



UNICAMP

ESTUDO DE MUTAÇÕES DE P53 E PTPN11 NA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Flávio A. B. Jr, Fabíola Traina, Maria Teresa Almeida, Tereza Ike, Sara T. O. Saad

Hemocentro - Universidade Estadual de Campinas

Palavras-Chave: Mielodisplasia – P53 – PTPN11 – Mutações

INTRODUÇÃO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoiéticas clonais, caracterizadas por hematopoiese ineficaz, medula óssea hiperclular e presença de citopenias no sangue periférico (anemia, neutropenia e plaquetopenia) e risco de evolução para leucemia mieloide aguda. A fisiopatogenia desta doença ainda não está elucidada. Anormalidades cromossômicas são comuns em SMD, e a presença de mutações em genes supressores de tumor e proto-oncogenes tem sido investigada, dentre estes, os genes *P53* e *PTPN11*. O *PTPN11* é responsável pela codificação da SHP-2, fosfatase que regula a ativação da p21 RAS por fatores de crescimento ativados. Assim, alterações neste gene podem levar à perda dos mecanismos de controle da proliferação celular. A proteína *P53* atua como supressor de tumores, pois participa na interrupção do ciclo celular, quando há algum dano no DNA e na apoptose. É descrito que mutações neste gene são freqüentes em leucemias e que ocorrem em 10% dos pacientes com SMD. As mutações descritas no *P53* ocorrem geralmente nos éxons 5, 6, 7 e 8. Dessa forma, torna-se interessante o rastreamento de mutações no *PTPN11* e no *P53* em pacientes com SMD na tentativa de elucidar a fisiopatogenia da doença e se a presença de mutações nesses genes podem contribuir para a sua evolução.

METODOLOGIA

O presente estudo analisou amostras de 40 pacientes com diagnóstico de SMD atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro Unicamp. Amostras de DNA foram obtidas de sangue total de medula óssea. A classificação dos pacientes foi realizada de acordo com os critérios do grupo cooperativo Franco-Americano-Inglês (FAB).

A pesquisa de mutação para os dois genes foi feita através de rastreamento de mutações em éxons específicos de cada gene, utilizando métodos de amplificação do DNA por PCR para os éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *P53* e para o exon 3 *PTPN11*. Os amplificadores específicos para cada exon estão descritos na Tabela 1. Realizaram-se reações de dHPLC e posterior seqüenciamento de DNA, para todas aquelas amostras que apresentaram a formação de picos indicativos de mutações.

Tabela 1: Amplificadores utilizados.

Gene	Seqüências de amplificadores
<i>P53</i> Exon 5	S:5'- CTCTTCCTACAGTACTCCCCTGC -3' AS:5'-GCCCCAGCTGCTCACCATCGCTA -3'
<i>P53</i> Exon 6	S:5'-GATTGCTCTTAGGTCT GGCCCCTC-3' AS:5'-GGCCACTGACAACCACCCTTAACC-3'
<i>P53</i> Exon 7	S: 5'-GTGTTATCTCCTAGGTTGGCTCTG -3' AS:5'-CAAGTGGCTCCTGACCTGGAGTC-3'
<i>P53</i> Exon 8	S:5'-ACCTGATTCCTTACTGCCTCTTGC -3' AS:5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT -3'
<i>PTPN11</i> Exon 3	S: 5'-CGACGTGGAAGATGAGATCTGA -3' AS: 5'- CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG -3'

RESULTADOS

As mutações identificadas e os dados clínicos dos pacientes estão descritos na Tabela 2.

Mutação no gene *P53* foi encontrada em 5 pacientes, sendo que 1 paciente apresentou mutação em 2 exons. Os perfis cromatográficos de dHPLC de 5 pacientes e 4 controles são visualizados na Figura 1. O cromatograma de seqüenciamento de 1 paciente com mutação no gene *P53* está exemplificado na Figura 2.

Mutação no gene *PTPN11* foi encontrada em apenas 1 paciente. O produto da amplificação por PCR do exon 3, de 7 pacientes, está demonstrado na Figura 3.

Tabela 2: Descrição dos pacientes com presença de mutações *P53* e *PTPN11*.

