

Investigação de alterações moleculares no gene *PTPN11* em leucemias mieloides agudas pediátricas

Filipe Vicente dos Santos Bueno, Francianne Gomes Andrade, Maria S. Pombo-de-Oliveira
Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ

INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) pediátrica representa um grupo diverso de doenças por apresentarem diferenças morfológicas, imunofenotípicas, bem como translocações cromossômicas e mutações somáticas. Estas alterações foram anteriormente divididas em duas classes de alterações: alterações de classe I (*K/N-RAS*, *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1*) que ativam vias de transdução de sinal e alterações de classe II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, *MLL-MLLT3*) que afetam fatores de transcrição e desregulam mecanismos epigenéticos. Dentre estas, a via tirosina fosfatase é uma das principais vias alteradas nas LMAs. Esta via é regulada pela proteína citoplasmática tirosina fosfatase 2 (Shp-2) codificada pelo gene *PTPN11*. A proteína SHP-2 contém dois domínios SH2 N-terminais, um domínio PTP catalítico, uma cauda C-terminal com dois sítios de fosforilação de tirosina, e um domínio rico em prolina (Fig 1). Mutações no *PTPN11* levam ativação constitutiva da via de sinalização RAS-MAPK. Mutações nos éxons 3 e 8 no *PTPN11* já foram identificadas nas leucemias, sendo as mutações no éxon 3 os hotspots nas LMAs pediátricas. Sabe-se que mutações no *PTPN11* que afetam a desregulação dos eventos RAS-MAPK estão envolvidos na patogênese da LMA em pacientes pediátricos, porém os mecanismos de mutações, juntamente com alterações de classe II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, *MLL-MLLT3*) precisam ser esclarecidos.

