

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES *NPM1* E *CEBPA* EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

Guilherme Henrique da Silva Cavilha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (Coorientadora), Quirino Alves de Lima Neto (Orientador), E-mail: ra125087@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Imunologia/ Imunogenética

Palavras-chave: Biotecnologia; Leucemia mieloide aguda; Reação em Cadeia de Polimerase.

RESUMO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica complexa, caracterizada pela proliferação descontrolada de precursores mieloides. Este estudo teve como objetivo padronizar uma reação baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA*. A metodologia envolveu a otimização de vários parâmetros, como a concentração de $MgCl_2$, que é essencial para a atividade da enzima *Taq* polimerase e afeta a especificidade e eficiência durante a amplificação. A concentração de DNA também foi ajustada para garantir uma amplificação robusta, evitando falhas ou amplificações inespecíficas. Além disso, a temperatura de anelamento foi cuidadosamente calibrada para maximizar a ligação dos *primers* aos *templates* de DNA, resultando em uma amplificação precisa. As reações de PCR com os pares de primers 05, 06, 07 e 08 para o gene *NPM1* seguiram conforme esperado, mostrando-se eficazes e reprodutíveis, o que sugere a adequação das condições experimentais utilizadas para essas situações específicas. Porém as reações dos pares de *primers* de F1xR4 de *NPM1* e de F1xR5 para *CEBPA* apresentaram falhas ou inconsistências, sendo necessários mais testes. Os resultados mostram que, com a otimização adequada dos fatores que afetam a PCR foi possível estabelecer um protocolo eficaz e sensível, capaz de detectar mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA* de forma confiável.

INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença que se caracteriza pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas imaturas, resultando na produção excessiva de células sanguíneas anormais, que compromete a produção normal de não só de glóbulos

vermelhos, mas também de glóbulos brancos, ou seja, é uma doença neoplasia hematopoiética. Algumas mutações são mais frequentemente relacionadas, como nos genes *NPM1* e *CEBPA*. O gene *NPM1* codifica a nucleofosmina, uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular e resposta ao estresse. O gene *CEBPA* é codifica o fator de transcrição CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), que está relacionado com a regulação da mielopoiese, envolvido na determinação da linhagem celular, ativação de genes e proliferação celular. Ambas as mutações oferecem informações valiosas para o diagnóstico e prognóstico da Leucemia Mieloide Aguda (LMA), auxiliando na personalização do tratamento (NINGOMBAM et al., 2023). Técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são de grande importância no diagnóstico de LMA, pois determinam as mutações presentes, o que pode ser usado para diferenciação e caracterização de neoplasias hematopoiéticas (HAMERSCHLAK, 2008). Sendo assim, este projeto tem como objetivo desenvolver uma metodologia padronizada para detecção de mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA* em pacientes com LMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sequências dos genes *NPM1* e *CEBPA* foram obtidas do GenBank. As sequências foram analisadas usando ferramentas de bioinformática para a construção de *primers*, como Primer-BLAST, Multiple Primer Analyzer e OligoAnalyzer. As amostras de pacientes com LMA foram submetidas a extração de DNA pelo kit Biopur.

Para a padronização da PCR, os reagentes usados tiveram concentrações que variaram durante os testes para otimizar a amplificação dos genes, dessa forma as reações realizadas (volume final de 20 μ L) incluíram água de injeção, MgCl₂, dNTP, DMSO, *primers específicos* e de controle interno, *Taq* DNA polimerase e tampão.

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador. As condições de ciclagem foram de 95 °C - 10 min., seguido de 30 ciclos a 95 °C – 30 s, (58 °C / 60 °C / 62 °C / 64 °C) – 30 s, 72 °C – 60 s e a extensão final de 72 °C - 10 min. Já a visualização dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Syber Safe* e analisado com um marcador de peso molecular de 50 pares de bases (pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *NPM1* está localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35.1) e possui 23.785 pares de bases, enquanto o gene *CEBPA* está no braço longo do cromossomo 19 (19q13.11) com 3.801 pares de bases. Para o gene *NPM1*, oito pares de *primers* foram desenhados para amplificar as regiões codificantes, com tamanhos variando de 19 a 25 pb, T_m entre 57,77 e 60,81 °C, e conteúdo de citosina e guanina entre 41,67% e 63,16%, gerando fragmentos de 543 a 1.117 pb. Para o gene *CEBPA*, foram desenhados cinco pares de *primers*, com tamanhos

variando de 19 a 22 pares de bases. As temperaturas de *melting* (T_m) ficaram entre 60,04 e 63,18 °C, com um conteúdo de citosina e guanina entre 52,38% e 63,16%. Os fragmentos amplificados produzidos por esses *primers* variaram de 574 a 851 pares de bases. As reações para cada par de *primers* foram testadas com a variação na temperatura de anelamento, que foram de 58 °C, 60 °C, 62 °C e 64 °C. As concentrações dos reagentes usados estão listadas na tabela 01.

