da doença no hemisfério norte.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o cariótipo obtido por meio da análise citogenética convencional, identificamos anormalidades do cariótipo e cariótipo normal em cerca de 20% e 50% deles, respectivamente. Notamos ainda, que o cariótipo não pode ser identificado devido a ausência de cromossomos em metáfase nos 30% restantes.

SAWYER et al. (1995), CALASANZ et al. (1997) e FEINMAN et al. (1997) identificaram as anormalidades do cariótipo em 27% a 33% dos pacientes com a doença, respectivamente. Desta forma, as nossas frequências de anormalidades do cariótipo foram similares às obtidas por estes autores. Por outro lado, as anormalidades do cariótipo foram identificadas com frequências que variaram de 36% a 76,6%, nos estudos conduzidos por ZAGO et al. (1975), DEWALD et al. (1985), GOULD et al. (1988), FACON et al. (1993), LAI et al. (1995), SMADJA et al. (1995), BRIGAUDEAU et al. (1997), TRICOT et al. (1997), SEONG et al. (1998) e SMADJA et al. (1998).

A explicação para a identificação destas anormalidades com frequência menor do que a descrita na maioria dos estudos não nos parece clara por várias razões.

Inicialmente, colocamos em cultura apenas células mononucleares da MO, uma vez que pareceu consenso entre os citogeneticistas, que a frequência real de anormalidades cromossômicas na doença pudesse ser subestimada pela pequena atividade mitótica dos plasmócitos e que, desta forma os cariótipos pudessem resultar da proliferação de células normais e não do clone neoplásico (FEINMAN et al., 1997). Ainda, obtivemos números de células mononucleares adequados para a cultura da maioria das amostras, indicando que não ocorreram problemas na coleta ou separação das células.

Também utilizamos a IL-6 e o GM-CSF em culturas celulares de nossos pacientes, uma vez que foram considerados estimuladores da proliferação de plasmócitos e inibidores da sua apoptose, em culturas de células da MO de pacientes com MM (KLEIN et al., 1989; NILSSON et al., 1990; ZHANG et al., 1990). Obtivemos um grande número de cromossomos em metáfase para a análise de cariótipo, na



maioria dos nossos pacientes, indicando que problemas nas culturas de células ou escassez de material para a análise não ocorreram em nosso estudo.

Ainda, utilizamos para a avaliação do cariótipo um sistema automatizado de análise (Cytovision version 4.4, Aplied Imaging Cooperation), que possibilitou o pareamento e a ampliação do tamanho dos mesmos e, desta forma, facilitou a identificação das anormalidades cromossômicas. Desta forma, problemas na avaliação dos cromossomos em metáfase foram, pelo menos, atenuados em nosso estudo.

Assim, nos pareceu que a ocorrência de anormalidades cromossômicas com pequena frequência foi uma característica da nossa amostra. Se forem verdadeiras as suposições de que a maioria dos pacientes são anormais do ponto de vista cariotípico, a proliferação preferencial de linfócitos e monócitos em cultura constitui a única explicação plausível para os nossos resultados.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o padrão do cariótipo obtido de culturas de células não estimuladas e estimuladas por IL-6 e o GM-CSF, observamos que os cariótipos anormais foram identificados com frequências similares em amostras dos dois tipos de culturas celulares. Também SMADJA et al. (1995) e BRIGAUDEAU et al. (1997) obtiveram resultados semelhantes em seus estudos, o que indicou que a adição de citocinas às culturas celulares não contribuiu para aumentar a identificação da suposta alta frequência de anormalidades cariotípicas em pacientes com MM. Entretanto, cariótipos anormais foram identificados com frequência expressivamente maior em amostras de culturas estimuladas, 55%, do que em amostras de culturas não estimuladas, 24%, no estudo conduzido por LAI et al. (1995), o que indicou que as citocinas parecem ter determinado a proliferação dos plasmócitos do MM em culturas celulares.

Assim, podemos apenas dizer que as citocinas IL-6 e GM-CSF aparentemente não interferiram na identificação de anormalidades do cariótipo em nosso estudo e que outros estudos devem ser realizados para que se possa esclarecer este aspecto com exatidão.

A distribuição dos nossos pacientes de acordo com as diferentes anormalidades do cariótipo mostrou que estas foram constituídas na sua quase totalidade por

anormalidades numéricas, como a hiperdiploidia e a hipodiploidia, de forma similar a relatos prévios (ZAGO, 1975; DEWALD et al., 1985; WEH et al., 1993; GOULD et al., 1988; LAI et al., 1995; BRIGAUDEAU, 1997; CALASANZ et al., 1997; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998).

A deleção do cromossomo Y foi observada em um único paciente do nosso estudo. Ele tinha 69 anos no momento da avaliação citogenética. Assim, não pudemos atribuí-la com certeza à doença, uma vez que a perda do cromossomo Y pode ocorrer em indivíduos normais com a idade avançada (PIERRE et al., 1972; DEWALD et al., 1985).

As anormalidades numéricas do cromossomo 17, como a trissomia e a monossomia foram identificadas em menos do que 5% dos pacientes do nosso estudo. A identificação destas anormalidades como eventos pouco comuns foi também descrita por FEINMAN et al. (1997). Não observamos em nosso estudo, deleções do braço curto do cromossomo 17. De acordo com a descrição de DURIE (1992), estas anormalidades cromossômicas devem constituir eventos raros na doença.

A deleção da região 13q14 foi identificada em apenas um caso da nossa amostra. Deleções parciais ou completas do braço longo do cromossomo 13 foram identificadas por citogenética convencional em 15% a 47% dos pacientes com MM (LAI, et al., 1995; SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998). A deleção da região 6q21 foi identificada no mesmo caso. LAI et al. (1995) identificaram deleções do braço longo do cromossomo 6 em 7,0% dos pacientes estudados por análise citogenética convencional e FEINMAN et al. (1997) observaram em 15,0%. Um único rearranjo cromossômico, add(7)q36, foi identificado no mesmo único caso.

É possível que identificação de deleções e translocações em apenas um único paciente tenha resultado da pequena frequência de anormalidades do cariótipo em nossa amostra. É ainda possível que a morfologia dos cromossomos que obtivemos não tenha sido satisfatória para a identificação de anormalidades cromossômicas de pequena extensão.

As curvas de sobrevida global não foram influenciadas pelo padrão do cariótipo. Este resultado é discordante da maioria das descrições anteriores (DEWALD et al.,

1985; WEH et al., 1993; SEONG et al., 1998; FEINMAN et al., 1997; CALASANZ et al., 1997; TRICOT et al., 1997; PEREZ-SIMON et al., 1998; SMADJA et al., 1998; HANG et al., 1999; MEDEIROS, 2001), nas quais os pacientes com anormalidades do cariótipo apresentaram menor probabilidade de sobrevida global do que os demais. Uma possível explicação para esta diferença pode ser o fato de que nós identificamos apenas a hiperdiploidia na quase totalidade dos nossos casos e, embora esta anormalidade tenha sido descrita como um fator de prognóstico desfavorável, o seu impacto na sobrevida dos pacientes com MM parece menor do que o exercido por outras anormalidades cromossômicas, não identificadas neste estudo (SEONG et al., 1998; SMADJA et al., 1998). É ainda possível que a variação da sobrevida de nossos pacientes de acordo com o padrão do cariótipo tenha ocorrido, mas que não tenha sido forte o suficiente para ser identificada por eventos de pequena frequência.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o número de cromossomos 17 identificados por meio do método FISH, observamos que ganhos deste cromossomo ocorreram em cerca de 20% e perdas ocorreram em 11,8% dos pacientes. Estes resultados estiveram de acordo com as observações de TABERNERO et al. (1996) e PEREZ-SIMON et al. (1998) que identificaram ganhos do cromossomo 17 em cerca de 22% dos pacientes analisados em seus estudos. Também DRACH et al. (1998) identificaram ganhos do cromossomo 17 em cerca de 13% dos pacientes com a doença e AVET-LOISEAU et al. (1999) e KÖNIGSBERG et al. (2000) identificaram em 10% de seus pacientes estudados pelo FISH. Estes autores, porém, não observaram perdas do cromossomo 17 em seus estudos. Já SCHULTHEIS et al. (1999) não identificaram ganhos do cromossomo 17, mas observaram perdas em 4% dos pacientes.

Assim, o conjunto dos resultados obtidos indicou que as anormalidades numéricas do cromossomo 17, predominantemente ganhos do cromossomo 17, constituem eventos relativamente comuns na doença. Em nosso estudo, esta frequência foi expressivamente maior do que a observada quando estas anormalidades foram identificadas por meio da análise citogenética convencional, cerca de 5%. Assim,

o método FISH em nossa experiência, foi mais sensível do que a análise citogenética convencional, para a identificação das anormalidades numéricas do cromossomo 17.

A distribuição dos nossos pacientes de acordo com as anormalidades numéricas do cromossomo 17, identificadas pelo método FISH, e a probabilidade de sobrevida global mostrou que estas anormalidades não tiveram impacto na sobrevida global de pacientes do estudo, como observado por KÖNIGSBERG et al. (2000). No entanto, PEREZ-SIMON et al. (1998) observaram que os pacientes com ganhos de cromossomos 17 apresentaram probabilidade de sobrevida maior do que aqueles que não os apresentaram. Já TABERNERO et al. (1996), DRACH et al. (1998), SCHULTHEIS et al. (1999) e AVET-LOISEAU et al. (1999) aparentemente não avaliaram o significado prognóstico destas anormalidades cromossômicas em seus estudos, o que dificultou a comparação dos nossos resultados. Assim, julgamos que estudos adicionais se fazem necessários para que se possa estabelecer o impacto das anormalidades numéricas do cromossomo 17 na sobrevida de pacientes com a doença.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com o número de genes p53 observamos que cópias adicionais e deleções do gene estiveram presentes em um contingente considerável de pacientes.

As cópias adicionais do gene foram identificadas em cerca de 30% dos pacientes da nossa amostra. Estas frequências foram maiores do que as observadas por DRACH et al. (1998), AVET-LOISEAU et al. (1999) e KÖNIGSBERG et al. (2000), que as identificaram em cerca de 10% dos pacientes de suas casuísticas. Entretanto, em cerca de um terço dos nossos pacientes, que apresentaram as cópias adicionais do gene em nosso estudo, estas foram identificadas em número pouco expressivo de núcleos interfásicos. Assim, é possível que possam ser considerados como indivíduos normais.

A distribuição dos nossos pacientes de acordo com o número de cópias do gene p53 e a probabilidade de sobrevida global mostrou que as cópias adicionais do gene não influenciaram a sobrevida dos pacientes. Resultado semelhante foi observado por KÖNIGSBERG et al. (2000). Já DRACH et al. (1998) e AVET-LOISEAU et al. (1999) aparentemente não avaliaram o significado prognóstico desta anormalidade em seus estudos. Assim, julgamos que estudos adicionais se fazem necessários para que se

possa estabelecer o impacto das cópias adicionais do gene p53 na sobrevida de pacientes com a doença.

As deleções do gene p53, predominantemente monoalélicas, foram observadas em cerca de 16% dos pacientes do nosso estudo. Resultados similares foram observados por AVET-LOISEAU et al. (1999) e SCHULTHEIS et al. (1999). Apenas CARLEBACH et al. (2000) não identificaram as deleções do gene em 16 pacientes com MM. Entretanto, o número de pacientes incluídos neste estudo pode não ter sido suficiente para identificar eventos com pequena frequência de ocorrência. Por outro lado, frequência maior da deleção do gene, cerca de 55%, foi observada por DRACH et al. (1998).

Não há razões óbvias para explicar as diferenças de frequências de identificação desta anormalidade nos vários estudos. Todos os autores analisaram pacientes diagnosticados pelos mesmos critérios e classificados pelo mesmo sistema de estadiamento (DURIE & SALMON, 1975). Também não nos pareceu que diferenças clínicas significativas caracterizaram os grupos de pacientes avaliados.

Uma possibilidade, aventada por AVET-LOISEAU et al. (1999), considerou a origem étnica dos pacientes estudados. Entretanto, apenas nós analisamos pacientes brasileiros; os outros estudos foram realizados com pacientes europeus. Embora inegável a heterogeneidade étnica da população brasileira (ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001), esta não nos pareceu uma explicação plausível para explicar as diferenças obtidas nos estudos como um todo.