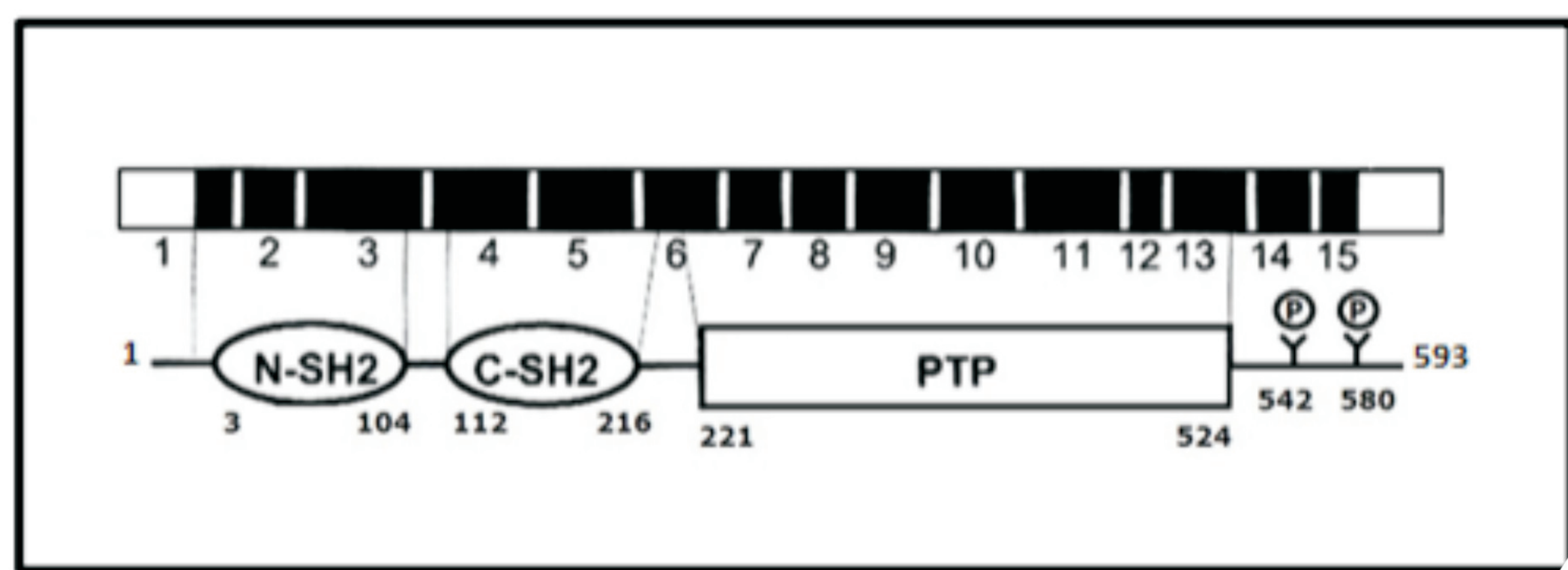


Figura 1. Estrutura do gene *PTPN11* e da proteína tirosina-fosfatase SHP-2 codificada por ele. O *PTPN11* possui 15 éxons: os éxons 2 e 3 codificam o domínio N-SH2, os éxons 4 e 5, o domínio C-SH2, os éxons 6 a 13, o domínio tirosinofosfatase (PTP), e os éxons 14 e 15 codificam a região carboxi-terminal. Os números de resíduos de aminoácidos que delimitam vários domínios ou que correspondem aos sítios de fosforilação estão indicados na figura.

OBJETIVOS

- Identificar mutações no éxon 3 do gene *PTPN11* nas LMAs pediátricas.
- Explorar a associação entre as mutações do *PTPN11* e os diferentes subtipos morfológicos, características clínico-demográficas e moleculares dos pacientes pediátricos com LMA.
- Estabelecer o valor preditivo de prognóstico das associações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nós analisamos 287 casos de LMA de novo (≤ 18 anos de idade) encaminhados para o Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico (PHOP), entre o período de 2010-2015. A identificação das fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa* e os rearranjos do gene *KMT2A* (*KMT2A-r*) foi realizada através da técnica de FISH, RT-PCR convencional e RT-PCR multiplex. O éxon 3 do gene *PTPN11* foi analisado por sequenciamento direto (Fig 2). Os cálculos de frequência e análises univariadas foram realizadas através dos testes de χ^2 e exato de Fisher. As estimativas das distribuições de sobrevida global (SG) foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e teste de Log-Rank.

