

## DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES *TP53* E *SF3B1* EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA.

Giovana de Rossi Palma (PIBIC/FA/UEM), Quirino Alves de Lima Neto (Orientador);  
Giovana Paola Zaccarias Bemvides. E-mail: qalneto@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,  
Maringá, PR.

**Ciências biológicas / Imunologia**

**Palavras-chave:** Neoplasia Hematológica; Leucemia Mieloide; Mielodisplasia.

### RESUMO

Leucemias são causadas por alterações na proliferação e diferenciação de blastos pertencentes à linhagem hematopoiética na medula óssea. Podem ser classificadas como: Neoplasias Linfoides e Neoplasias Mieloides. As Neoplasias Mieloides acometem células tronco hematopoiéticas comprometidas com a linhagem mielóide, a qual é encarregada de originar células sanguíneas maduras. Este grupo abrange as Neoplasias Mieloproliferativas e as Neoplasias Mielodisplásicas (NMD). As mielodisplasias são caracterizadas pela proliferação e apoptose simultâneas de células hematopoiéticas, resultando em medula óssea normocelular ou hiperclular e citopenia com presença de blastos no sangue periférico. Atualmente, as Neoplasias Mielodisplásicas podem ser categorizadas conforme as alterações genéticas e características morfológicas encontradas, como o caso de NMD com baixa contagem de blastos e mutação no gene *SF3B1* (NMD-*SF3B1*) e NMD com inativação funcional em ambos alelos do gene *TP53* (NMD-bi*TP53*). Deste modo, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia *in house*, baseada em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção de mutações no gene *TP53* em pacientes com mielodisplasias, a fim de colaborar com o esclarecimento da patogênese da neoplasia. A padronização de PCR para *TP53* foi realizada utilizando os novos *primers* construídos.

### INTRODUÇÃO

As leucemias, umas das principais causas de doenças hematológicas, são causadas por alterações na proliferação e diferenciação de blastos na medula óssea, pertencentes à linhagem de Células Tronco Hematopoiéticas (CTH). Podem ser enquadradas em Neoplasias Linfoides e Neoplasias Mieloides. Englobadas por esse grupo, existem as Neoplasias Mieloproliferativas e as Neoplasias Mielodisplásicas (NMD), que abrangem as Anemias Refratárias com Sideroblastos em Anel, Anemias Refratárias com Excessos de Blastos-1, Anemias Refratárias com Excessos de Blastos-2, Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem, Citopenia Refratária com Displasia Múltipla, Síndromes Mielodisplásicas Associadas à Delação Isolada do braço longo do cromossomo 5 (del(5q)) e Síndromes Mielodisplásicas não classificadas (Khoury, 2022; Vassalo, 2009).

As NMDs surgem a partir de mutações em clones celulares específicos, que adquirem vantagem proliferativa sobre outros clones de células tronco hematopoiéticas comprometidas com as linhagens da classe mieloide, que originam células sanguíneas maduras, como hemácias, plaquetas, monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos. São caracterizadas pela proliferação e apoptose simultâneas de CTH, resultando em medula óssea normocelular ou hiperclular, sendo observadas citopenia com presença de blastos no sangue periférico, displasia em uma ou mais linhagens mieloides, anormalidades genéticas e maior risco de desenvolvimento de Leucemia Mieloide Aguda. As NMDs ainda podem ser identificadas como primárias, quando não se conhece a razão da displasia, ou secundárias, quando está associada a quimioterapia ou exposição à radiação (Estey, 2022; Vassalo, 2009).

Atualmente, as mielodisplasias podem ser categorizadas conforme as alterações genéticas e características morfológicas encontradas, como o caso de NMD com baixa contagem de blastos e del(5q) isolada (NMD-5q), NMD-*SF3B1* e NMD-bi*TP53*. Esse gene codifica a proteína supressora de tumor p53, que contém domínios de ligação ao DNA e ativação transcricional, respondendo a estresses celulares a fim de regular a expressão do gene alvo. O gene *SF3B1* codifica a subunidade 1 do fator de *splicing* 3b, que atua na ligação dos complexos U2 snRNP e U12 snRNP ao pré-mRNA. Estudos recentes demonstraram que a NMD-*SF3B1* está relacionada com mais de 90% das NMDs com 5% de sideroblastos em anel, enquanto alterações patogênicas de qualquer tipo no gene *TP53* são detectadas em 7 a 11% das mielodisplasias, dentre essas, cerca de dois terços dos pacientes têm múltiplas mutações e deleções bialélicas (Grob, 2022; Khoury, 2022; Haferlach, 2014; Vassalo, 2009).

Sob estes aspectos, este trabalho visou desenvolver uma metodologia *in house* para detecção de mutações no gene *TP53* em pacientes com NMD, a fim de contribuir com a elucidação da patogênese da neoplasia, fornecendo informações que impulsionam a busca por novas tecnologias terapêuticas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para as reações de PCR foram desenhados *primers* específicos que flanqueiam as regiões mutadas de interesse. Para isso, uma busca da sequência FASTA do gene *TP53* foi realizada no Banco de Dados de Genomas (GenBank). As melhores sequências de *primers* foram avaliadas por meio dos *softwares* de bioinformática *Primer - BLAST*, *Multiple Primer Analyzer* e *OligoAnalyzer*, que permitiram determinar a proporção de citosina/guanina, a temperatura de *melting* e formação de fragmentos inespecíficos de DNA.