As diferenças de frequências da deleção do gene também não puderam ser atribuídas aos tipos de sondas utilizadas para a identificação do gene, uma vez que a mesma sonda (Vysis, Inc.) foi utilizada em todos os estudos. Também não puderam ser explicadas por eventuais problemas técnicos durante a realização dos procedimentos do método FISH, uma vez que resultados similares foram obtidos em controles de todos os estudos.

Assim, só nos foi possível concluir que identificamos a deleção do gene p53 com as frequências observadas pela maioria dos autores que avaliaram esta anormalidade na doença.



Não observamos em nosso estudo diferenças entre as frequências da deleção do gene em pacientes de acordo com o estádios da doença. Embora DRACH et al. (1998) tenham identificado as maiores frequências da deleção do gene em pacientes do estágio III, AVET LOISEAU et al. (1999), na avaliação apenas de pacientes do estágio III, identificaram a anormalidade com frequência semelhante à por nós obtida.

Também não observamos diferenças nas frequências da anormalidade em pacientes avaliados ao diagnóstico ou durante a progressão da doença, em desacordo apenas com DRACH et al (1998) que foram os únicos a avaliar este aspecto e uma vez mais as diferenças entre os resultados obtidos dois estudos permanece sem explicação.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com a presença e a ausência da deleção do gene p53 e a sobrevida global, observamos que a anormalidade gênica teve grande impacto na sobrevida dos pacientes. Os com a deleção do gene apresentaram a mediana de sobrevida e a probabilidade de sobrevida global menores do que os que não apresentaram a deleção. DRACH et al (1998) obtiveram os mesmos resultados na avaliação de seus pacientes. Também KÖNISGSBERG et al. (2000) observaram uma forte correlação entre a deleção do gene p53 com a sobrevida global dos seus pacientes. Entretanto, eles avaliaram a anormalidade gênica em associação a outros fatores com importância prognóstica, o que dificultou a sua avaliação como fator prognóstico independente.

Assim, os nossos resultados e os obtidos por DRACH et al. (1998) indicaram que a deleção do gene p53 não é um evento universal no MM, mas parece limitado a um grupo de pacientes com um prognóstico particularmente desfavorável. Entretanto, estudos com casuísticas maiores se fazem necessários para a definição das frequências de ocorrência da anormalidade e para a confirmação do seu significado prognóstico.

A distribuição dos nossos casos de acordo com as anormalidades do gene p53 identificadas por meio do estudo molecular, mostrou que polimorfismos do gene estiveram presentes em cerca de 17% dos pacientes e que nenhuma mutação do gene pôde ser identificada.

Os polimorfismos identificados nos éxons 4 e 6 do gene p53 foram anteriormente descritos por BUCHMAN et al. (1988) e BATHIA et al. (1992), respectivamente. A anormalidade observada no éxon 4 (códon 72), que causa a substituição de uma arginina por uma prolina, está correlacionada com um sítio variável de Bgl II na região do íntron 1. Não há evidência até o momento, de que estas variantes da proteína p53, poderiam estar ligadas à malignidade da doença (BUCHMAN et al., 1988, PIGNON et al., 1994; MELO, 1998).

O polimorfismo observado no éxon 6 (códon 213) não ocasionou a substituição do aminoácido arginina e também não determinou anormalidades na função da proteína p53 e (BATHIA et al., 1992; PIGNON et al., 1994) e já foi descrito em pacientes com MM (OWEN et al., 1997).

A anormalidade no íntron 6 do gene p53 foi identificada em um único paciente do estudo e por análises do seqüenciamento direto, concluímos que a alteração intrônica é um polimorfismo, localizada perto da região de *splicing* do RNA mensageiro. O seqüenciamento do cDNA sugeriu que não houve comprometimento do processamento do RNA, porém, somente através de estudos funcionais seria possível determinar anormalidades que comprometessem a função da proteína.

Em nosso conhecimento o polimorfismo no éxon 4 e no íntron 6 estão sendo descritos pela primeira vez, em pacientes com MM.

A presença de polimorfismos no gene p53 confirma a sensibilidade da técnica utilizada para a identificação de anormalidades do gene, tornando menos possível o fato de que o método de rastreamento por PCR-SSCP possa não ter sido adequado para identificar as mutações.

Por outro lado, PREUDHOMME et al. (1992) investigaram mutações no gene p53 em pacientes com MM empregando a mesma metodologia de rastreamento por nós utilizada. Excluiu de sua análise todos os pacientes com porcentagens de plasmócitos na MO menor do que 10%, tendo como a base a afirmação de que o método de SSCP só é sensível para detectar anormalidades gênicas em amostras de DNA contendo aproximadamente 10% de células malignas (SUZUKI et al., 1990). Em nosso estudo, cerca de 75% dos pacientes que tiveram o número de plasmócitos na MO analisados,

apresentaram porcentagens de plasmócitos na MO, maior ou igual à 10%, enquanto que os 25% restantes, os apresentaram em porcentagens menores do que 10%. Desta forma, a maioria dos pacientes estudados apresentaram porcentagens de plasmócitos suficientes para a realização segura do método. Entretanto, como as porcentagens de plasmócitos não foram adequadas em todas as amostras do estudo, não nos foi possível afirmar com certeza, que as mutações do gene estiveram ausentes mas, se presentes, constituíram eventos de pequena frequência em nossos pacientes com a doença.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que as mutações somáticas nos éxons 5 a 9 do gene p53 foram observados com frequências pequenas em pacientes com MM (0,0% a 10,0%) (OWEN et al., 1997; PHEUDHOMME et al., 1992; CORRADINI et al., 1994). Apenas NERI et al. (1993) e PORTIER et al. (1992) observaram frequências discretamente maiores de mutações no gene p53 em pacientes com a doença, 13,0% e 20,0%, respectivamente e principalmente, naqueles com estágio avançado da doença ou leucemia plasmocitária.

Os resultados dos estudos em conjunto indicaram que as mutações do gene p53 constituem eventos pouco freqüentes na doença e parecem portanto, de valor limitado como indicador de prognóstico.

Vale ainda a pena comentar que em todos os pacientes que apresentaram a deleção do gene p53, porcentagens de plasmócitos maiores do que do que 10,0% (média±DP: 42,6±28,0; mediana: 34,5) foram identificadas. Assim, para estes casos, podemos afirmar com segurança que as mutações do alelo residual não ocorreram.

Frente a esta constatação, uma questão permanece a ser discutida. Como é que apenas a deleção monoalélica do gene p53 pode ter influenciado a sobrevida dos pacientes do nosso estudo.

Sendo o gene p53 um supressor tumoral, é necessário que ocorra a perda ampla de sua função por deleção ou mutação, para que este tenha efeito biológico em pacientes com a doença.

Em casos de deleções, o segundo alelo deveria estar inativado para suprir a atividade p53, como demonstrado em leucemia linfóide crônica de origem B, por



DOHNER et al. (1995). Uma vez que deleções bialélicas foram infreqüentes em nosso estudo e que as mutações no alelo residual não foram identificadas, não nos foi possível integrar o papel destas perdas gênicas monoalélicas na evolução dos nossos casos de MM.

## **CONCLUSÕES**

As anormalidades numéricas do cromossomo 17, identificadas por meio da análise citogenética convencional, constituíram eventos de baixa frequência em nosso estudo e não influenciaram a probabilidade de sobrevida global de nossos pacientes com MM.

O método FISH possibilitou a identificação de anormalidades numéricas do cromossomo 17 em cerca de um terço do número de casos incluídos no estudo, indicando que ganhos e perdas deste cromossomo parecem eventos relativamente comuns em pacientes com MM. Entretanto, estas anormalidades cromossômicas não influenciaram a probabilidade de sobrevida global de nossos pacientes.

As cópias adicionais do gene p53 foram identificadas, por meio do método FISH, em cerca de um terço do número de casos do estudo mas, também não influenciaram a probabilidade de sobrevida global de nossos pacientes com MM.

As mutações do gene p53 não foram identificadas em qualquer dos pacientes com MM incluídos no estudo, e conseqüentemente não exerceu impacto na sobrevida global destes pacientes.

A deleção do gene p53 foi identificada em cerca de 16% dos pacientes do estudo. O grupo de pacientes com a anormalidade gênica apresentou uma mediana de sobrevida global e uma probabilidade de sobrevida global menores do que as observadas naqueles que não apresentaram a deleção do gene. Assim, foi considerada um fator preditivo de sobrevida curta para os pacientes com MM avaliados.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- ALTMAN, D.G. – Analysis of survival times. In: \_\_\_\_\_. **Practical Statistics for Medical Research**. London, Chapman & Hall, 1991a. p.152-177.
- ALTMAN, D.G. – Comparing groups-categorical data. In: \_\_\_\_\_. **Practical Statistics for Medical Research**. London, Chapman & Hall, 1991b. p. 229-272.
- ALTMAN, D.G. – Principles of statistical analysis. In: \_\_\_\_\_. **Practical Statistics for Medical Research**. London, Chapman & Hall, 1991c. p.365-394.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.D.; GUIMARAES, P.E.M. – The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 444-461, 2000.
- ANASTASI, J.; LE BEAU, M.M.; VARDIMAN, J.W.; WESTBROOK, C.A. – Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. **Am. J. Pathol.**, **136**: 131- 139, 1990.
- AVET-LOISEAU, H.; YONG LI, J.Y.; GODON, C.; MORINEAU, N.; DAVIET, A.; HAROUSSEAU, J.L.; FACON, T.; BATAILLE, R. – P53 deletions is not a frequent event in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **106**(3): 717-719, 1999.
- AVET-LOISEAU, H.; YONG LI, J.Y.; FACON, T.; BRIGAUDEAU, C.; MORINEAU, N.; MALOISEL, F.; RAPP, M.J.; TALMANT, P.; TRIMOREAU, F.; JACCARD, A.; HAROUSSEAU, J.L.; BATAILLE, R. – High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. **Cancer Res.**, **58**: 5640-5645, 1998.
- AVIGAD, S.; BAREL, D.; BLAU, O.; MALKA, A.; ZOLDAN, M.; MOR, C.; FOGEL, M.; COHEN, I.J.; STARK, B.; GOSHEN, Y.; STEIN, J.; ZAIZOV, R. – A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies, **Oncogene**, **14**(13): 1541-1545, 1997.

- BARLOGIE, B.; EPSTEIN, J.; SELVANAYAGAM, P.; ALEXANIAN, R. – Plasma cell myeloma-new biological insights and advances in therapy. **Blood**, **73**: 865-879, 1989.
- BARLOGIE, B.; SHAUGHNESSY, J.; MUNSHI, N.; EPSTEIN, J. – Plasma Cell Myeloma. In: Beutler, E.; Lichtman, M.A.; Collier, B.S.; Kipps, T.J.; Seligsohn, U. – **Hematology**. 6.ed. New York, McGraw-Hill, 2001. p. 1279-1304.
- BARLOGIE, B., SMITH, L., ALEXANIAN, R. – Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. **New Engl. J. Med.**, **310**: 1353-1359, 1984.
- BATAILLE, R.; BOCCADORO, M.; KLEIN, B.; DURIE, B.; PILERI, A. – C-reactive protein and  $\beta$ -2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. **Blood**, **80**(3): 733-737, 1994.
- BATHIA, K.; GUTIERREZ, M.I.; HUPPI, K.; MAGRATH, I.T. – PCR detection of a neutral CGA/CGG dimorphism in exon 6 of the human p53 gene. **Nucleic Acids Res.**, **20**: 1432, 1992.
- BERENSON, J.R. – Etiology of multiple myeloma. What's new. **Semin. Oncol.**, **26**(5): 2-9, 1999.
- BERGSAGEL, D.E. – Plasma Cell Myeloma. In: Williams, W.J.; Beutler, E.; Erslev, A.J.; Lichtman, M.A. – **Hematology**. 4.ed. New York, McGraw-Hill, 1990. p. 1114-1141.
- BRIGAUDEAU, C.; GACHARD, N.; CLAY, D.; FIXE, P.; ROUZIER, E.; PRALORAN, V. – A miniaturized method for the karyotype analysis of bone marrow or blood samples in hematological malignancies. **Hematol. Cell Ther.**, **38**: 275-277, 1996.

