

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA A ANÁLISE DAS PRINCIPAIS REGIÕES DE INTERESSE CLÍNICO ASSOCIADAS A NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS DO GENE MPL

Felipe Siviero Barbosa (PIBITI/UEM), e-mail: ra117388@uem.br, José Renato Pattaro Júnior (Co-Orientador), e-mail: pg70488@uem.br, Quirino Alves de Lima Neto, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Laboratório de Imunogenética Bioquímica e Biologia Molecular

Palavras-Chave:

MPL,

mutação,

PCR.

Introdução

Doenças mieloproliferativas têm origem na medula óssea, quando células-tronco maduras sofrem mutações e passam a se proliferar descontroladamente, suplantando o lugar das células saudáveis. O gene *MPL* fornece instruções para produzir a proteína receptora de trombopoietina, que promove o crescimento e a divisão das células, porém está altamente associado ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas (MPNs) com alterações em códons bastante heterogêneas, o que impossibilita o uso das diversas análises que usam PCR como base. A técnica mais indicada para detectar diversos alvos simultaneamente, é o sequenciamento de nova geração (NGS), mas esta técnica não está amplamente disponível à população, devido ao alto custo e tempo de espera prologado. Assim, o laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM) está desenvolvendo um painel genético para NGS envolvendo os principais genes associados às MPNs, onde o gene *MPL* foi um dos selecionados para fazer parte do kit em conjunto com outros 8 genes.

Potencial de Mercado e Diferencial Competitivo

Acreditamos que em um breve período de tempo, a tecnologia de análise em larga escala substituirá boa parte dos atuais procedimentos e poderá ser financiada pelo SUS. Assim, com o desenvolvimento deste painel, com *primers* que identificam mutações no éxon 10 do gene *MPL*, tanto o setor público quanto o privado serão beneficiados com um produto mais barato e com as facilidades de logística de insumos produzidos nacionalmente.

Considerações Finais

O resultado foi satisfatório em relação a padronização de *primers* que amplificam efetivamente região *hotspot* de mutações no éxon 10 do gene *MPL* associada a NMPs, e estes *primers* poderão ser anexados ao painel em desenvolvimento. Assim, um diagnóstico mais completo poderá ser alcançado utilizando um painel de sequenciamento mais amplo, sendo capaz de detectar mutações genéticas associadas ao maior risco de transformação leucêmica relacionadas ao gene *MPL*, podendo ser útil no prognóstico e, ao mesmo tempo, fornecendo um exame de sequenciamento mais acessível.

Problema

Análises de NGS são apenas realizadas em grandes centros utilizando painéis importados, o que as torna caras e demoradas. Para o desenvolvimento do painel NGS nacional aqui no LIG-UEM, cada gene que irá compô-lo está sendo validado separadamente. Assim, neste trabalho foi padronizada a amplificação por PCR de uma região *hotspot* do éxon 10 de mutações associadas a NMPs do gene *MPL*.

Estágio de Desenvolvimento da Tecnologia

TRL/MRL 4. A validação da amplificação foi realizada em ambiente de laboratório utilizando experimentos básicos para um laboratório de biologia molecular. Foi verificada uma boa amplificação que foi reproduzida com amostras de diferentes pacientes e os *primers* para o gene *MPL* puderam ser multiplexados com os *primers* para o gene *HGH* sem problemas.

Solução e Benefícios

Os *primers* específicos e as condições utilizadas na PCR amplificaram com êxito a região do éxon 10 do gene *MPL* (Figura 1). Assim, poderá ser incorporado ao painel de genes que está em desenvolvimento pelo LIG-UEM.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho. Também, aos professores Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer e Dr. José Renato Pattaro Júnior pelos conhecimentos transmitidos ao longo de toda pesquisa.

Contato Institucional

Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Ciências Básicas da Saúde
sec-dbs@uem.br (44) 3011-4833

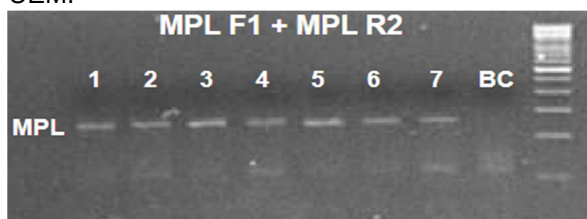


Figura 1. Teste final de amplificação do gene MPL para busca de mutações no éxon 10 com os pares de primers F1 + R2