Tabela 01 – Concentrações dos reagentes utilizados nas reações em cadeia da polimerase e temperaturas otimizadas para cada par de *primer* para os genes *NPM1* e *CEBPA*

	F1xR4 NPM1	F5xR5 NPM1	F6xR6 NPM1	F7xR7 NPM1	F8xR8 NPM1	F1xR5 CEBPA
H ₂ O de injeção	q.s.p. 20 µL	q.s.p. 20 µL	q.s.p. 20 µL	q.s.p. 20 µL	q.s.p. 20 µL	q.s.p. 20 µL
Tampão de PCR	*	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂	*	1,5 mM	1,5 mM	1,0 mM	2,0 mM	1,5 mM
dNTPs	0,25mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
Primer Foward específico	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
Primer Reverse específico	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
Taq DNA polimerase	0,1 U	0,1 U	0,1 U	0,1 U	0,1 U	0,1 U
Amostra de DNA (~ng/µL)	*	100	100	50	50	150
DMSO	*	0	0	2,5%;	0	0
Temperatura de Anelamento	*	64	62	62	60	60

* Em nenhuma das condições testadas apresentou-se formação de bandas quando vistas no gel.

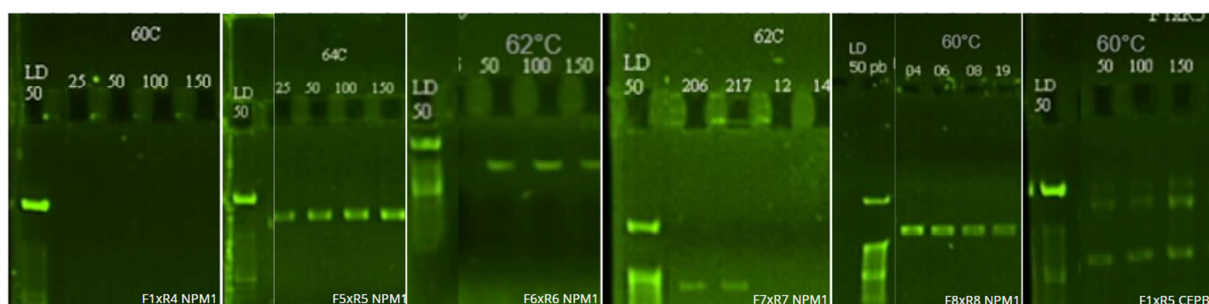


Figura 1 –Foto dos geis mostrando bandas específicas para produto da PCR para os pares de primers dos genes NPM1 e CEBPA nas melhores temperaturas de anelamento. LD 50pd: Ladder de 50 pares de bases; amostras de DNA alinhadas (concentrações de 25, 50, 100 e 150 mg/µL).

Os resultados obtidos ao longo do experimento demonstraram a complexidade e a sensibilidade das reações estudadas, evidenciando como fatores como a contaminação e as variáveis experimentais podem impactar significativamente os resultados. As reações de PCR com os pares de primers 05, 06, 07 e 08 para o gene NPM1 seguiram conforme esperado, mostrando-se eficazes e reprodutíveis, as concentrações dos reagentes usados estão em conformidade a literatura, o que sugere a adequação das condições experimentais utilizadas para essas situações específicas. Porém as reações dos pares de primers de F1xR4 de NPM1 e de F1xR5 para CEBPA apresentaram falhas ou inconsistências, o que reforça a necessidade de otimização dos protocolos, como uma nova escolha dos primers

usados além de que as regiões desses genes apresentam região significativamente grandes para ampliação. Além dos reagentes da PCR, tempo de reação também é parâmetro crítico que influenciam diretamente a eficiência, especificidade, e qualidade da amplificação (MONTGOMERY; WITTEWER, 2014).

CONCLUSÕES

A otimização adequada dos fatores que afetam a PCR, como (Temperatura de anelamento, Tampão de PCR, $MgCl_2$, Concentração de DNA, DMSO) possibilitou o estabelecimento de um protocolo eficaz e sensível, capaz de detectar mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA* de forma confiável, porém mais testes são necessários.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a fundação UEM pelo apoio financeiro, também agradeço imensamente a minha coorientadora Aléia Yamanaka por me acompanhar e ao professor Quirino Neto pelo projeto.

REFERÊNCIAS

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. S52–S57, ago. 2008.

MONTGOMERY, J. L.; WITTEWER, C. T. Influence of PCR Reagents on DNA Polymerase Extension Rates Measured on Real-Time PCR Instruments. **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 334–340, 1 fev. 2014.

NINGOMBAM, A. et al. Prognostic relevance of NPM1, CEBPA, and FLT3 mutations in cytogenetically normal adult AML patients. **American Journal of Blood Research**, v. 13, n. 1, p. 28–43, 15 fev. 2023.