- BRIGAUDEAU, C.; TRIMOREAU, F.; GACHARD, N.; ROUZIER, E.; JACCARD, A.; BORDESSOULE, D.; PRALORAN, V. – Cytogenetic study of 30 patients with multiple myeloma: comparison of 3 and 6 day bone marrow cultures stimulated or not with cytokines by using a miniaturized karyotype method. **Br. J. Haematol.**, **96**(3): 594-600, 1997.
- BOCCADORO, M. & PILERI, A. – Diagnosis, prognosis and standard treatment of multiple myeloma. In: Barlogie, B. - **Hematology/Oncology Clinics of North America: Multiple Myeloma**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997. p. 111-131.
- BROWN, R.D.; POPE, B.; LUO, X.F.; GIBSON, J.; JOSHUA, D. – The oncoprotein phenotype of plasma cells from patients with multiple myeloma. **Leuk. Lymph.**, **16**: 147-156, 1994.
- BUCHMAN, V.J.; CHUMAKOV, P.M.; NINKINA, N.N.; SAMARINA, O.P.; GEORGIIIEV, G.P. – A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. **Gene**, **70**: 245-252, 1988.
- CALASANZ, M.J.; CIGUDOSA, J.C.; ODERO, M.D.; FERREIRA, C.; ANDANAZ, M.T.; FRAILE, A.; CARRASCO, J.L.; SOLÉ, F.; CUESTA, B.; GULLON, A. – Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. **Genes Chromosome Cancer**, **18**: 84-93, 1997.
- CARLEBACH, M.; AMIEL, A.; GABER, H.; RADNAY, J.; MANOR, Y.; FEJGIN, M.; LISHNER, M. – Múltiple myeloma: monoallelic deletions of the tumor supresor genes TP53 and RB1 in long-term follow-up. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **117**: 5-60, 2000.

- CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. – The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, **68**: 281-286, 2001.
- CARSON, D.A.; LOIS, A. – Cancer progressuion and p53. **Lancet**, **346**: 1009-1011, 1995.
- CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. – Implications of the p53 tumor suppressor gene in clinical oncology. **J. Clin. Oncol.**, **13**(4): 1009-1022, 1995.
- CHANG, H.; BOUMAN, D.; BOERKOEL, C.F.; STEWART, A.K.; SQUIRE, J.A. – Frequent monoallelic loss of D13S319 in multiple myeloma patients shown by interphase fluorescence in situ hybridization. **Leukemia**, **13**: 105-109, 1999.
- CHEUNG, W.C.; VAN NESS, B. – The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response *in vitro*. **Leukemia**, **15**: 264-271, 2001.
- CLAMP, J. R. – Some aspects of the first recorded case of multiple myeloma. **Lancet**, **2**: 1354-1355, 1967.
- CORRADINI, P.; INGHIRAMI, G.; ASTOLF, M.; LADETTO, M.; VOENA, C.; BALLERINI, P.; GU, W.; NILSSON, K.; KNOWLES, D.M.; BOCCADORO, M.; PILERI, A.; DALLA-FAVERA, R. – Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and RB1, in plasma cell dyscrasias. **Leukemia**, **8**(5): 758-767, 1994.
- COTTON, R.G.H. & SCRIVER, C.R. – Proof of “Disease Causing” mutation. **Hum. Mutation**, **12**: 1-3, 1998.
- DAVIES, F.E.; JACK, A.S.; MORGAN G.J. – The use of biological variables to predict outcome in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **99**(4): 719-725, 1997.



- DRACH, J.; ACKERMAN, J.; FRITZ, E.; KROMER, E.; SCHUSTER, R.; GISSLINGER, H.; DESANTIS, M.; ZOJER, N.; FIEGL, M.; ROKA, S.; SCHUSTER, J.; HEINZ, R.; LUDWIG, H.; HUBER, H. – Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. **Blood**, **92**(3): 802-809, 1998.
- DRACH, J.; SCHUSTER, J.; NOWOTNY, H.; ANGERLER, J.; ROSENTHAL, F.; FIEGL, M.; ROTTHERMUNDT, C.; GSUR, A.; JAGER, U.; HEINZ, R.; LECHNER, K.; LUDWIG, H.; HUBER, H. – Multiple myeloma: High incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. **Cancer Res.**, **55**: 3854 - 3859, 1995.
- DEWALD, G.W.; KYLE, R.A.; HICKS, G.A.; GREIPP, P.R. – The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. **Blood**, **66**(2): 380-390, 1985.
- DOHNER, H.; FISCHER, K.; BENTZ, M.; HANSEN, K.; BENNER, A.; CABOT, G.; DIEHL, D.; SCHLENK, R.; COY, J.; STILGENBAUER, S.; VOLKMANN, M.; GALLE, P.R.; POUSTKA, A.; HUNSTEIN, W.; LICHTER, P. – p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs on chronic B-cell leukemias. **Blood**, **85**: 1580-1589, 1995.
- DREWINKO, B.; ALEXANIAN, R.; BOYER, H.; BARLOGIE, B.; RUBINOW, S.I. – The growth fraction of human myeloma cells. **Blood**, **57**(2): 333-338, 1981.
- DURIE, B.G.M. & SALMON, S.E. – A clinical staging system for multiple myeloma. **Cancer**, **36**:842-854, 1975.
- DURIE, B.G.M. – Cellular and molecular genetic features of myeloma and related disorders. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, **6**(2): 463-477, 1992.

- EL-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCO; LEVY, D.B.; PARSONS, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. – WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, **75**: 817-825, 1993.
- FACON, T.; LAI, L.; NATAF, E.; PREUDHOMME, C.; ZANDECKI, M.; HAMMAD, E.; WATTEL, E.; JOUET, J. P.; BAUTERS, F. – Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients. **Br. J. Hematol.**, **83**: 743-745, 1993.
- FEINMAN, R.; SAWYER, J.; HARDIN, J.; TRICOT, G. – Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. In: Barlogie, B. – **Hematology/Oncology Clinics of North America: Multiple Myeloma**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997. p. 1-25.
- FENAUX, P. The clinical significance of mutations of the p53 tumour suppressor gene in haematological malignancies. **Br. J. Haematol.**, **98**: 502-511, 1997.
- FFRENCE, M.; FFRENCE, P.; REMY, F.; CHAPUIS-CELLIER, C.; WOLOWIEC, D.; VILLE, D.; BRYON, P.A. – Plasma cell proliferation in monoclonal gammopathy: Relations with other biologic variables-diagnostic and prognostic significance. **Am. J. Med.**, **98**(1): 60-66, 1995.
- FREBOURG, T.; FRIEND, S.H. – Cancer risks from germline p53 mutations. **J. Clin. Invest.**, **90**: 1637-1641, 1992.
- GREIPP, P.R.; LUST, J.A.; O'FALLON, W.M.; KATZMANN, J.; WITZIG, T.; KYLE, R. – Plasma cell labeling index and  $\beta$ -2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and c-reactive protein in multiple myeloma. **Blood**, **81**: 3382-3387, 1993.
- GOLDSTEIN, B. D. & STUART, L. S. – The causal relation between exposure and multiple myeloma. **Blood**, **95**(4): 1512-1513, 2000.

- GOULD, J.; ALEXANIAN, R.; GOODACRE, A.; PATHAK, S.; HECHT, B.; BARLOGIE, B. – Plasma cell karyotype in multiple myeloma. **Blood**, **71**(2): 453-456, 1988.
- HAFERLACH, T. & LOFFLER, H. – Prognostic factors in multiple myeloma: practicability and future perspectives. **Leukemia**, **11**(suppl): S5-S9, 1997.
- HALLEK, M.; LEIF BERGSAGEL, P.; ANDERSON, K.C. – Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. **Blood**, **91**(1): 3-21, 1998.
- HARRIS, C.C. & HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N. Engl. J. Med.**, **329**(18):1318-1327, 1993.
- HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C.C. – P53 mutations in human cancers. **Science**, **250**: 113-116, 1991.
- IMAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H.P. – P 53 in hematologic malignancies. **Blood**, **84**(8): 2412-2421, 1994.
- JOSHUA, D.E.; GIBSON, J.; BROWN, R.D. – Mechanisms of the escape phase of myeloma. **Blood Rev.**, **8**: 13-20, 1994.
- JUVEN, T.; BARAK, Y.; ZAUBERMAN, A.; GEORGE, D.L.; OREN, M. – Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. **Oncogene**, **8**(12): 3411-3416, 1993.
- KASTAN, M.B.; ZHAN, Q.; EL-DEIRY, W.S.; CARRIER, F.; JACKS, T.; WALSH, W.V.; PLUNKETT, B.S.; VOGELSTEIN, B.; FORNACE, A.J. – A mamalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and gaad45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell**, **71**: 587-597, 1992.
- KLEIN, B.; ZHANG, X.G.; JOURDAN, M.; CONTENT, J.; HOUSSIAU, F.; AARDEN, L.; PIECHACZYK, M.; BATAILLE, R. – Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. **Blood**, **73**: 517-526, 1989.

- KNUDSON, A.C. – Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **5**: 143-159, 1992.
- KÖNISBERG, R.; ZOJER, N.; ACKERMANN, J.; KRÖMER, E.; KITLER, H.; FRITZ, E.; KAUFMAN, H.; NÖSLINGER, T.; RIEDL, L.; GISSLINGER, H.; JÄGER, U.; SIMONITSCH, I.; HEINZ, R.; LUDWIG, H.; HUBER, H.; DRACH, J. – Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. **J. Clin. Oncol.**, **18**: 804-812, 2000.
- LAI, M.Y.; CHANG, H.C.; LI, H.P.; KU, C.K.; CHEN, P.J.; SHEU, J.C.; HUANG, G.T.; LEE, P.H.; CHEN, D.S. – Splicing mutations of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, **53**(7): 1653-1656, 1993.
- LAI, J.L.; ZANDECKI, M.; MARY, J.Y.; BERNARDI, F.; IZYDORCZYK, V.; FLACTIF, M.; MOREL, P.; JOUET, J.P.; BAUTERS, F.; FACON, T. – Improved cytogenetics in multiple myeloma: A study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. **Blood**, **85**: 2490-2497, 1995.
- LANE, D.P. & CRAWFORD, L.V. – T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, **278**: 261-263, 1979.
- LAVERDIERI, M.; BEAUDOIN, J.; LAVIGUEUR, A. – species-specific regulation of alternative splicing in the C-terminal region of the p53 tumor suppressor gene. **Nucleic Acids Res.**, **28**(6): 1489-1497, 2000.
- LEVINE, A.J. – The tumor suppressor genes. **Annu. Res. Biochem.**, **62**: 623-651, 1993.
- LEVINE, A.J. – Tumor suppressor genes. **Scient. Am. Sci. Med.**, **2**: 28-37, 1995.

- LEVINE, A.J.; CHANG, A.; DITTMER, D.; NOTTERMAN, D. A.; SILVER, A.; THORN, K.; WELSH, D.; WU, M. – The p53 tumor suppressor gene. **J. Lab. Clin. Med.**, **123**: 817-823, 1994.
- LORAND, I. G. H.; SOUZA, C. A.; COSTA, F. F. – Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. **Lancet**, **1**: 404, 1984.
- MAY, P.; MAY, E. – Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, **18**: 7621-7636, 1999.
- MECUCCI, C.; FALZETTI, D.; LA STARZA, R. – Metaphase FISH, microdissection, and multicolour FISH: applications in Haematology. **Haematologica**, **84**: 98-101, 1999.
- MEDEIROS, C. R. – Plasmócitos e Doenças Correlatas. In: Zago, M. A.; Falcão, R. P.; Pasquini, R. – **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo, Editora Atheneu. 2001, p. 677-688.
- MELO, M.B. – Mutações nos genes supressores de tumores p53 e RB1 em leucemias agudas. Tese de doutoramento apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 1998.
- MITELMAN, ISCN 1995 - **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel, Karger. 1995.
- MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; WANG, H.G.; LIN, H.K.; LIEBERMANN, D.A.; HOFFMAN, B.; REED, J.C. – Tumor supressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, **9**(6): 1799-1805, 1994.
- MIYASHITA, T. & REED, J.C. – Tumor supressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, **80**: 293-299, 1995.