O Hospital do Câncer de Maringá foi responsável por triar os pacientes diagnosticados com NMD e conceder as amostras. A extração do DNA foi realizada a partir de sangue total, por meio de BioPur® Kit Extração Mini Spin Plus (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), conforme recomendações da fabricante. As concentrações e purezas dos DNAs extraídos foram avaliadas através da medida de densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (NanoDrop 2000R, Thermo Scientific).

A partir das sequências dos *primers* obtidos, foi padronizada a técnica de amplificação. Para isso, foram determinadas as concentrações de cada reagente,

assim como as melhores condições de ciclagem, utilizando o gene do Hormônio do Crescimento Humano (*HGH*) como controle interno da reação. Os amplicons foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ (Invitrogen™ Life Technologies, Grand Island, NY), a 100V-300mA-150W por 20 minutos, com marcador molecular de 50 pares de base.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a construção dos *primers* do *TP53*, descritos na tabela 1, e avaliação das melhores sequências por meio dos *softwares* de bioinformática, foi possível determinar a temperatura de *melting* entre 50 e 65°C, a proporção citosina/guanina de 50-60% e evitar a formação de fragmentos de DNA inespecíficos, como *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*.

**Tabela 1.** Sequência de *primers* para amplificação do gene *TP53*

Gene	ID do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' -> 3')
<i>TP53</i>	TP53InF1.1	TTAGTGGTGGGAAGGTTGGAAG
	TP53InF1.2	CAGGGTTGGAAGTGTCTCATGC
	TP53In9 1.1	TAGCTACAACCAGGAGCCATTG
	TP53In9F2.1	TGCATGTTGCTTTTGTACCGTC
	TP53_R2.1	GACCCAGTCTCCAGCCTTTG
	TP53_R2.2	ACTCATTGCAGACTCAGGTGG
	TP53_R2.3	CAGCCCACTCATTGCAGA
	F: <i>primer forward</i> ; R: <i>primer reverse</i> .	

Foram desenhados dois *primers forward* para amplificação do gene *TP53*, no entanto, por meio dos testes, foi observado que o *primer* F1.1 apresentou melhores resultados. Com os iniciadores, foi possível desenvolver a padronização da PCR de *TP53*. As concentrações dos reagentes necessários, bem como as condições de ciclagem, estão dispostas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2.** Concentração dos reagentes empregados na reação PCR de *TP53*

Reagentes	Volume por amostra	
	<i>HGH</i>	<i>TP53</i>
Água	13,8 µL	13,15 µL
Buffer	2 µL	2 µL
dNTP	0,5 µL	1 µL
Primer F	0,5 µL	0,5 µL
Primer R	0,5 µL	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0,6 µL	0,75 µL
TaqPolimerase	0,1 µL	0,1 µL
DNA	2 µL	2 µL

**Tabela 3.** Condições de ciclagem para o gene *TP53*

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclagem
Desnaturação inicial	95 °C	1 minuto	35 X
Desnaturação	95 °C	30 segundos	
Anelamento	58 °C	30 segundos	
Extensão	72 °C	4 minutos	
Extensão final	72 °C	10 minutos	

Visto que foram encontradas dificuldades após o início da padronização da PCR do *TP53*, sendo necessário trocar a metodologia de análise, não houve tempo suficiente para a construção e compra dos *primers* para o *SF3B1*, bem como para o desenvolvimento do estudo caso-controle. No entanto, conforme os estudos de Estey, Grob e Haferlach, seria esperado uma diferença significativa nas frequências de mutações nos genes *TP53* e *SF3B1* em pacientes com NMDs. Além disso, os prognósticos observados são, comumente, não favoráveis para mutações no *TP53* e favoráveis para mutações no *SF3B1*.

## CONCLUSÕES

Conforme os testes realizados, os *primers* desenhados e avaliados demonstraram bons resultados. Dentre os *primers* disponíveis, foi possível observar que o F1.1 foi melhor para a técnica.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e minha coorientadora. Ao Laboratório de Imunogenética da Universidade de Maringá. Ao Hospital do Câncer de Maringá, bem como os pacientes e controles. À Fundação Araucária, por fomentar este projeto.

## REFERÊNCIAS

- ESTEY, E.; HASSERJIAN, R.P.; DÖHNER, H. *Distinguishing AML from MDS: a fixed blast percentage may no longer be optimal*. **Blood**. v. 139, n. 3, p. 323-332, 2022. <doi: 10.1182/blood.2021011304>.
- GROB, T.; AL HINAL, A.S.A.; SANDERS, M.A.; et al. *Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high risk myelodysplastic syndrome*. **Blood**. v. 139, n. 15, p. 2347-2354, 2022. <doi: 10.1182/blood.2021014472>.
- VASSALO, J.; MAGALHÃES, S. M. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 267-272, 2009.
- HAFERLACH, T.; et al. *Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes*. **Leukemia**. v. 28, n. 2, p. 241-247, 2014. <doi: 10.1038/leu.2013.336>.
- KHOURY, J. D.; SOLARY, E.; ABLA, O., AKKARI, Y.; ALLAGIO, R.; APPERLEY, J.F.; et al. *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms*. **Leukemia**. v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.