



UNICAMP

# Repetições do tri-nucleotídeo GAA no gene da frataxina em pacientes com Mielodisplasia (MDS)

Karla Augusta Cavagnini, Tereza Sueko de Salles, João Machado – Neto, Fabíola Traina, Dulcinéia Martins de Albuquerque, Janine Schincariol Sabino, Sara Teresinha Ollala Saad

Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro/Unicamp; Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, FCM/UNICAMP; Bolsa SAE/Unicamp (Agosto/2009-Julho/2010)

Palavras-chave: mielodisplasia – Frataxina – repetições GAA



## INTRODUÇÃO

### 1- Mielodisplasia

- Doença hematológica mais freqüente em indivíduos acima de 60 anos de idade
- Alteração da produção das células da medula óssea com hematopoiese ineficaz
- Anemia, neutropenia, plaquetopenia
- Evolução para leucemia mielóide aguda em 30% dos pacientes
- Distúrbios da apoptose e da diferenciação celular
- Mutações em oncogenes e proto-oncogenes

Estudo preliminar recente<sup>1</sup> mostrou que alterações nas repetições do gene da frataxina também ocorrem em pacientes MDS. Os resultados indicaram que pacientes MDS exibem repetições GAA mais longas no gene da frataxina que indivíduos saudáveis.

### 2- Frataxina

A mitocôndria é o único local onde ocorre a síntese do heme e a biossíntese dos clusters Fe-S e está envolvida com a apoptose celular, formação dos glóbulos vermelhos e estresse oxidativo. A frataxina tem papel importante ao formar um complexo com o ferro porque previne a formação de radicais livres na mitocôndria. A formação desses clusters é crítica para a prevenção do acúmulo do ferro e do estresse oxidativo. Assim, a falta de frataxina promove o acúmulo de ferro mitocondrial. Além disso, a frataxina está envolvida no processo da cadeia respiratória, e portanto, com a produção de energia.

Assim, pacientes com ataxia de Friedreich (FRDA), a ataxia hereditária mais comum, apresentam síntese reduzida da proteína mitocondrial frataxina, e também menor atividade de proteínas mitocondriais que contêm clusters Fe-S. Essa doença degenerativa autossômica recessiva é caracterizada por ataxia progressiva, perda sensorial, cardiomiopatia hipertrófica e diabetes. Os sintomas são resultado de mutações que consistem de instáveis longas repetições do tri-nucleotídeo GAA no primeiro íntron do gene da frataxina. Células de pacientes FRDA possuem de 66 a mais de 1.700 repetições, enquanto que o normal varia de 7 a 36 repetições. Expansões anormais impedem a expressão do gene da frataxina e resultam em redução dos níveis de RNAm da frataxina, levando a uma reduzida função da cadeia respiratória.<sup>1</sup>

## OBJETIVOS

- Identificar repetições do tri-nucleotídeo GAA no gene da frataxina em pacientes com mielodisplasia e leucemias agudas.
- Correlacionar o número destas repetições com subtipos de síndromes mielodisplásicas.

Para tal foi analisado DNA genômico de pacientes e controles, obtido de medula óssea e sangue periférico para comparar possíveis modificações nas repetições do gene FXN nos clones anormais de medula óssea.

## METODOLOGIA

- Homo sapiens chromosome 9; gene "FXN"/product "frataxin". NC\_000009.10 GI: 89161216

GAAGAAACTTTGGGATTGGTTGC CAGTGCCTTAAAGTTAGGACTTAGAAAAATG  
GATTCCTGGCAGGACGCGTGGCTCATGCCATAATCTCAGCACTTTGGGAGG  
CCTAGGAAGTGGATCACCTGAGGTCGGAGTTCAGACTAACCTGGCCAAACA  
TGGTGAAACCCAGTATCTACTAAAAAATACAAAAAATAAAAAAAGAAAGAA  
GAAGAAGAAATAAAGAAAAGTTAGCCGGGC

Figura 1: Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando o programa Gene Runner.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen)

Primer	Seqüência
FXNSNP	sense 5'GAAGAAACTTTGGGATTGGTTGC 3' (marcado com FAM no 5')
FXNSNP	anti-sense 5'GCCCGGCTAACTTTTCTTTAT 3'

### - Pacientes e Amostras

Para a análise do DNA genômico foram utilizadas amostras de medula óssea coletadas de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp com diagnóstico de SMD e LMA, após consentimento escrito, informado (aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FCM – parecer 124-2005). As amostras foram coletadas antes de qualquer tratamento.