- NERI, A.; BALDINI, L.; TRECCA, D.; CRO, L.; POLLI, E.; MAIOLO, A. T. – P53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advance of malignancy. **Blood**, **81**: 128-135, 1993.
- NILSSON, K.; JERNBERG, H.; PETTERSSON, M. – IL-6 as a growth factor for human multiple myeloma cells - a short overview. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **166**: 3-12, 1990.
- NISHIDA, K.; TAMURA, A.; NAKAZAWA, N.; UEDA, Y.; ABE, T.; MATSUDA, F.; KASHIMA, K.; TANIWAKI, M. – The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by in situ hybridization. **Blood**, **90**(2): 526-534, 1997.
- OLIIKAINEN, H.; SYRJANEN, S.; KOSKELA, K.; PELLINIEMI, T.T.; PULKKI, K. – Pp53 gene mutations are rare in patients but common in patient-originating cell lines in multiple myeloma. – **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **57**: 281-290, 1997.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANASAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. – Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation-polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 2766-2770, 1989a.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. – Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, **5**: 874-879, 1989b.
- OWEN, R.G.; DAVIS, S.A.A.; RANDERSON, J.; RAWSTRON, A.C.; DAVIS, F.; CHILD, J.A.; JACK, A.S. – P53 gene mutations in multiple myeloma. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, **50**: 18-20, 1997.

- PEREZ-SIMON, J.A.; GARCIA-SANZ, R.; TABERNERO, M.D.; ALMEIDA, J.; GONZALEZ, M.; FERNANDEZ-CALVO, J.; MORO, M.J.; HERNANDEZ, J.M.; SAN MIGUEL, J.F.; ORFAO, A. – Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. **Blood**, **91**(9): 3366-3371, 1998.
- PIRRE, R.V.; HOAGLAND, H.C. – Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosomes from human bone marrow cells with aging. **Cancer**, **30**:889-892, 1972.
- PIGNON, J.M.; VINATIERI, I.; FANEN, P.; JONVEAUX, P.; TOURNILHAC, O.; IMBERT, M.; ROCHANT, H.; GOOSSENS, M. – Exhaustive analysis of the p53 gene coding sequence by denaturing gradient gel electrophoresis: application to the detection of point mutations in acute leukemias. **Hum. Mutation**, **3**: 126-132, 1994.
- PODDIGHE, P.J.; MOESTER, O.; SMEETS, D.; AWWARD, B.W.; RAMAEKERS, F.C. S.; HOPMAN, A.H.N. – Interphase cytogenetic of hematological cancer. Comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. **Cancer Res.**, **51**: 1959-1967, 1991.
- PORTIER, M.; MOLÈS, J.P.; MAZARS, G.R.; JEANTEUR, P.; BATAILLE, R.; KLEIN, B.; THEILLET, C. – P53 and RAS mutations in multiple myeloma. **Oncogene**, **7**: 2539-2543, 1992.
- PREUDHOMME, C.; FACON, T.; ZANDECKI, M.; VANRUMBEKE, M.; LUC LAI, J.; NATAF, E.; LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.; KERCHAERT, J.P.; FENAUX, P. – Rare occurrence of p53 gene mutations in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **81**: 440-443, 1992.
- QUEIROZ, M. L. S.; BINCOLETO, C.; PERLINGEIRO, R. C. R.; SOUZA, C. A.; TOLEDO, H. – Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. **Human Exp. Toxicol.**, **16**: 322-326, 1997.



- RUIZ, M. A.; AUGUSTO, L. G. S.; VASSALLO, J.; VIGORITO, A. C.; LORAND-METZE, I.; SOUZA, C. A. – Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents. **Pathol. Res. Pract.**, **190**: 151-154, 1994.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. – Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **23**: 1350-1354, 1985.
- SALMON, S.E. & CASSADY, J.R. – Plasma Cell Neoplasm. In: \_\_\_\_\_. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1993. p.1984-2025.
- SAMESHIMA, Y.; AKIYAMA, T.; MORI, N.; MIZOGUCHI, H.; TOYOSHIMA, K.; SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOKOTA, J. – Point mutation of the p53 gene resulting in splicing inhibition in small cell lung carcinoma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **173**(2): 697-703, 1990.
- SANCHEZ, Y. & ELLEDGE, S.J. – Stopped for repairs. **Bioessays**, **17**(6): 545-548, 1995.
- SAN MIGUEL, J.F.; GARCIA-SANZ, M.; GONZALEZ, M.J.; MORO, M.J.; HERNANDEZ, J.M.; ORTEGA, F.; BORREGO, D.; CARNERO, M.; CASANOVA, F.; JIMENEZ, R.; PORTERO, J.A.; ORFÃO, A. – A new stage system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. **Blood**, **85**(2): 448-455, 1995.
- SAWYER, J.R.; WALDRON, J.A.; JAGANNATH, S.; BARLOGIE, B. – Cytogenetic finding in 200 patients with multiple myeloma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **82**: 41-49, 1995.
- SCHULTHEIS, B.; KRAMER, A.; WILLER, A.; HEGENBART, U.; GOLDSCHMIDT, H.; HEHLMANN, R. – Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. **Leukemia**, **13**(12): 2099-2103, 1999.



- SEONG, C.; DELASALLE, K.; HAYES, K.; WEBER, D.; DIMOPOULOS, M.; SWANTKOWSKI, J.; HUH, Y.; GLASSMAN, A.; CHAMPLIN, R.; ALEXANIAN, R. – Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, **101**(1): 189-194, 1998.
- SHIELDS, P. G. – Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. **J. Am. Med. Ass.**, **266**: 681-687, 1993.
- SIONOV, R.V.; HAUPT, Y. – The cellular response to p53: the decision between life and death. **Oncogene**, **18**: 6145-6157, 1999.
- SMADJA, N.V.; FRUCHART, C.; ISNARD, F.; LOUVET, C.; DUTEL, J.L.; CHEROAN, N.; GRANGE, M.J.; MONCONDUIT, M.; BASTARD, C. – Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. **Leukemia**, **12**(6): 960-969, 1998.
- SMADJA, N.V.; LOUVET, C.; ISNARD, F.; DUTEL, J.L.; GRANGE, M.J.; VARETTE, C.; KRULIK, M. – Cytogenetic study in multiple myeloma at diagnosis: comparison of two techniques. **Br. J. Haematol.**, **90**: 619-624, 1995.
- SOUSSI, T.; FROMENTEL, C.C.; MAY, P. – Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, **5**: 945-952, 1990.
- SUZUKI, Y.; ORITA, M.; SHIRAISHI, M.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. – Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. **Oncogene**, **5**: 1037, 1990.
- SWANSBURY, G.J. – Cytogenetic techniques for human leukemias. In: Pollard, J.W.; Walker, J.M. – **Methods in Molecular Biology**, vol 75. Totowa, NJ, Human Press Inc., 1997. p. 323-339.

- TABERNERO, D.; SAN MIGUEL, J.F.; GARCIA-SANZ, R.; NAJIRA, L.; GARCIA-ISIDORO, N.; PEREZ-SIMÓN, J.A.; GONZALEZ, M.; WIEGANT, J.; RAAP, A.K.; ORFÃO, A. – Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: Fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. **Am. J. Pathol.**, **149**: 153-161, 1996.
- TAKAHASHI, T.; D'AMICO, D.; CHIBA, I.; BUCHHAGEN, D.L.; MINNA, J.D. – Identification of intronic point mutation as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. **J. Clin. Invest.**, **86**(1): 363-369, 1990.
- TRICOT, G.; SAWYER, J.R.; JAGANNATH, S.; DESIKAN, K.R.; SIEGEL, D.; NAUCKE, S.; MATTOX, S.; BRACY, D.; MUNSHY, N.; BARLOGIE, B. – Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. **J. Clin. Oncol.**, **15**(7): 2659-2666, 1997.
- VERAS, R.P. – Brazil is getting older: demographic changes and epidemiological challenges. **Rev. Saúde Públ., São Paulo**, **25**(6): 476-488, 1991.
- ZAGO, M.A. – Mieloma Múltiplo: estudos citogenético e imunoquímico. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1975.
- ZANDECKI, M.; LAI, J.L.; FACON, T. – Multiple myeloma: Almost all patients are cytogenetically abnormal. **Br. J. Haematol.**, **94**(2): 217-227, 1996.
- ZOJER, N.; KONIGSBERG, R.; ACKERMANN, J.; FRITZ, E.; DALLINGER, S.; KROMER, E.; KAUFMANN, H.; RIEDL, L.; GISSLINGER, H.; SCHREIBER, S.; HEINS, R.; LUDWIG, H.; HUBER, H.; DRACH, J. – Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence. **Blood**, **95**(6): 1926-1930, 2000.

- WEH, H.J.; GUTENSOHN, K.; SELBACH, J.; KRUSE, R.; WACKER-BACKHAUS, G.; SEEGER, D.; FIEDLER, W.; FETT, W.; HOSSFELD, D.K – Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. **Eur. J. Cancer**, **29A**: 1269-1273, 1993.
- WILLEMS, P.M.W.; KUYPERS, A.W.H.M.; MEIJERINK, J.P.P.; HOLDRINET, R.S.G.; MENSINK, E.J.B.M. – Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees. **Leukemia**, **7**(7): 986-991, 1993.

***ANEXOS***

## **CrITÉRIOS diagnÓsticos para o mieloma mÚltiplo**

---

### **CrITÉRIOS maiores**

- I - plasmocitoma em biÓpsia de tecidos
- II - plasmocitose na medula Óssea: >30% de plasmÓcitos
- III - IgG >3,5g/dl ou IgA >2,0g/dl no soro; cadeias leve  $\kappa$  ou  $\lambda$   $\geq$ 1g/24hs na urina

### **CrITÉRIOS menores**

- A - plasmocitose na medula Óssea entre 10 a 30% do total de células
- B - imunoglobulina monoclonal presente em concentrações menores do que as citadas em critérios maiores
- C - lesões Ósseas líticas
- D - IgM <0,05g/dl, IgA <0,1g/dl ou IgG <0,6g/dl

O diagnÓstico do mieloma mÚltiplo requer no mÍnimo 1 critÉrio maior + 1 critÉrio menor ou pelo menos 3 critÉrios menores

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

*Anexo 1*

## **Critérios para o estadiamento do mieloma múltiplo**

---

### **Estádio I:**

Hb >10,0g/100 ml  
Calcio sérico  $\leq 12$  mg/100 ml  
lesões líticas ausentes ou plasmocitoma ósseo solitário  
componente monoclonal pequeno  
IgG <5 g/100 ml  
IgA <3 g/100 ml  
proteinúria monoclonal <4g/24hs

### **Estádio II**

situado entre estádios I e III

### **Estádio III**

Hb <8,5g/100 ml  
Ca sérico >12 mg/100 ml  
lesões ósseas líticas avançadas  
componente monoclonal acentuado  
IgG >7 g/100 ml  
IgA >5 g/100 ml  
proteinúria monoclonal >12g/24hs

### **Subclassificação**

A = função renal relativamente normal (valor de creatinina sérica < 2,0 mg/100 ml)

B = função renal anormal (valor de creatinina sérica  $\geq 2,0$  mg/100 ml)

---

Durie & Salmon (1975)



### Anexo 3

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

#### **“IDENTIFICAÇÃO DAS DELEÇÕES E MUTAÇÕES DO GENE p53 EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO”**

**Nome do paciente:**.....

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

**Endereço:**.....

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

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

**Endereço:**.....

Estou ciente de que para realizar o diagnóstico da minha doença ou de sua recaída, necessito ser submetido a punção de medula óssea. Este procedimento é realizado por meio de punção por agulha no osso esterno ou em osso da bacia. Trata-se de um procedimento de rápida duração (cerca de 5 minutos), cujo único efeito indesejável a ser considerado é a dor no local de punção, que é atenuada com anestesia local. Estou ciente que parte da amostra de medula óssea, colhida para o diagnóstico da minha doença ou a identificação de recaídas, será utilizada para a pesquisa de anormalidades cromossômicas e do gene p53 observadas na minha doença. Desta forma, estarei participando do estudo “Identificação das Deleções e mutações do Gene p53 em Pacientes com Mieloma Múltiplo”. Estou ciente de que o material obtido será utilizado apenas para esta pesquisa. Serei beneficiado com a realização da punção de medula óssea porque os resultados obtidos deste exame vão determinar o meu diagnóstico ou identificar as recaídas da doença. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver quaisquer dúvidas sobre o estudo



poderei procurar a Dra. Carmen Silvia Passos Lima no Hemocentro – UNICAMP, a rua Carlos Chagas no. 480, Campus da Cidade Universitária. CEP: 13081-970; Tel: 788 8740 e 788 8022; Fax: 788 8750.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Tel: 788 8936; Fax: 788 8925.