Pacientes	FAB	Gene	Mutação
1	AREBt	<i>P53</i>	Exon 5 códon 152 Substituição C > T (Pro > Val)
2	AREBt	<i>P53</i>	Exon 5 códon 152 Substituição C > T (Pro > Val)
3	AR	<i>P53</i>	Exon 6 códon 291 Substituição C > T (Arg > Cys)
4	AREBt	<i>P53</i>	Exon 7 códon 178 Substituição G > C (Lis > Asn)
5	AREBt	<i>P53</i>	Exon 8 códon 272 Substituição G > C (Val > Lis)
6	AR	<i>PTPN11</i>	Exon 3 códon 287 Inserção C (Lis > Pro)

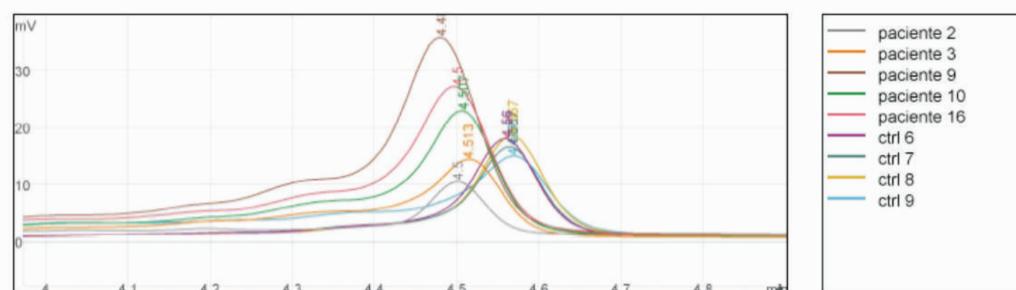


Figura 1: Comatograma dHPLC para o exon 5 *P53*. Note que os perfis cromatográficos dos pacientes estão deslocados em relação aos perfis dos controles, indicando a presença de mutação.

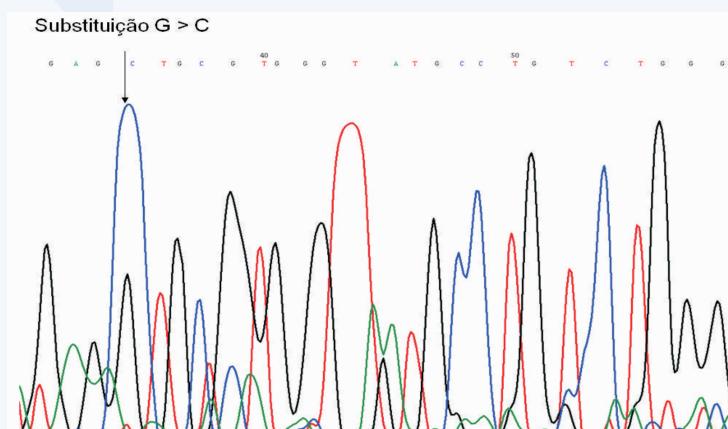


Figura 2: Cromatograma de Seqüenciamento do exon 8 *P53* codon 272 . A seta indica a presença da substituição nucleotídica G por C.

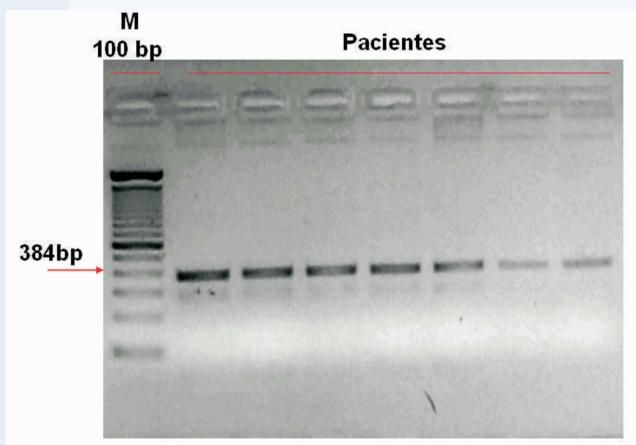


Figura 3: Gel de Agarose 2% representativo de PCR para o éxon 3 *PTPN11* (384bp). M: marcador de peso molecular Ladder 100bp.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados preliminares indicam maior freqüência de mutações em *P53* em pacientes com AREBt . Este fato, somado à presença de mutação no *PTPN11* num paciente com AR corrobora a hipótese de que alterações no gene *P53* estariam relacionadas a uma progressão leucêmica das mielodisplasias enquanto que modificações no gene *PTPN11* estariam associadas aos estágios iniciais da doença.