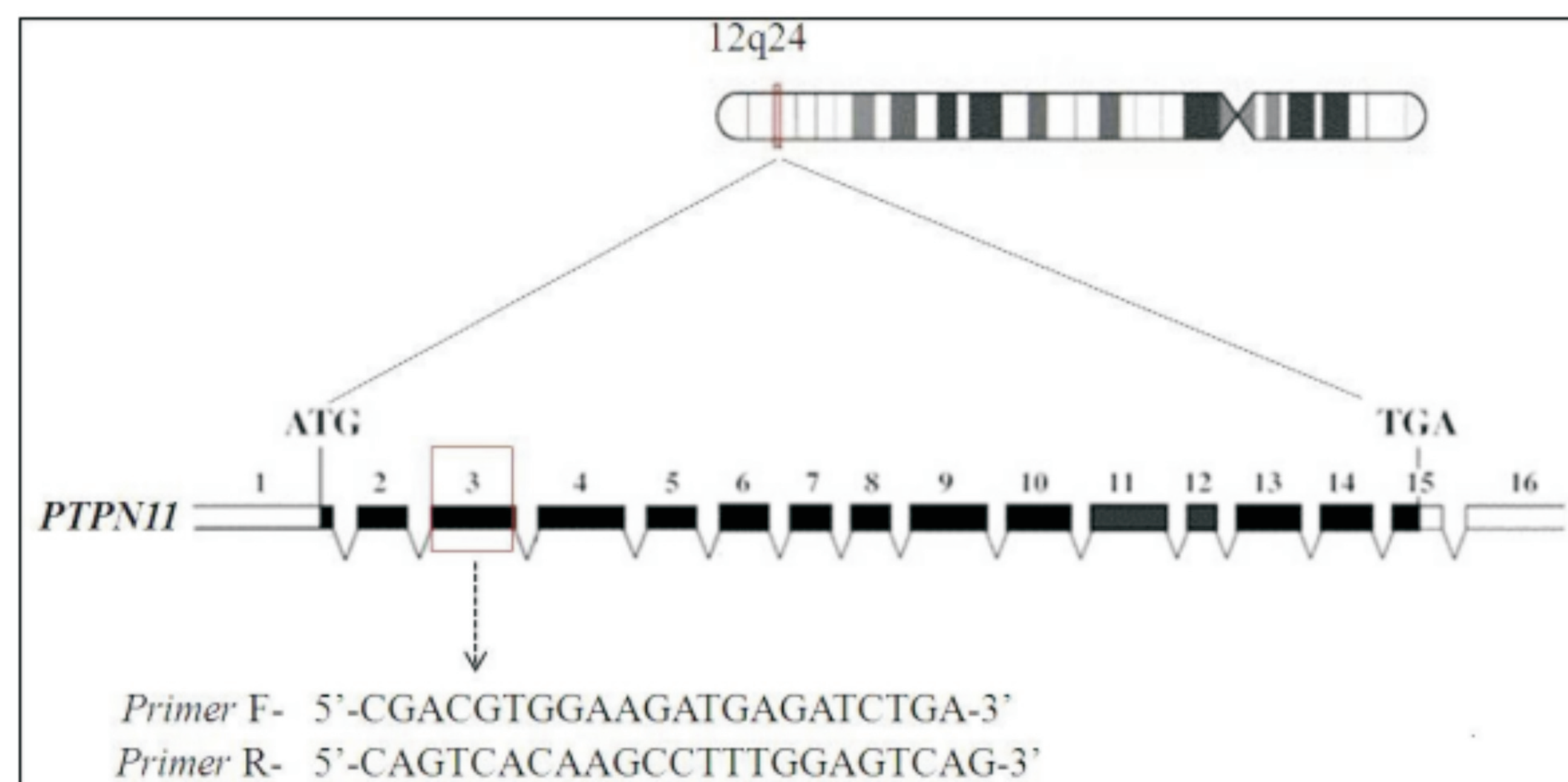


Figura 2. Localização cromossômica do gene *PTPN11* e representação dos seus éxons. O éxon 3 foi amplificado pela reação de PCR utilizando os primers F- 5'-CGACGTGGAAGATGAGATCTGA-3' e R- 5'-CAGTCAAGCCTTTGGAGTCAG-3'. As condições de ciclagem foram: 94°C por 8 min para a desnaturação inicial, seguidos por 33 ciclos de 94°C por 45 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, com extensão final de 72°C por 10 min. A análise das mutações foi realizada pela técnica de sequenciamento direto.

RESULTADOS

Tabela 1. Distribuição da frequência de alterações moleculares nos casos de LMA pediátrica de acordo com a idade e o gênero