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

.....  
**Assinatura do paciente**

.....  
**Assinatura do responsável legal**

.....  
**Assinatura do pesquisador legal**  
**Dra. Carmen Silvia Passos Lima**  
**RG: 9675366**

*Anexo 3*

Dados relativos ao diagnóstico, a idade, ao sexo, ao estágio da doença e as datas do diagnóstico da doença e dos estudos citogenético e molecular dos 60 pacientes do estudo

Nº Caso	Paciente	Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo	Estádio	Data do diagnóstico	Data do estudo	Momento do estudo
1	C.A.A.	MM	34	M	IIIB	29/05/98	10/03/99	P
2	M.R.	MM	64	M	IIIA	22/02/99	16/03/99	D
3	B.B.M.	MM	49	M	IIIA	05/09/97	16/03/99	P
4	L.A.S.	MM	51	F	IIIA	23/03/99	23/03/99	D
5	S.M.S.	MM	63	F	IIIB	09/04/99	13/04/99	D
6	M.L.S.	MM	63	F	IIIA	15/04/99	16/04/99	D
7	J.F.M.	MM	53	M	IIIA	31/03/99	04/05/99	D
8	C.C.F.	LP	68	M	NR	22/04/98	17/05/99	P
9	T.T.	MM	53	F	IIA	18/05/99	18/05/99	D
10	N.V.	MM	53	M	IIA	26/02/96	26/05/99	P
11	O.A.S.F.	MM	70	M	IA	07/06/99	02/07/99	D
12	S.J.S.	MM	67	M	IIIA	04/05/99	28/05/99	D
13	A.P.C.	MM	70	M	IIIB	16/12/96	14/06/99	P
14	O.M.	MM	78	M	NR	07/11/97	25/06/99	P
15	R.T.S.G.	MM	42	F	IA	28/01/88	16/07/99	P
16	M.O.	MM	41	F	IIIA	15/10/97	21/07/99	P
17	J.L.S.	MM	69	M	IIIB	22/07/99	23/07/99	D
18	A.P.O.	MM	54	F	NR	20/07/99	23/07/99	D
19	P.S.P.	MM	69	M	IIIB	20/01/97	14/03/2000	P
20	M.C.	MM	73	M	IIIA	06/08/99	06/08/99	D
21	M.S.P.	MM	58	F	IIA	07/01/98	17/08/99	P
22	C.G.G.	MM	76	F	IIIA	25/07/99	26/08/99	D
23	S.A.M.	MM	43	F	IIIB	26/08/99	26/08/99	D
24	V.A.O.	MM	69	M	IIB	27/10/99	27/10/99	D
25	V.M.J.	MM	61	F	IIIB	26/03/99	01/09/99	D
26	J.C.S.	MM	58	F	NR	16/08/99	15/09/99	D
27	P.L.M.	MM	49	M	IA	21/09/99	21/09/99	D
28	J.C.R.	MM	51	M	IIIB	29/09/99	30/09/99	D
29	R.B.R.	MM	76	F	IIIA	09/03/93	30/09/99	P

Anexo 4

Continuação

30	J.S.P.	MM	60	F	NR	15/11/99	17/11/99	D
31	J.A.A.	MM	59	M	IIIB	23/02/2000	23/02/2000	D
32	J.P.S.	MM	53	F	IIIA	11/11/99	24/11/99	D
33	M.M.S.	MM	57	F	IA	17/12/90	24/11/99	P
34	O.P.	MM	29	M	IIIA	24/08/98	01/02/2000	P
35	M.A.S.D.	MM	43	F	IIA	12/11/99	04/02/2000	D
36	M.P.	MM	54	F	IIIA	20/03/98	08/02/2000	P
37	D.L.A.	MM	54	F	IA	29/02/2000	29/02/2000	D
38	E.A.M.F.	MM	46	M	IIA	13/04/98	14/03/2000	P
39	W.R.S.	MM	43	M	IIIA	21/02/95	06/07/2000	P
40	M.R.B.M.	MM	61	F	IA	22/03/2000	22/03/2000	D
41	A.O.L.	MM	48	F	IIA	17/05/2000	18/05/2000	D
42	W.R.M.	MM	46	M	IIB	19/04/2000	25/04/2000	D
43	M.T.S.M.	MM	63	F	IIIA	29/10/97	26/04/2000	P
44	I.S.S.	MM	56	F	IIB	26/04/2000	26/04/2000	D
45	V.R.	MM	49	M	NR	02/05/2000	02/05/2000	D
46	M.A.L.	MM	56	F	IIIA	08/05/2000	08/05/2000	D
47	P.L.	MM	61	M	IIA	24/09/91	09/05/2000	P
48	M.T.N.	MM	64	M	IIIA	30/06/2000	12/07/2000	D
49	M.M.	MM	43	M	IIIA	10/05/2000	26/07/2000	D
50	J.F.R.	MM	64	M	IIIA	28/01/97	26/07/2000	P
51	J.J.S.	MM	74	M	IIIB	16/08/2000	18/08/2000	D
52	J.P.S.	MM	77	M	IIIB	02/09/2000	01/10/2000	D
53	J.P.L.	MM	53	M	IIIB	13/03/2000	02/10/2000	D
54	G.A.P.M.	MM	60	F	IIA	24/04/98	03/10/2000	P
55	S.B.D.	MM	78	F	IIIA	05/10/2000	04/10/2000	D
56	A.L.A.	MM	53	F	IIA	19/08/92	17/10/2000	P
57	P.M.D.D.	MM	42	M	IIIA	16/11/2000	16/11/2000	D
58	P.B.F.	MM	44	M	IIIB	20/11/2000	20/11/2000	D
59	J.B.V.	MM	60	M	IIIA	01/10/2000	14/12/2000	D
60	F.C.B.	MM	79	F	IIIB	06/12/2000	12/12/2000	D

MM: mieloma múltiplo; M: masculino; F: feminino; LP: leucemia plasmocitária; NR: não realizado; D: ao diagnóstico; P: progressão da doença

Anexo 4

**Números de células mononucleares e tipos de culturas realizadas em amostras de medula óssea de 59 pacientes com mieloma múltiplo e de um paciente com leucemia plasmocitária**

<b>Número do caso</b>	<b>Número de células mononucleares/ml</b>	<b>Tipos de culturas</b>
1	14,3x10 <sup>6</sup>	não estimulada
2	6,8x10 <sup>6</sup>	não estimulada
3	5,0x10 <sup>6</sup>	não estimulada
4	1,8x10 <sup>6</sup>	não estimulada
5	2,2x10 <sup>6</sup>	não estimulada
6	17,3x10 <sup>6</sup>	não estimulada
7	2,3x10 <sup>6</sup>	não estimulada
8	10,2x10 <sup>6</sup>	não estimulada
9	MI	MI
10	2,7x10 <sup>6</sup>	não estimulada
11	12,2x10 <sup>6</sup>	não estimulada
12	6,2x10 <sup>6</sup>	não estimulada
13	77,7x10 <sup>6</sup>	não estimulada
14	80,6x10 <sup>6</sup>	não estimulada
15	6,0x10 <sup>6</sup>	não estimulada
16	14,8x10 <sup>6</sup>	não estimulada
17	32,5x10 <sup>6</sup>	não estimulada
18	19,1x10 <sup>6</sup>	não estimulada
19	6,0x10 <sup>6</sup>	estimulada
20	6,8x10 <sup>6</sup>	estimulada
21	5,28x10 <sup>6</sup>	estimulada
22	9,2x10 <sup>6</sup>	estimulada
23	33,7x10 <sup>6</sup>	não estimuladas
24	25,0x10 <sup>6</sup>	não estimulada; estimulada
25	20,4x10 <sup>6</sup>	não estimulada; estimulada
26	77,0x10 <sup>6</sup>	estimulada
27	8,1x10 <sup>6</sup>	estimulada
28	70,6x10 <sup>6</sup>	não estimulada; estimulada

*Anexo 5*

## Continuação

29	$3,5 \times 10^6$	estimulada
30	MI	MI
31	$130,1 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
32	$28,3 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
33	$17,8 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
34	$37,2 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
35	$16,0 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
36	$4,3 \times 10^6$	estimulada
37	$2,1 \times 10^6$	estimulada
38	$6,8 \times 10^6$	estimulada
39	$23,5 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
40	$5,6 \times 10^6$	estimulada
41	$30,8 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
42	$31,3 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
43	$24,4 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
44	$28,2 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
45	$34,5 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
46	$22,5 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
47	$23,9 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
48	$61,6 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
49	$12,6 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
50	$8,4 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
51	$9,3 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
52	$33,5 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
53	$13,8 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
54	$8,5 \times 10^6$	estimulada
55	$24,6 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
56	$16,1 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
57	$12,8 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
58	$22,0 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
59	$19,2 \times 10^6$	não estimulada; estimulada
60	$9,0 \times 10^6$	não estimulada; estimulada

MI: material inadequado

Anexo 5

**Tipos de culturas realizadas, números de metáfases analisadas e cariótipos obtidos em 59 pacientes com mieloma múltiplo e de um paciente com leucemia plasmocitária**

<b>Número do caso</b>	<b>Número de metáfases (anormal/total)</b>	<b>Cariótipo</b>
1	1 hiperdiploidia/75	46,XY
2	0/64	46,XY
3	9 hiperdiploidia/30	46,XY/69~92?XXYY,inc
4	1 hiperdiploidia/8	46,XX
5	1 hiperdiploidia/6	46,XX
6	5 hiperdiploidia/34	46,XX/69~92?XXXX,inc
7	0/0	NI
8	50 hiperdiploidia/53	56~59,XY, +1(2), +4(2), +6, +8, +12, -15, +17, +18(2), +19(2), +21(2)
9	MI	NI
10	0/0	NI
11	0/0	NI
12	0/0	NI
13	30 hiperdiploidia/60	56, XY, +1, +2, +3, +5, +6, +9, +10, +11, -15, +16, +17, +18, +20, -21
14	37 hiperdiploidia/67	46,XY/69~92?XXYY,inc
15	0/0	NI
16	0/12	46,XX
17	23 hipodiploidia/27	45,X0, -Y
18	2 hiperdiploidia/32	46,XX
19	0/0	NI
20	0/0	NI
21	0/0	NI
22	0/0	NI
23	0/50	46,XX
24	0/18	46,XY
25	0/20	46,XX
26	2 hiperdiploidia/30	46,XX
27	0/10	46,XY
28	2 hiperdiploidia/26	46,XY
29	13 hiperdiploidia/30	46,XX/69~92?XXXX,inc

Anexo 6

## Continuação

30	MI	NI
31	0/119	46,XY
32	0/34	46,XX
33	0/79	46,XX
34	0/63	46,XY
35	0/32	46,XX
36	0/30	46,XX
37	0/0	NI
38	0/0	NI
39	0/21	46,XY
40	3 hiperdiploidia/68	46,XX/69~92?XXXX,inc
41	2 hiperdiploidia/70	46,XX
42	2 hiperdiploidia/125	46,XY
43	2 hiperdiploidia/60	46,XX
44	1 hiperdiploidia/120	46,XX
45	0/0	NI
46	0/0	NI
47	3/104	46,XY/69~92?XXYY,inc
48	0/100	46,XY
49	0/44	46,XY
50	0/21	46,XY
51	55 hiperdiploidia/58	55~60,XY, +X, +1, +2, +4, +5, +6, del(6)q21, add(7)q36, -8, -10, +11, del(13)q14, +15, -17, -18, +19, +21, +22, +mar, nfa
52	0/0	NI
53	8 hiperdiploidias/77	46,XY/69~92?XXYY,inc
54	0/0	NI
55	0/0	NI
56	0/0	NI
57	0/55	46,XY
58	0/0	NI
59	0/12	46,XY
60	0/31	46,XX

MI: material inadequado; NI: não identificado; IL-6: interleucina 6; GM-CSF: fator estimulador do crescimento de células da linhagem granulocítica-monocítica; inc: incompleto

Anexo 6



**Distribuição dos 59 pacientes com mieloma múltiplo e um paciente com leucemia plasmocitária, de acordo com os números de sinais em núcleos interfásicos obtidos da avaliação dos centrômeros dos cromossomos 17 por meio do método FISH**