O número total de amostras analisadas e avaliadas foi:

30 amostras de MO (medula óssea) de SMDs.

16 amostras de MO de LMA

28 amostras de controles normais (doadores de sangue).

### - Métodos

**PCR:** As amostras de DNA foram submetidas ao método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram definidas as melhores concentrações de primers e DNA em 10µM (tanto para forward quanto para o reverse) e em 3µl, respectivamente. Os produtos do PCR foram encontrados através da utilização de enzimas de restrição adequadas, e todas as análises de PCR foram realizadas em idênticas condições de 95° por 5 min; 92° por 30s, 59° por 30s e 72° por 40s - 34 ciclos; e 72° por 7 min.

**MegaBACE:** após o PCR, a detecção do polimorfismo (GAA)<sub>n</sub> foi investigada no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare – Amersham) e analisados pelo software *Fragment Profiler* v1.2, com o objetivo de identificar e de determinar o número de repetições GAA nos fragmentos.

**Análise dos resultados:** Os dados obtidos no software informaram qual era o tamanho do fragmento para cada amostra analisada. Isso possibilitou cálculos para chegar ao número, possivelmente exato, de quantas repetições GAA havia em cada fragmento. Os cálculos se basearam no início da análise do gene para desenho dos primers.

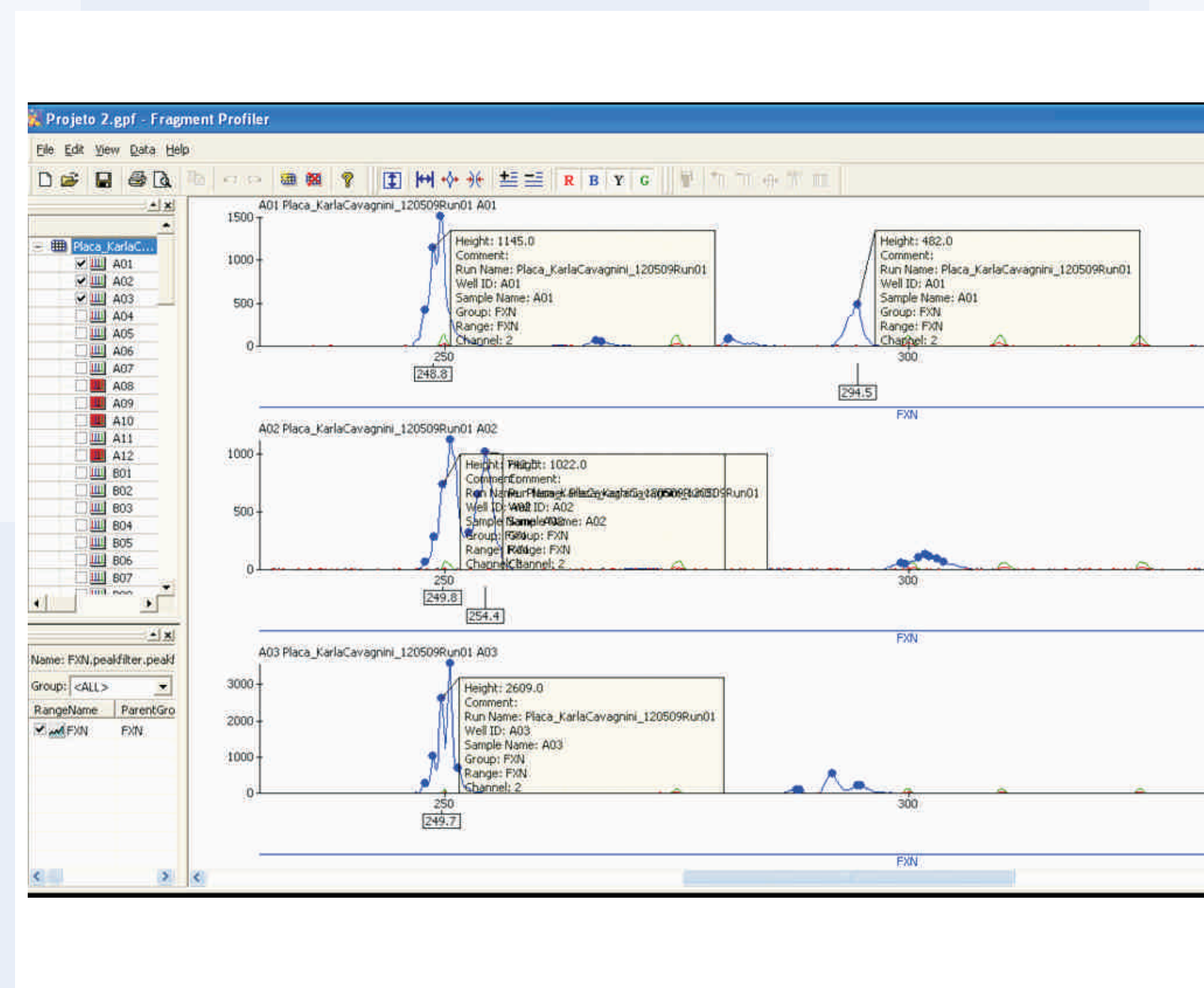


Figura 2: Interface do software durante a análise dos resultados

## RESULTADOS

Tabela 2. Amostras de pacientes controles

Pacientes	No de repetições	Raça	Sexo	Idade
1	7 e 21	C	M	33
2	9 e 6	C	M	43