Alteração Molecular*	Frequência n/total (%)	Idade (anos)				p	Gênero		p
		≤ 2 n (%)	$>2-10$ n (%)	≥ 11 n (%)	Masculino n (%)		Feminino n (%)		
Mutações Tipo II									
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>									
POS	34/256 (13,3)	2 (3,7)	18 (18,4)	14 (13,5)	0,039	18 (14,4)	16 (12,2)	0,606	
NEG	222/256 (86,7)	52 (96,3)	80 (81,6)	90 (86,5)		107 (85,6)	115 (87,8)		
<i>CBFb-MYH11</i>									
POS	13/252 (5,2)	2 (3,7)	3 (3,1)	8 (7,8)	0,280	4 (3,3)	9 (6,9)	0,191	
NEG	239/252 (94,8)	52 (96,3)	93 (96,9)	94 (92,2)		118 (96,7)	121 (93,1)		
Rearranjos do <i>KMT2A</i>									
<i>PML-RARa</i>									
POS	34/183 (18,6)	21 (39,6)	7 (11,1)	6 (9,0)	$<0,0001$	15 (18,3)	19 (18,8)	0,928	
NEG	149/183 (81,4)	32 (60,4)	56 (88,9)	61 (91,0)		67 (81,7)	82 (81,2)		
<i>PML-RARa</i>									
POS	37/72 (51,4)	1 (25,0)	16 (48,5)	20 (57,1)	0,579	14 (42,4)	23 (59,0)	0,246	
NEG	35/72 (48,6)	3 (75,0)	17 (51,5)	15 (42,9)		19 (57,6)	16 (41,0)		
Mutações Tipo I									
<i>FLT3</i> (ITD or TKD)									
MUT	49/222 (22,1)	1 (2,1)	18 (20,5)	30 (34,9)	$<0,0001$	23 (21,9)	26 (22,2)	0,955	
WT	173/222 (77,9)	47 (97,9)	70 (79,5)	56 (65,1)		82 (78,1)	91 (77,8)		
<i>KRAS</i>									
MUT	5/223 (2,2)	0 (0,0)	3 (3,4)	2 (2,3)	0,438	3 (2,8)	2 (1,7)	0,572	
WT	218/223 (97,8)	48 (100,0)	85 (96,6)	85 (97,7)		103 (97,2)	115 (98,3)		
<i>NRAS</i>									
MUT	17/207 (8,2)	5 (11,9)	5 (6,2)	7 (8,3)	0,547	7 (7,1)	10 (9,2)	0,595	
WT	190/207 (91,8)	37 (88,1)	76 (93,8)	77 (91,7)		91 (92,9)	99 (90,8)		
<i>c-KIT</i>									
MUT	14/159 (8,8)	2 (4,5)	9 (14,5)	3 (5,7)	0,125	9 (12,5)	5 (5,7)	0,135	
WT	145/159 (91,2)	42 (95,5)	53 (85,5)	50 (94,3)		63 (87,5)	82 (94,3)		
<i>PTPN11</i>									
MUT	15/153 (9,8)	1 (6,7)	6 (40,0)	8 (53,3)	0,184	11 (73,3)	4 (26,7)	0,068	
WT	138/153 (90,2)	37 (26,8)	52 (37,7)	49 (35,5)		67 (48,6)	71 (51,4)		

* O número total de casos analisados reflete a disponibilidade de material biológico para testes moleculares; POS, positivo; NEG, negativo; MUT, mutado; WT, wild type; ITD, duplicações in tandem; TKD, domínio da tirosina quinase

Tabela 2. Características clínico-laboratoriais dos casos com mutação no *PTPN11*

	<i>PTPN11</i> -mutado n(%)	<i>PTPN11</i> -selvagem n(%)	p
Idade (anos)			
≤ 2	1 (6,7)	37 (26,8)	0,184
$>2-10$	6 (40,0)	52 (37,7)	
≥ 11	8 (53,3)	49 (35,5)	
Leucometria ($\times 10^9/l$)			
≤ 50	11 (73,3)	93 (67,9)	0,666
>50	4 (26,7)	44 (32,1)	
Cor da pele			
Branca	5 (33,3)	56 (40,6)	0,586
Não Branca	10 (66,7)	82 (59,4)	
Gênero			
Masculino	11 (73,3)	67 (48,6)	0,068
Feminino	4 (26,7)	71 (51,4)	
Classificação morfológica			
LMA minimamente diferenciada	1 (6,2)	7 (5,9)	0,253
LMA sem maturação	1 (6,2)	6 (3,3)	
LMA com maturação granulocítica	0 (0,0)	27 (15,0)	
LMA promielocítica	1 (6,2)	42 (23,3)	
LMA mielomonocítica aguda	9 (56,2)	49 (27,2)	
LMA monoblastica	2 (12,5)	27 (15,0)	
LMA eritroblastica	0 (0,0)	5 (2,8)	
LMA megacarioblastica	1 (6,2)	12 (6,7)	
LMA sem especificação	1 (6,2)	5 (2,8)	
Alterações tipo II*			
Presente	2 (16,7)	61 (50,0)	0,027
Ausente	10 (83,3)	61 (50,0)	

LMA, leucemia mieloide aguda *As alterações tipo II incluem as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, e Rearranjos do *KMT2A*.