Número do caso	Centrômero do Cromossomo 17 (% células)				Classificação do paciente
	1 sinal	2 sinais	3 ou 4 sinais	Não informativas	
1	MI	MI	MI	MI	MI
2	4,5	78,5	6,5	10,5	Tetr
3	4,0	95,5	0,0	0,5	N
4	2,34	89,1	3,9	5,47	N
5	MI	MI	MI	MI	MI
6	6,0	85,5	7,0	1,5	Tetr
7	6,5	80,5	6,5	6,5	N
8	2,5	43,5	49,0	5,0	Tris
9	MI	MI	MI	MI	MI
10	6,0	82,5	9,5	2,0	Tris
11	7,0	87,5	3,5	2,0	N
12	5,5	89,0	2,5	3,0	N
13	4,5	82,0	13,5	0,0	Tris
14	8,0	78,5	9,5	4,0	Tris
15	3,5	90,0	3,5	2,0	N
16	13,5	86,0	0,5	0,0	M
17	2,5	92,0	0,5	5,0	N
18	5,0	91,5	2,0	1,5	N
19	MI	MI	MI	MI	MI
20	10,5	86,55	0,0	0,0	M
21	10,0	87,5	0,5	1,0	M
22	MI	MI	MI	MI	MI
23	5,0	95,0	0,0	0,0	N
24	5,0	95,0	0,0	0,0	N
25	10,0	89,0	0,5	0,0	M
26	3,0	92,5	4,0	0,5	N
27	3,0	96,5	0,5	0,0	N

*Anexo 7*

## Continuação

28	3,0	71,0	26,0	0,0	Tris
29	MI	MI	MI	MI	MI
30	MI	MI	MI	MI	MI
31	4,0	94,5	1,0	0,5	N
32	2,0	96,5	1,0	0,5	N
33	2,5	97,5	0,0	0,0	N
34	1,5	94,5	0,0	4,0	N
35	3,0	93,0	3,0	1,0	N
36	6,0	93,0	0,0	1,0	N
37	3,96	94,05	1,98	0,0	N
38	MI	MI	MI	MI	MI
39	1,80	98,18	0,0	0,0	N
40	2,40	96,99	0,0	0,6	N
41	6,0	91,5	0,0	2,5	N
42	1,0	99,0	0,0	0,0	N
43	3,5	96,5	0,0	0,0	N
44	0,5	71,5	25,0	3,10	Tetr
45	4,0	89,5	6,0	0,5	N
46	6,5	92,0	0,0	1,5	N
47	10,0	89,0	0,0	0,5	M
48	3,5	94,5	1,5	0,5	N
49	10,0	87,0	0,0	3,0	M
50	5,5	84,0	10,5	0,0	Tris
51	5,0	93,0	0,5	1,5	N
52	1,0	58,0	40,0	1,0	Tris
53	3,0	96,0	0,0	1,0	N
54	3,5	95,0	1,0	0,5	N
55	6,0	94,0	0,0	0,0	N
56	4,0	95,5	0,5	0,0	N
57	MI	MI	MI	MI	MI
58	5,0	95,0	0,0	0,0	N
59	4,0	85,5	0,5	10,0	N
60	3,0	93,5	0,0	3,5	N

MI: material inadequado; N: normal; M: monossomia do cromossomo 17;  
Tris: trissomia do cromossomo 17; Tetr: tetrassomia do cromossomo 17

Anexo 7

**Distribuição dos 59 pacientes com mieloma múltiplo e de um paciente com leucemia plasmocitária, de acordo com os números de sinais obtidos do estudo molecular dos loci do gene p53 por meio do método FISH**

Número do caso	Loci Gene p53					Classificação do paciente
	ausência de sinais	1 sinal	(% células) 2 sinais	3 ou 4 sinais	Não informativas	
1	MI	MI	MI	MI	MI	MI
2	1,5	6,0	74,0	8,0	10,5	4 cópias
3	2,5	5,5	91,5	0,0	0,5	N
4	5,47	17,18	72,68	0,0	5,47	Dhet
5	MI	MI	MI	MI	MI	MI
6	2,5	12,0	76,0	8,0	1,5	Dhet
7	1,0	8,5	76,5	7,5	6,5	3 cópias
8	0,5	3,5	57,5	33,5	5,0	3 cópias
9	MI	MI	MI	MI	MI	MI
10	2,0	5,5	83,0	7,5	2,0	3 cópias
11	1,0	3,0	92,5	1,5	2,0	N
12	1,5	5,0	89,0	1,5	3,0	N
13	0,0	12,0	83,5	4,5	0,0	Dhet
14	0,5	6,5	78,5	10,5	4,0	3 cópias
15	0,0	4,5	86,0	7,5	2,0	3 cópias
16	0,5	1,5	97,0	1,0	0,0	N
17	0,0	23,5	71,0	0,5	5,0	Dhet
18	0,0	2,5	93,0	3,0	1,5	N
19	MI	MI	MI	MI	MI	MI
20	0,0	5,13	91,23	3,62	0,0	N
21	0,0	28,0	69,5	1,5	1,0	Dhet
22	MI	MI	MI	MI	MI	MI
23	1,5	17,0	80,5	1,0	0,0	Dhet
24	0,0	5,5	93,0	1,5	0,0	N
25	0,0	7,0	91,5	1,5	0,0	N
26	0,0	3,0	88,0	8,5	0,5	3 cópias
27	0,0	3,0	95,5	1,5	0,0	N

*Anexo 8*

Continuação

28	0,0	2,0	72,0	26,0	0,0	3 cópias
29	MI	MI	MI	MI	MI	MI
30	MI	MI	MI	MI	MI	MI
31	0,0	3,5	95,5	0,5	0,5	N
32	0,0	3,0	95,0	1,5	0,5	N
33	0,0	4,0	96,0	0,0	0,0	N
34	0,0	2,0	94,0	0,0	4,0	N
35	0,0	2,5	88,0	8,5	1,0	3 cópias
36	0,0	4,0	95,0	0,0	1,0	N
37	0,0	7,92	91,1	0,99	0,0	N
38	MI	MI	MI	MI	MI	MI
39	0,0	1,8	98,18	0,0	0,0	N
40	0,0	1,20	97,00	1,20	0,6	N
41	0,0	5,5	91,5	0,5	2,5	N
42	0,0	3,5	96,5	0,0	0,0	N
43	0,0	5,0	95,0	0,0	0,0	N
44	0,0	0,0	72,0	25,0	3,10	4 cópias
45	0,0	4,5	86,5	8,5	0,5	3 cópias
46	1,5	20,5	76,5	0,0	1,5	Dhet
47	0,0	9,0	89,5	1,0	0,5	N
48	0,0	5,0	90,0	4,5	0,5	N
49	0,0	7,0	90,0	0,0	3,0	N
50	0,0	6,0	83,5	10,5	0,0	3 cópias
51	13,5	25,5	59,0	0,5	1,5	Dhom
52	0,0	1,5	74,0	23,5	1,0	3 cópias
53	0,0	4,0	93,5	1,5	1,0	N
54	0,0	4,0	93,0	2,5	0,5	N
55	0,0	5,5	94,5	0,0	0,0	N
56	0,0	4,0	95,0	1,0	0,0	N
57	MI	MI	MI	MI	MI	MI
58	0,0	7,5	92,5	0,0	0,0	N
59	0,0	6,0	84,0	0,0	10,0	N
60	0,0	3,5	93,0	0,0	3,5	N

MI, material inadequado; N; normal; Dhet: deleção heterozigótica; Dhom: deleção homozigótica

Anexo 8

## **PREDICTIVE ROLE OF P53 DELETION FOR SHORT SURVIVAL IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA**

Manoela M. Ortega, <sup>1</sup> Monica B. Melo, <sup>2</sup> Irene Lorand-Metze, <sup>1</sup> Cármino A. De Souza, <sup>1</sup>  
Fernando F. Costa, <sup>1</sup>, Carmen S. P. Lima <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Medicine and <sup>2</sup> Haematology and Haemotherapy Centre, State  
University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

**Running short title:** P53 deletion as a prognostic factor in multiple myeloma

Correspondence:

Carmen Silvia Passos Lima, MD, PhD

Hemocentro – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Caixa Postal 6198, Cep: 13083-970

Campinas, SP – Brazil

Phone: 55 19 3788-8729

Fax: 55 19 3788-8600

E-mail address: [carmenl@obelix.unicamp.br](mailto:carmenl@obelix.unicamp.br)

## ABSTRACT

The role of p53 gene mutations and deletions in the pathogenesis of multiple myeloma (MM) and their potential use as a prognostic indicator remains uncertain. To further define this question, we analysed 50 MM patients, predominantly with advanced disease and one patient with plasma cell leukaemia, by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and sequencing, to detect p53 mutations, and by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), with a DNA probe specific for the p53 locus, to detect p53 deletions. Mutations of the gene were absent in our patients. In contrast, deletions of p53, predominantly monoallelic, were detected in 15.7% of the patients. No correlation of p53 status with age, sex and stage of the disease was found. Similar frequencies of p53 deletion were observed in patients at diagnosis and at relapse of the disease. However, patients with a p53 deletion had significantly shorter median overall survival times compared with those without a deletion (7.5 vs 17.0 months, respectively;  $P= 0.05$ ). We concluded that p53 mutations seems to be a rare event in MM, even in patients with advanced disease, and may be seen as a prognostic indicator of limited value. In contrast, the p53 deletion was the unique important prognostic factor predicting short survival of MM patients.

**Keywords:** multiple myeloma, p53 mutation, p53 deletion, polymerase chain reaction, FISH

## INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a clonal B-cell neoplasia characterised by the accumulation in bone marrow of malignant plasma cells producing a monoclonal immunoglobulin and accompanied by a spectrum of clinical entities, including osteolytic lesions, impaired haemopoiesis, hypogammaglobulinemia and renal disease.

Recently, a working-model of a stepwise malignant transformation during MM pathogenesis was proposed including immortalised malignant clones, establishing a supportive environment in the bone marrow with a network of cytokines and adhesion molecules, and additional mutations resulting in malignant expansion, and finally, in stroma-independent growth and escape from the bone marrow micro-environment (Hallek *et al*, 1998).

Oncogenesis of MM is yet unknown. Genetic events previously reported in disease include dysregulation of the supressor genes p53 and rb1, and the oncogenes c-myc, bcl-2, and the members of the ras-family (Brown *et al*, 1994).

Inactivation of the tumour p53 gene due to point mutation has been found in fewer than 20% of patients with MM, which usually had advanced and aggressive forms of the disease (Portier *et al*, 1992; Preudhomme *et al*, 1992; Willems *et al*, 1993; Neri *et al*, 1993; Corradini *et al*, 1994; Fenaux, 1997; Ollikainen *et al*, 1997; Owen *et al*, 1997). It was concluded from these studies that p53 mutations represent a late event in the progression of MM and have limited value as a prognostic factor.

More recently, Drach *et al* (1998) described a high frequency of p53 deletions, especially in advanced stage or relapsed patients and demonstrated that the abnormalities were highly relevant for prognosis. It was presumed from this study that p53 function may also be compromised in MM by the presence of a gene deletion. However, as p53 is a tumour suppressor gene, in the case of monoallelic deletions, the second allele should also be inactivated to suppress its activity, as demonstrated in B-CLL (Dohner *et al*, 1995). Since biallelic deletions were infrequent in their patients, and mutation analysis was not performed in the described study, it is difficult to understand the role of monoallelic loss in myeloma evolution. In addition, significantly lower frequencies of p53 deletion in MM patients were found by Avet-Loiseau *et al* (1999) and Schultheis *et al* (1999).



To our knowledge, there have been no investigations regarding the frequency of p53 gene mutations in MM patients in South America. The Brazilian population is subjected to poorer environmental control, leading to a higher degree of exposure to solvents, chemical agents and to pesticides than other populations are (Lorand *et al*, 1984; Shields *et al*, 1993; Ruiz *et al*, 1994; Queiroz *et al*, 1997).

Therefore, in this report we carried out an analysis of the frequencies of p53 point mutation and deletion in Brazilian patients with MM and found that the p53 deletion was associated with short survival.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

Fifty MM and one plasma cell leukaemia patients, median age: 57 years ( $X \pm SD$ :  $57.5 \pm 11.1$ ; range: 29 to 79) were studied consecutively. Pertinent patients' characteristics are summarised in Table I.

The diagnosis of MM and plasma cell leukaemia was performed according to conventional criteria (Barlogie *et al*, 2001). Clinical staging was defined according to the criteria described by Durie & Salmon (1975).