3	6	C	F	43
4	6 e 15	C	M	60
5	6 e 23	C	M	60
6	6 e 19	C	M	35
7	8	C	F	67
8	8 e 23	N	M	55
9	8 e 15	C	M	40
10	7 e 18	C	M	35
11	8	C	M	46
12	6 e 8	N	M	42
13	6 e 24	N	F	56
14	8 e 11	C	M	32
15	4 e 8	C	M	30
16	7	C	M	55
17	6 e 8	N	M	39
18	8 e 16	N	M	59
19	8	C	F	57
20	7 e 15	C	M	31
21	6 e 7	C	M	38
22	6 e 9	C	M	68
23	7	C	F	33
24	8	-	-	-
25	6 e 11	-	-	-
26	4 e 6	-	-	-
27	4	-	-	-
28	5 e 11	-	-	-

Tabela 3. Amostras de pacientes MDS.

Pacientes	No de repetições	Sexo
1	8 e 17	M
2	6 e 8	F
3	7	M
4	7	F
5	8	F
6	17 e 18	M
7	6 e 8	M
8	7	F
9	8 e 24	F
10	6 e 8	M
11	6 e 8	F
12	8	F
13	7	F
14	6	F
15	6	F
16	8	M
17	7	M
18	6 e 8	M
19	8	M
20	6	F
21	6 e 12	M
22	8	F
23	8	F
24	6	M
25	6 e 8	M
26	7 e 14	F
27	7	M
28	8	M
29	7 e 8	M

Tabela 4. Amostras de pacientes LMA.

Pacientes	No de repetições	Sexo
1	8 e 16	M
2	6 e 8	M
3	7	M
4	8	M
5	6 e 8	M
6	8	M
7	7	M
8	6 e 8	M
9	8 e 14	F
10	6	F
11	7	M
12	7	F
13	6 e 8	M
14	7	M
15	6 e 8	M
16	26 e 29	M

Nos pacientes MDS, a análise em 24 dos 30 pacientes (80%) mostrou curta extensão do PCR (6-8 repetições), enquanto que somente em 6 pacientes (20%) os produtos de PCR mostraram repetições longas (12-35 repetições). Porém, na análise do sangue periférico de doadores saudáveis, o PCR em 16 dos 28 pacientes (57%) mostrou longa extensão (11-24 repetições), enquanto que 12 amostras (43%) tinham produtos de PCR curtos (4-9 repetições).

A análise das amostras de pacientes LMA também mostrou PCR de curta extensão para a maioria dos pacientes, sendo que apenas três dos 16 pacientes (18,75%) apresentavam PCR de longa extensão (14-29 repetições).