Tabela 3. Análise univariada dos parâmetros de sobrevida global dos casos de LMA pediátrica

	N (N de eventos)	Análise univariada		p ^b	
		5-year pOS, (SE)	Mediana*, (95% CI)		
Regiões Geográficas^a					
Nordeste	82 (45)	30,4 (6,5)	15,2 (8,3-22,0)	0,002	
Sul	10 (2)	75,0 (15,3)			
Sudeste	47 (18)	54,3 (8,4)			
Centro-Oeste	67 (43)	8,7 (6,8)	5,7 (3,9-7,4)		
Faixa etária (anos)^a					
≤ 2	54 (24)	33,9 (11,8)	34,1 (15,1-53,2)	0,068	
$>2-10$	70 (30)	33,8 (7,1)	15,4 (7,5-23,3)		
≥ 11	82 (49)	27,4 (5,7)	6,63 (2,4-10,8)		
Cor da pele^a					
Branca	87 (40)	38,1 (8,2)	21,3 (0,0-48,7)	0,009	
Não Branca	119 (68)	25,0 (5,1)	7,66 (2,8-12,5)		
Gênero^a					
Masculino	106 (59)	27,8 (5,8)	11,5 (6,2-16,7)	0,401	
Feminino	100 (49)	35,8 (6,4)	15,76 (7,8-23,6)		
Leucometria ($\times 10^9/l$)^a					
≤ 50	205 (108)	33,7 (5,1)	15,2 (8,1-22,2)	0,967	
>50	143 (72)	27,8 (7,4)	10,9 (6,5-15,3)		
Classificação morfológica					
M0	13 (5)	45 (16,6)	15,3 (0,0-41,94)	0,414	
M1	12 (4)	45 (21,1)	30,5 (0,0-65,39)		
M2	38 (22)	34,1 (8,6)	8,0 (0,3-15,69)		
M4	69 (39)	25,8 (7,7)	11,1 (1,69-20,5)		
M5	42 (20)	39,7 (9,2)	15,2 (1,99-18,40)		
M6	5 (3)	30 (23,9)	23,2 (0,0-50,23)		
M7	19 (12)	23,7 (11,1)	2,6 (0,0-5,29)		
M8	8 (3)	44,4 (22,2)	41,5 (0,0-112,5)		
Mutações tipo II^a					
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	30 (18)	23,8 (10)	11,4 (0,0-23,8)		0,585
<i>CBFb-MYH11</i>	13 (4)	67,1 (13,5)	*		
Rearranjo do <i>KMT2A</i> ^a	31 (18)	17,6 (10,4)	10,6 (0,0-21,76)		
Mutações tipo I^a					
<i>FLT3</i>	28 (17)	27,1 (10)	11,2 (7,1-15,2)	0,837	
<i>KRAS</i>	5 (4)	20 (17,9)	13,36 (0,0-41,8)		
<i>NRAS</i>	16 (6)	57,4 (13,4)	*		
<i>c-KIT</i>	13 (5)	53,7 (16,2)	*		
<i>PTPN11</i>	14 (12)	0,0 (0,0)	3,33 (0,0-7,16)		
Mutações tipo I concomitantes^a					
Única mutação	60 (30)	38,2 (7,4)	11,2 (5,78-16,61)	0,090	
Mais de uma alteração	7 (6)	14,3 (13,2)	2,36 (0,0-5,78)		

^a Média de sobrevida em meses. ^b valores do teste log-rank indicam se as diferenças são significativas entre os subgrupos. Excluindo subtipo de leucemia promielocítica aguda. *Análise realizada entre grupos positivos e negativos para a alteração molecular. Mediana não alcançada. Intervalos de confiança não definidos. CI, intervalo de confiança; N, número; pOS, Probabilidade de sobrevida global; SE, erro padrão.