Bone marrow samples were obtained from the posterior iliac crest or sternum from patients and from 10 normal individuals (marrow donors), who served as controls for FISH analysis. All procedures were carried out according to the principles of the institutional guidelines and all patients and controls gave written, informed consent for the use of an aliquot of the specimens for research purposes.

The treatment of patients consisted of conventional-dose chemotherapy with melphalan and prednisone (MP) until December, 1997. After this date, six cycles of vincristine, adriamycin and dexamethasone, VAD (Barlogie *et al*, 1984), were administered to all patients under 60 years and to patients older than 60 years, who presented stage II or III. Those at stage I received cycles of MP.

Survival time was measured from the date of diagnosis up to the date of death, follow up loss or up to the end of the study (30th April, 2001).

## P53 mutations analysis

Genomic DNA was obtained from bone marrow samples, using DNAzol<sup>TM</sup> Reagent (Life Technologies). Oligonucleotide primers used to amplify p53 exons 4 to 10 were purchased from Clontech (Palo Alto, CA).

Polymerase chain reaction (PCR) was performed with 0.1-0.5 µg of genomic DNA and 1U of Taq polymerase (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) in a 50 µl reaction mixture. Thirty-five cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 58°C for exons 4 and 5; 59°C for exon 8; 60°C for exons 6, 9 and 10 and 62°C for exon 7) and extension (1 min at 72°C) were performed on a thermalcycler, with a subsequent 7 minutes extension at 72°C (Saiki *et al*, 1988).

Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was performed on a Pharmacia PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the method described by Orita *et al* (1989). Electrophoresis was performed on 20% homogeneous polyacrylamide gels for exons 5-10 and 12.5% for exon 4. Running conditions were based on those used by Mohabeer *et al* (1991). Samples with abnormal mobility shifts were submitted to direct sequencing using ThermoSequenase Cycle Sequencing kit with  $\gamma$ -<sup>33</sup>P ATP (Amersham Life Science Inc., Cleveland, Ohio), according to the manufacturer's instructions.

## FISH analysis

After Ficoll-Hypaque (density=1.077; Sigma) separation, mononuclear bone marrow cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 20% foetal calf serum at 37°C and stimulated by IL-6 and GM-CSF (each at 10 ng/ml) for 72 hours, according to the method described by Brigaudeau *et al* (1996), with minor modifications. After culture, the cells were treated with Carnoy's fixative (methanol and glacial acetic acid 3: 1, vol/vol), and stored at - 20°C.

Dual-colour FISH was performed in patients and controls using DNA probes specific for the centromeric region of chromosome 17 (directly conjugated with Spectrum-Green) and the p53-locus on 17p13 (directly conjugated with

Spectrum-Orange), obtained from Vysis (Downers Grove IL, USA), and according to manufacturer's protocol.

Cells and chromosomes were counter stained with diamino-phenylindole (DAPI). All metaphases and at least 200 interphase cells were analysed using an Olympus BX60 immunofluorescence microscope with a 100W fluorescent bulb. Images were captured using a cooled charge-coupled device camera (Applied Imaging, Inc) linked to a Cyto-Vision Imaging System, version 4.4 (Applied Imaging Corporation), equipped with selective filters for detecting fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethylrhodamine (TRITC) and DAPI fluorochromes.

A cut-off value for a decision of losses or gains of chromosome 17 and p53 locus was based on the percentage of cells with zero and one or more than two signals, respectively, being greater than the mean percentage  $\pm$  3 standard deviations of the controls, as previously described by Anastasi *et al*, 1990.

### **Statistical analysis**

The significance of the differences between groups of patients was evaluated by Fisher's exact test and Chi-square test, and the nonparametric Kruskal-Wallis test. The probabilities of overall survival time were calculated using Kaplan-Meier estimates, and differences between survival curves were analysed by Breslow's test. Univariate analysis was performed for age, sex, chromosome 17 status, and p53 status. Factors presenting  $P < 0.05$  were considered significant. Variables presenting  $p < 0.25$  were included in the proportional hazards regression model of Cox in order to confirm the statistical significance. All analyses were performed using the statistical package S-Plus 2000 Professional Release 1, Copyright 1988-1999, MathSofft, Inc. and SPSS for Windows, version 10, SPSS Inc, 2000, Chicago, IL, USA.

## RESULTS

### Clinical features

Nine patients were treated with MP, 12 with MP followed by VAD, and 26 with VAD. No treatment was administered to 3 patients due to early death and to one patient with MM at stage I, without symptoms and with no evidence of progressive disease. The median follow up time of patients was 14.2 months ( $X \pm SD$ :  $26.0 \pm 32.2$  ; range: 0.07 to 139.0).

### P53 mutation analysis

No p53 point mutation was observed in the patients studied. Seven patients (13.7%) presented a polymorphism in homozygosity in exon 4, at position 72 changing a guanine for a cytosine codifying an arginine (CGC) instead of a proline (CCC). A polymorphism in exon 6 at position 213 (CGA→CGG) was identified in heterozygosity in one patient (2.0%) codifying an arginine (CGA) instead of an arginine (CGG) and in homozygosity in an other patient (2.0%). One patient (2.0%) demonstrated a polymorphism in intron 6 located 31 bp from the 3' end of exon 6 (A→G) of the p53 gene, changing an adenine for a guanine in heterozygosity.

### FISH analysis in controls

We observed three signals in 0.00% to 6.50% ( $X \pm SD$ :  $1.15 \pm 1.97\%$ ) and one signal in 2.50% to 6.50% of interphase cells ( $X \pm SD$ :  $4.15 \pm 1.29\%$ ) with the probe for the centromeric region of chromosome 17. Therefore, values higher than 7.00% and 7.50% were accepted as trisomy and monosomy 17, respectively.

Three signals in 1.00% to 4.00% ( $X \pm SD$ :  $2.65 \pm 0.91$ ) and one signal in 1.00% to 5.50% ( $X \pm SD$ :  $2.30 \pm 2.01\%$ ) of interphase cells were found in the same samples with the probe for the p53 locus. Thus, we accepted values higher than 5.50% and 8.50% as indicative of gains and deletions of one gene, respectively.

### **FISH analysis in patients**

In 16 out of 51 patients, interphase FISH of mononuclear bone marrow cells provided evidence for numerical abnormalities of chromosome 17.

Trisomy 17 was identified in 7 patients (13.7%) in 9.50% to 49.00% ( $X \pm SD$ :  $27.57 \pm 16.25\%$ ) of interphase cells. Three patients (5.9%) presented tetrasomy 17 in 4.50% to 25.00% of interphase cells. Monosomy 17 was identified in 6 patients (11.8%). This abnormality was found in 10.00% to 13.50% ( $X \pm SD$ :  $10.70 \pm 1.40\%$ ) of the interphase cells evaluated.

In 22 out 51 patients, interphase FISH of mononuclear bone marrow cells provided evidence for a p53 numerical abnormalities. Three copies of the gene were found in 11 patients (21.7%) in 7.50% to 33.50% of the interphase cells evaluated ( $X \pm SD$ :  $13.82 \pm 9.25\%$ ). Four copies of the p53 were found in 35 patients (5.90%) in 4.50%, 6.00% and 25.00% of interphase cells. P53 deletions were found in 8 patients (15.7%)

(Table II, Fig 1). Biallelic deletion of the gene was identified in just one of them.

### **Correlations with clinical characteristics**

No significant correlation between numerical abnormalities of chromosome 17 and extra copies of p53 gene with clinical characteristics and overall survival time were seen ( $P > 0.20$ ).

P53 deletion was not correlated with age and sex ( $P > 0.44$ ). Furthermore, no correlation was found with either the Durie & Salmon stage (p53 deletion in 6% of stage I and II patients vs 23% of patients at stage III;  $P = 0.23$ ) or with the status of the disease (p53 deletion in 18% patients at diagnosis vs 12% patients at relapse;  $P = 0.70$ ).

The median overall survival time was significantly lower in patients with p53 deletion than in those without deletion of the gene (7.5 months vs 17.0 months, respectively;  $P = 0.05$ ).

The estimates of overall survival for 43 patients without p53 deletion and 8 patients with the deletion of the gene at 140 months were 57.0% and 0.0%, respectively (Fig 2;  $P = 0.0006$ ). All patients with p53 deletion died within 30 months after diagnosis. Early death, in a two-month period, was observed in four of patients:

Univariate analysis demonstrated that factors such as age, sex and advanced disease did not influence the overall survival time in our patients ( $P > 0.13$ ). The presence of p53 deletion was the unique significant prognostic factor for shortened survival ( $P = 0.001$ ). The influence of p53 deletion on survival was confirmed by multivariate analysis ( $P = 0.001$ ).

## DISCUSSION

In this study, the numerical abnormalities of chromosome 17 and p53 locus were identified by interphase FISH in a significant proportion of MM patients. Gains and losses of chromosome 17 and p53 gene were not unexpected since hyperdiploidy and hypodiploidy are the most common chromosomal abnormalities in the disease (Smadja *et al.*, 1998; Perez-Simon *et al.*, 1998).

However, in our series of 51 patients, p53 deletions, mainly monoallelic, were observed in 15.7% of patients. Slightly lower frequencies (9.0% to 11.0%) of the gene deletion were found by Avet-Loiseau *et al* (1999) and Schultheis *et al* (1999) in 79 and 72 MM European patients, respectively. Carlebach *et al* (2000) did not identify deletions of p53 in 16 Jewish patients. On the other hand, higher frequencies of p53 deletions were described by Drach *et al* (1998) and Königsberg *et al* (2000) in their studies in MM (32.8% of patients at diagnosis, 54.5% at relapse and 24.7% of the untreated patients, respectively).

These differences could not be explained by the probes used for p53 analysis, as the same probe (Vysis, Inc) was used both in all studies. On the other hand, all authors analysed patients classified using the same staging system. Another possibility is based on the different ethnic origin of the studied patients, as proposed by Avet-Loiseau *et al* (1999). It has already been established that the ethnic origin of the Brazilian population is highly heterogeneous, consisting of indigenous Amerindians and immigrants from Europe, Africa and Asia (Alves-Silva *et al*, 2000; Carvalho-Silva *et al*, 2001). However, our results were similar to those obtained by Avet-Loiseau *et al* (1999) and Schultheis *et al* (1999) and therefore, the differences in p53 deletion in all studies is probably not explained by the ethnic origin of the populations and remain to be clarified.

Similar to Drach *et al* (1998), we found a strong correlation between p53 deletion and poor outcome, independent of treatment. In both studies, the medians of overall survival time were significantly lower in patients with p53 deletion than in those observed in patients without gene deletion.

As p53 is a tumour suppressor gene, in the case of deletions, the second allele should also be inactivated to suppress p53 activity, as has been demonstrated in B-CLL by Dohner *et al* (1995). Since biallelic deletions were infrequent in both studies and

since mutations were absent in our patients, the role of these monoallelic losses in myeloma evolution remains to be clarified by a large, multicentric study including populations of several regions of the world.



## **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil. The authors are indebted to Helimar Machado, Roberto Zulli and Eliana Cristina Martins Miranda for help in preparing the statistical analysis.

## REFERENCES

- Alves-Silva, J., Santos, M.D. & Guimaraes, P.E.M. (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *American Journal of Human Genetics*, **67**, 444-461.
- Anastasi, J., Le Beau, M.M., Vardiman, J.W. & Westbrook, C.A. (1990) Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. *American Journal of Pathology*, **136**, 131-139.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Godon, C., Morineau, N., Daviet, A., Harousseau, J.L., Facon, T. & Bataille, R. (1999) P53 deletions is not a frequent event in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **106**, 717-719.
- Barlogie, B., Shaughnessy, J., Munshi, N. & Epstein, J. (2001) Plasma Cell Myeloma. In: Hematology (ed. by E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps, U. Seligsohn), pp. 1279-1304. McGraw-Hill, New York.
- Barlogie, B., Smith, L. & Alexanian, R. (1984) Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *New England Journal of Medicine*, **310**, 1353-1359.
- Brigaudeau, C., Gachard, N., Clay, D., Fixe, P., Rouzier, E. & Praloran, V. (1996) A miniaturized method for the karyotype analysis of bone marrow or blood samples in hematological malignancies. *Hematology and Cell Therapy*, **38**, 275-277.
- Brown, R.D., Pope, B., Luo, X.F., Gibson, J. & Joshua, D. (1994) The oncoprotein phenotype of plasma cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, **16**, 147-156.
- Carlebach, M., Amiel, A., Gaber, H., Radnay, J., Manor, Y., Fejgin, M. & Lishner, M. (2000) Multiple myeloma: monoallelic deletions of the tumor suppressor genes TP53 and RB1 in long-term follow-up. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **117**, 5-60.
- Carvalho-Silva, D.R., Santos, F.R., Rocha, J. & Pena, S.D. (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 281-286.
- Corradini, P., Inghirami, G., Astolfi, M., Ladetto, M., Voena, C., Ballerini, P., Gu, W., Nilsson, K., Knowles, D.M., Boccadoro, M., Pileri, A. & Dala-Favera, R. (1994)

Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and rb1 in plasma cell dyscrasias. *Leukemia*, **8**, 758-767.

