

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *RUNX1* EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Rodrigo Takashi Ohara (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giovana de Rossi (PBF/UEM),
Quirino Alves de Lima Neto (Orientador). E-mail: qalneto@uem.br.

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

Imunologia/Imunologia Aplicada

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Aguda; Gene *RUNX1*; Diagnóstico Molecular.

RESUMO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica que deriva da diferenciação e proliferação anormal das células-tronco hematopoiéticas, mediante mutações (BONNET, 1997). Algumas dessas alterações atingem o gene *RUNX1*, codificador da proteína Runx1, essencial para a hematopoiese (KOUCHKOVSKY, 2016). Portanto, identificar essas alterações é essencial para validação do diagnóstico da neoplasia, além de prognósticos e tratamentos melhor direcionados. Assim, o projeto objetivou desenvolver uma metodologia para detecção de mutações no gene *RUNX1*. As amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes portadores de LMA de diferentes locais da cidade de Maringá, PR. Foram desenhados *primers* por meio de *softwares* de bioinformática, a partir dos quais foram padronizadas as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ao fim do projeto, foi possível otimizar as reações para cada par de *primers*, contudo, um novo projeto deve ser realizado para avaliar a frequência dessas mutações em pacientes portadores de LMA, além de possibilitar a padronização da técnica de sequenciamento do gene por meio de Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica que se origina da alteração de blastos, caracterizada pela expansão clonal de células incapazes de se diferenciarem em células maduras e sofrerem apoptose (BONNET, 1997). A causa da transformação envolve diversas mutações genéticas, dentre elas, alterações no gene *RUNX1*, codificador da proteína Runx1, importante no decorrer processo de hematopoiese (KOUCHKOVSKY, 2016).

Portanto, identificar essas alterações é de grande importância para validar o diagnóstico da neoplasia, bem como para melhorar o direcionamento de prognósticos e tratamentos. Assim, o presente projeto objetivou desenvolver uma metodologia para detectar mutações no gene *RUNX1*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Amostras de sangue e extração de DNA

As amostras de sangue utilizadas foram obtidas de pacientes portadores de LMA, sem antecedente familiar de leucemias, atendidos no Hospital do Câncer, no ambulatório do Serviço de Hematologia da Elo Oncologia Integral e Pesquisa Clínica e no Hospital Paraná, localizados na cidade de Maringá, PR. As amostras foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e armazenadas em freezer a -200 °C.

A partir do sangue total, foi extraído o DNA de leucócitos, usando o kit QIAmp (Quiagen®, CA, USA), seguindo as instruções oferecidas pelo fabricante. A concentração e a qualidade das amostras foram avaliadas por espectrofotometria a 260nm e 280nm.

Os participantes foram esclarecidos quanto ao propósito do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A pesquisa foi executada dentro das normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá.

2) Design de primers para o gene *RUNX1*

Foi realizada uma busca da sequência FASTA do gene *RUNX1*, no *GeneBank* para desenho de *primers* específicos que flanqueiam as regiões mutadas de interesse.

As melhores sequências foram avaliadas usando os *softwares* *Primer-BLAST*, *Multiple Primer Analyzer* e *OligoAnalyzer*. O uso dessas ferramentas possibilitou a determinação da temperatura de *melting*, proporção de citosina/guanina, formação de fragmentos de DNA inespecíficos, *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*.

3) Padronização da técnica de detecção das mutações no gene *RUNX1*

Foi realizada a padronização da reação baseada em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), determinando os melhores volumes de água, *Buffer*, dNTP, MgCl₂, *Taq* Polimerase e DNA, bem como as melhores condições de ciclagem, para cada um dos pares de *primers* adquiridos. Como controle para as reações, foi usado o gene do Hormônio do Crescimento Humano (*HGH*). Ao fim de cada reação, empregou-se a eletroforese em gel de agarose corado com SYBRTM Safe a 100V - 300mA - 150W para análise dos *amplicons*, permitindo otimizar as condições da técnica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o desenho, análise e seleção dos *primers*, foram adquiridos os pares de iniciadores.

A partir dos *primers* obtidos foram padronizadas as reações de PCR para amplificação dos éxons de interesse. Através dos experimentos de otimização, as

concentrações de reagentes e melhores condições de ciclagem foram determinadas, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Temperatura, Tempo e Ciclagem das Reações de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Ciclagem
Desnaturação Inicial	95	60	1x
Desnaturação	95	30	35x
Anelamento	**	30	
Extensão	72	90	
Extensão Final	72	30	1x

** : Para os pares F1.1/R1.1, F1.2/R1.2, F2/R2, F3/R3.1, F3/R3.2, F4/R4 e F5/R5 = 60°C; para o par F6/R6 = 56°C.

Dada a importância do gene *RUNX1* no processo de hematopoiese e as dificuldades relacionadas a detecção de suas mutações, visto que, a análise de alterações no gene ainda não é padronizada, podendo ser feita com o emprego das técnicas de FISH e da RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)(MERKER, 2010), desenvolver uma metodologia padronizada para detectar mutações no gene *RUNX1* é de extrema importância para melhorar suas identificações e contribuir para o diagnóstico da LMA.

CONCLUSÕES

Com base nas reações realizadas foi possível padronizar a reação de PCR para os pares de *primers* avaliados. Contudo, um novo projeto deve ser realizado para avaliar a frequência dessas mutações na população da região, bem como padronizar a técnica de sequenciamento do gene por NGS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à CAPES pelo financiamento do projeto de iniciação científica. Além disso, estendo minha gratidão ao professor orientador Quirino Alves de Lima, à mestrande Giovana de Rossi Palma e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (Imunogen) pelos conhecimentos transmitidos durante a elaboração do trabalho.

REFERÊNCIAS

BONNET D., DICK JE. **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** Nat Med. 1997 Jul;3(7):730–7.

KOUCHKOVSKY I De, Abdul-Hay M. **Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.** Blood Cancer J. 2016 Jul 1;6(7):1–10.

MERKER J. D., ARBER D. A. **Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory.** Elsevier, 2010. p. 243-260.