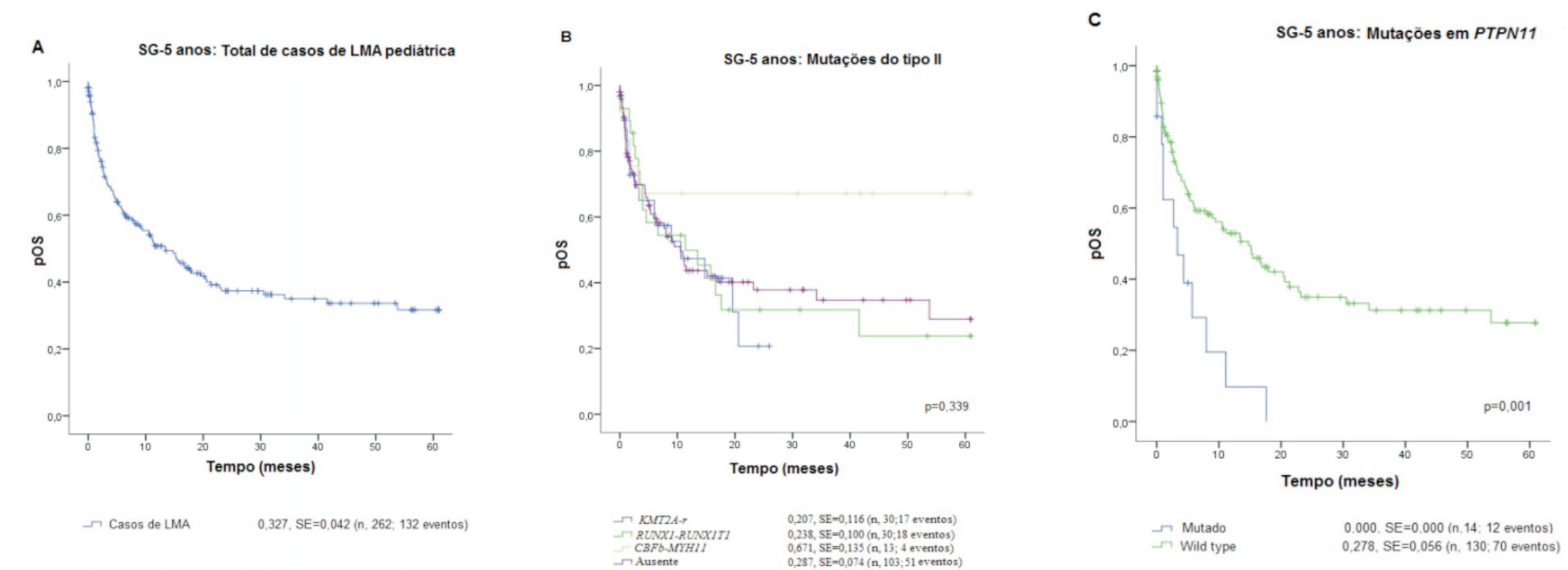


Figura 3. Sobrevida global (SG) em 5 anos dos casos de LMA pediátrica incluídos no estudo. (A) SG do total de casos de LMA excluindo o subtipo de leucemia promielocítica aguda. (B) SG dos casos com mutações tipo II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, rearranjos do *KMT2A*) e sem as alterações tipo II investigadas (ausente). (C) SG dos casos com mutações no gene *PTPN11*. pOS, Probabilidade de sobrevida global; SE, Erro padrão.

CONCLUSÃO

A identificação de novos marcadores genéticos demonstra uma grande relevância para o conhecimento do perfil genético e biológico da LMA no Brasil. Mutações no *PTPN11* estão associadas à menor sobrevida em pacientes pediátricos com LMA podendo contribuir para estratificação de risco e alvos terapêuticos.