- Dohner, H., Fischer, K., Bentz, M., Hansen, K., Benner, A., Cabot, G., Diehl, D., Schlenk, R., Coy, J., Stilgenbauer, S., Volkmann, M., Galle, P.R., Poustka, A., Hunstein, W. & Lichter, P. (1995) p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic b-cell leukemias. *Blood*, **85**, 1580-1589.
- Drach, J., Ackerman, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., Desantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H. & Huber, H. (1998) Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, **92**, 802-809.
- Durie, B.G.M. & Salmon, S.E. (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*, **36**, 842-854.
- Fenaux, P. (1997) The clinical significance of mutations of the p53 tumor suppressor gene in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, **98**: 502-511.
- Hallek, M., Bergsagel, P.L. & Anderson, K.C. (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, **91**, 3-21.
- Königsberg, R., Zojer, N., Ackermann, J., Krömer, E., Kitler, H., Fritz, E., Kaufman, H., Nöslinger, T., Riedl, L., Gisslinger, H., Jäger, U., Simonitsch, I., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H. & Drash, J. (2000) Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, **18**, 804-812.
- Lorand I.G.H., Souza, C.A. & Costa, F.F. (1984) Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. *Lancet*, **1**, 404.
- Mohabeer, A.J., Hiti, A.L. & Martin, W.J. (1991) Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "PhastSystem". *Nucleic Acids Research*, **19**: 3154.
- Neri, A., Baldini, L., Trecca, D., Cro, L., Polli, E. & Maiolo, A.T. (1993) P53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advance of malignancy. *Blood*, **81**, 128-135.
- Olliikainen, H., Syrjänen, S., Koskela, K., Pelliniemi, T.T. & Pulkki, K. p53 gene mutations are rare in patients but common in patient-originating cell lines in multiple myeloma. (1997) *Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation*, **57**, 281-290.

- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand coformation-polymorphisms. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **86**, 2766-2770.
- Owen, R.G., Davis, S.A.A., Randerson, J., Rawstron, A.C., Davis, F., Child, J.A. & Jack, A.S. (1997) P53 gene mutations in multiple myeloma. *Journal of Clinical Pathology Molecular Pathology*, **50**, 18-20.
- Perez-Simon, J.A., Garcia-Sanz, R., Tabernero, M.D., Almeida, J., Gonzalez, M., Fernandez-Calvo, J., Moro, M.J., Hernandez, J.M., San Miguel, J.F. & Orfao, A. (1998) Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood*, **91**, 3366-3371.
- Portier, M., Molès, J.P., Mazars, G.R., Jeanteur, P., Bataille, R., Klein, B & Theillet, C. (1992) p53 and RAS mutations in multiple myeloma. *Oncogene*, **7**, 2539-2543.
- Preudhomme, C., Facon, T., Zandecki, M., Vanrumbeke, M., Luc Lai, J., Nataf, E., Loucheux-Lefebvre, M.H., Kerchaert, J.P. & Fenaux, P. (1992) Rare occurrence of p53 gene mutations in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **81**, 440-443.
- Queiroz, M.L.S., Bincoletto, C., Perlingeiro, R.C.R., Souza, C.A. & Toledo, H. (1997) Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. *Human & Experimental Toxicology*, **16**, 322-326.
- Ruiz, M.A., Augusto, L.G.S., Vassallo, J., Vigorito, A.C., Lorand-Metze, I. & Souza, C.A. (1994) Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents. *Pathology Research and Practice*, **190**, 151-154.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Schultheis, B., Kramer, A., Willer, A., Hegenbart, U., Goldschmidt, & H., Hehlmann, R. (1999) Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia*, **13**, 2099-2013.
- Seong, C., Delasalle, K., Hayes, K., Weber, D., Dimopoulos, M., Swankowski, J., Huh, Y., Glassman, A., Champlin, R. & Alexanian, R. (1998) Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **101**, 189-194.

- Smadja, N.V., Fruchart, C., Isnard, F., Louvet, C., Dutel, J.L., Cheroan, N., Grabge, M.J., Moncoduit, M. & Bastard, C. (1998) Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetics evidence of two different diseases. *Leukemia*, **12**, 960-969.
- Shields, P.G. Molecular epidemiology and genetics of environmental cancer. *Journal of The American Medical Association*, **226**, 681-687.
- Willems, P.M.W., Kuypers, A.W.H.M., Meijerink, J.P.P., Holdrinet, R.S.G. & Mensink, E.J.B.M. (1993) Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees. *Leukemia*, **7**, 986-991.

**Table I.** Characteristics of 50 patients with multiple myeloma and one patient with plasma cell leukaemia.

Feature	Number of patients
Total	51
Male	28
Female	23
Age (years)	
< 60 years	29
> 60 years	22
Creatinine (mg/dl)	
< 2	34
> 2	17
Stage of Durie & Salmon	
I	6
II	9
III	30
NP	6
Status of the disease	
Diagnosis	38
Relapse	13

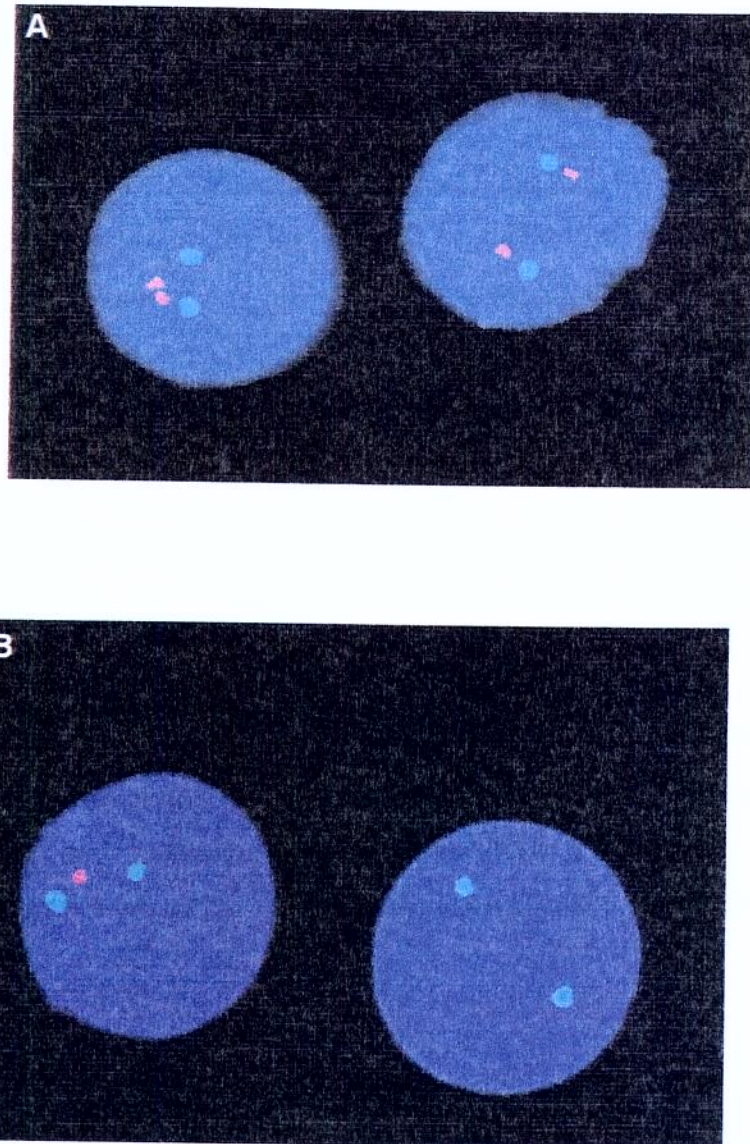
NR, not performed.

**Table II.** Clinical data and results of FISH analysis of patients with p53 deletion.

Patient	Age (years)	Sex	Stage	Status of disease	Number of hybridization signals (% of cells)	
					Chromossome 17	P53 locus
L.A.S.	51	F	III	D	++ (89.1)	+ (17.2)
M.L.S.	63	F	III	D	++++ (7.0)	+ (12.0)
A.P.C.	70	M	III	R	+++ (13,5)	+ (12.0)
J.L.S.	69	M	III	D	++ (92.0)	+ (23.5)
M.S.P.	58	F	II	R	+ (10.0)	+ (28.0)
S.A.M.	43	F	III	D	++ (95.0)	+ (17.0)
M.A.L.	56	F	III	R	++ (92.0)	+ (20.5)
J.J.S.	74	M	III	D	++ (93.0)	+ (25.5)
						0 (13.5)

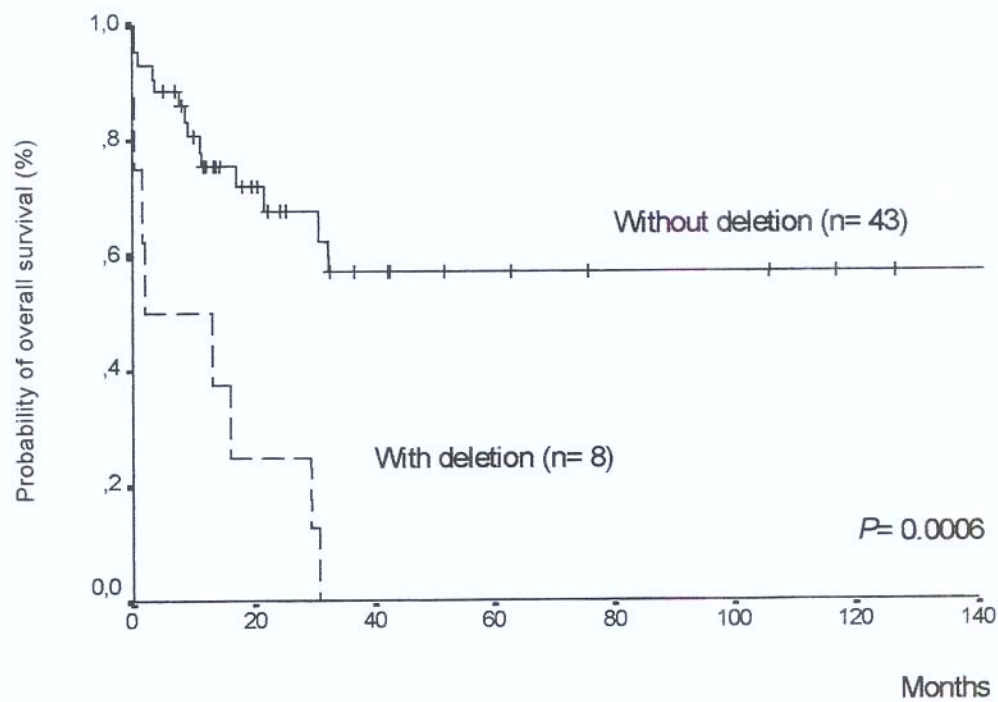
F, female; M, male; D, diagnosis; R, relapse; 0, indicates biallelic deletion; +, indicates monoallelic deletion or monosomy; ++, indicates the presence of two loci or chromossomes; +++, indicates trissomy; +++++, indicates tetrasomy





**Fig 1.** Interphase FISH analysis in MM patients, using specific probes for chromosome 17 centromere (●) and p53 locus (●). (A): two hybridization signals for each probe in a normal interphase nucleus and, (B) abnormal nucleus exhibiting a monoallelic (left) and biallelic (right) deletions of p53 locus.





**Fig 2.** Overall survival probabilities in 50 patients with multiple myeloma and one plasma cell leukaemia patient. The dotted line represents patients with p53 deletion by FISH and the solid line represents those without a p53 deletion.