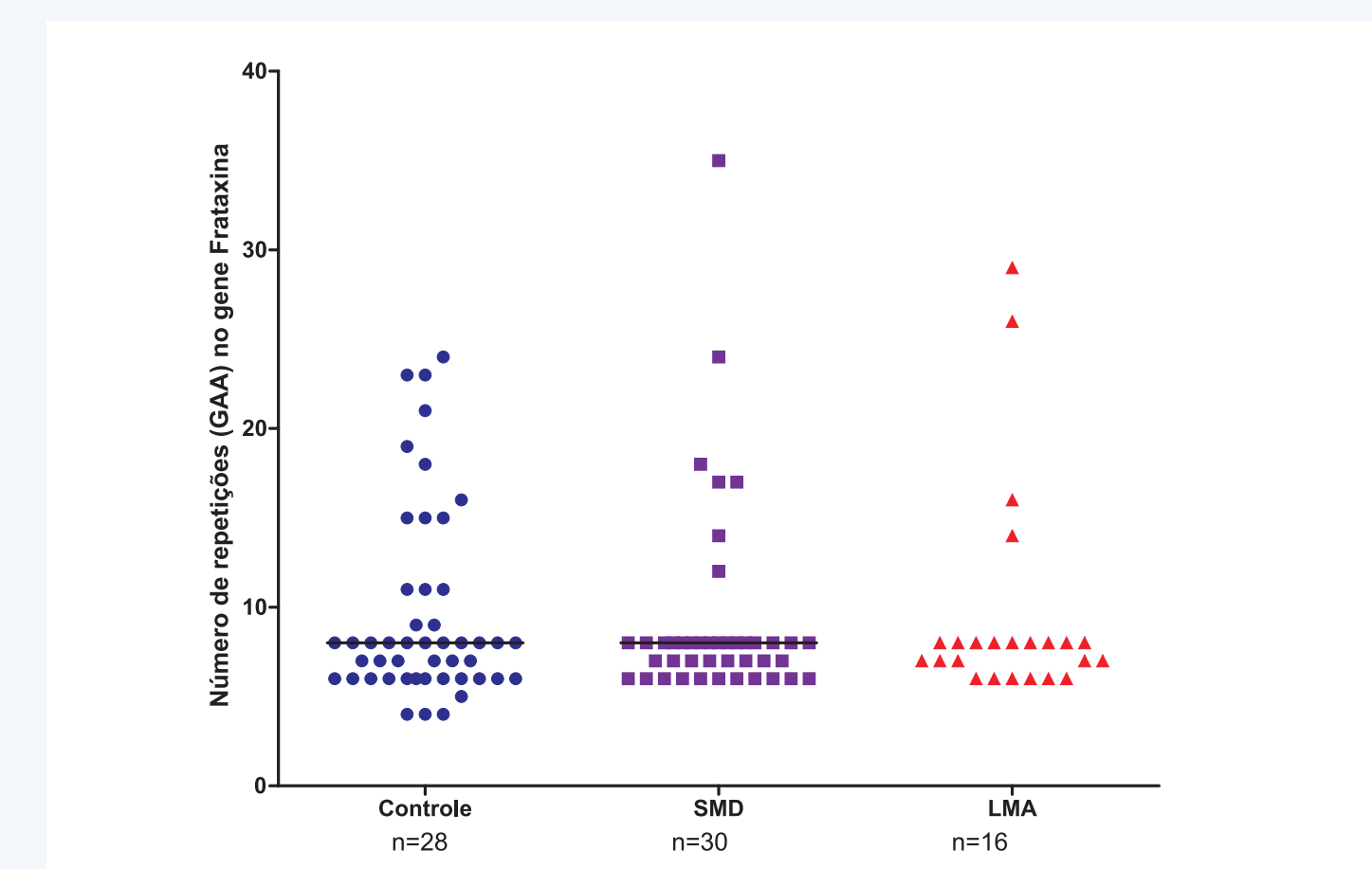


Gráfico 1: Análise dos valores obtidos nos resultados para os três grupos observados.

## DISCUSSÃO

A análise dos resultados encontrados mostra resultados discordantes do resumo publicado<sup>1</sup> e não indicam que pacientes com MDS ou LMA exibem repetições GAA mais longas no gene da Frataxina que indivíduos saudáveis. Portanto, esses dados não sugerem uma mutação somática no gene da frataxina em células hematopoiéticas de pacientes com MDS. É possível que a baixa freqüência encontrada de repetições nestas células, deva-se a uma melhor sobrevivência destas por apresentarem a proteína frataxina em quantidades adequadas e, portanto melhor função respiratória.

## BIBLIOGRAFIA

- Drorit Merkel, H. Joachim Deeg, Amos Simon, Ninette Amariglio, Arnon Nagler, Gideon Rechavi. Somatic Expansion of the Frataxin Gene GAA Repeats in MDS Patients. Blood 112s: 579-580, 2008.

