

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE *PRIMERS* PARA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES DE INTERESSE CLÍNICO DE *DNMT3A* COM ASSOCIAÇÕES ÀS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Leonardo Antonio Chimirri da Silva (PIC/UEM), Lorena Maia da Silva (PIC/UEM), Ma. Giovana Paola Zaccarias Bemvides (Coorientadora), Dr. Quirino Alves de Lima Neto (Participante), Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora). E-mail: jelvisentainer@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Imunologia /Imunogenética.

Palavras-chave: Imunogenética; Primers do DNA; Reação em Cadeia da Polimerase.

RESUMO

O trabalho busca compreender mutações do gene *DNMT3A* que estão associadas às Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs), doenças que se originam na medula óssea quando as células-tronco sofrem mutações e proliferam descontroladamente, suplantando as células saudáveis para a análise de mutações se faz necessário desenvolver *primers* buscando as regiões do gene *DNTM3A* mais relevantes e associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloides. Com base nessa premissa, o Imunogen-UEM propõe um painel de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) direcionado aos éxons das principais mutações de interesse clínico de *DNMT3A*. Atualmente, o NGS é a principal técnica escolhida para o diagnóstico abrangente e de alta resolução das principais mutações associadas ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas, fornecendo informações sobre o *status* mutacional de vários genes para auxiliar na classificação, prognóstico e decisões terapêuticas. As regiões prioritárias foram mapeadas a partir do ClinVar; doze pares de *primers* foram construídos e submetidos à otimização experimental por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), avaliação do rendimento e checagem de especificidade por eletroforese. A identidade dos *amplicons* foi confirmada por sequenciamento de Sanger, consolidando a especificidade do ensaio. A seleção de alvos inclui regiões vinculadas a domínios funcionais que dialogam com a biologia das NMPs. O conjunto de dados sustenta a viabilidade técnica de incorporar *DNMT3A* ao futuro painel de NGS do laboratório, com potencial para ampliar o acesso diagnóstico, reduzir o intervalo entre suspeita e confirmação molecular e qualificar a estratificação de risco. Conclui-se que o *pipeline* estabelecido é reprodutível, escalável e alinhado para detecção de mutações em regiões-alvo.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) compõem um grupo de cânceres hematológicos decorrentes da aquisição sequencial de lesões genéticas, mutações, em células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTHs/HSPCs), as NMPs exigem caracterização molecular precisa para subsidiar diagnóstico, estratificação prognóstica e decisões terapêuticas (JACQUELIN *et al.*, 2018 / STEGELMANN *et al.*, 2011). Entre os principais motores moleculares dessas doenças, destacam-se as mutações em genes da via epigenética, em especial no *DNA metiltransferase 3A* (*DNMT3A*), cuja participação é notória em NMPs avançadas e na leucemia mieloide aguda (McNAMARA *et al.*, 2018). Do ponto de vista diagnóstico, a identificação acurada dessas alterações exige abordagens de alta resolução, como o painel de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que se consolidou como técnica de referência por permitir, em um único ensaio, a análise simultânea de múltiplos genes implicados nas NMPs - incluindo *DNMT3A* - com excelente sensibilidade analítica. Contudo, os custos e a concentração de infraestrutura em grandes centros limitam o acesso amplo da população, criando um gargalo entre a necessidade clínica e a oferta tecnológica (LASHO *et al.*, 2018). Nesse cenário, o Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (Imunogen-UEM) está desenvolvendo um painel genético para NGS direcionado aos principais genes associados às NMPs, com inclusão estratégica de *DNMT3A*. A proposta visa transformar conhecimento em produto e serviço acessíveis, ampliando a cobertura diagnóstica e encurtando o tempo até decisões terapêuticas potencialmente modificadoras de desfecho. O objetivo específico deste estudo é projetar e validar *primers* para as regiões mais relevantes do *DNMT3A* no contexto das NMPs, fortalecendo a capacidade local de triagem molecular, favorecendo o manejo individualizado e, por consequência, contribuindo para melhores prognósticos em uma doença frequentemente quimiorrefratária e de curso clínico desafiador.

MATERIAIS E MÉTODOS

Primers forward e *reverse* de 10 éxons do *DNMT3A* foram construídos realizando busca da sequência FASTA no GeneBank do NCBI para certificação que flanqueariam as regiões mutadas dos genes de interesse. As melhores sequências foram avaliadas por meio do *Primer-BLAST*, *Multiple Primer Analyzer* e *OligoAnalyzer*, que permitiram determinar a temperatura de *melting* adequada, entre 50 e 65°C, a proporção de citosina/ guanina (50-60%) e a formação de fragmentos de DNA inespecíficos, como *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*. Com aprovação do Comitê de Ética, e com aceite do TCLE, sangue periférico de pacientes com neoplasias mieloproliferativas foi coletado e o DNA extraído através do kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen®, USA). Concentração e qualidade das amostras foram analisadas em Nanodrop 2000 (Thermofisher®, USA). Os *primers* foram otimizados em PCR quanto à temperatura de anelamento, concentração de MgCl₂, tempo de extensão, rendimento da reação, tamanho do *amplicon* e especificidade em eletroforese em gel de agarose 2% corado com SybrSafe (Invitrogen®, USA). As sequências foram validadas via Sequenciamento de Sanger.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa validação é um passo fundamental para assegurar a especificidade e a eficácia dos *primers* desenvolvidos na detecção das regiões de interesse do *DNMT3A* (STEGELMANN *et al.*, 2011).

As mutações no gene *DNMT3A* frequentemente se localizam em domínios proteicos de grande importância, como o domínio metiltransferase e o motivo PWWP (JACQUELIN *et al.*, 2018). Os éxons 3 e 4, incluídos em nossa padronização, estão associados a uma porção do motivo PWWP, um domínio relevante para a função do *DNMT3A* (STEGELMANN *et al.*, 2011). Enquanto a seleção dos éxons 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 visa cobrir outras áreas significativas para uma compreensão mais abrangente da patogênese das MPNs. O sequenciamento de Sanger dos *amplicons* gerados pelos *primers* produzidos, confirmou a amplificação das regiões de DNA alvo, validando o desenho dos *primers* e a otimização das condições de PCR para essas regiões específicas.

A identificação precisa de mutações no *DNMT3A* é crucial, uma vez que a ordem de aquisição dessas mutações pode influenciar o fenótipo clínico das MPNs, como a apresentação com trombocitemia essencial ou policitemia vera (NANGALIA *et al.*, 2015). Além disso, a perda de função do *DNMT3A*, frequentemente cooperando com mutações como *JAK2V617F*, pode impulsionar a progressão da doença para mielofibrose letal, através da ativação de *enhancers* e sinalização inflamatória (JACQUELIN *et al.*, 2018). Portanto, a capacidade de detectar essas alterações pode ter um impacto significativo nas decisões de tratamento e no prognóstico dos pacientes.

Assim, a padronização e validação dos *primers* para os éxons selecionados do *DNMT3A* constituem um passo fundamental na criação de ferramentas diagnósticas mais eficientes e acessíveis para as neoplasias mieloproliferativas. Este trabalho alinha a pesquisa com a necessidade de identificação precoce de marcadores prognósticos e terapêuticos, contribuindo para a medicina de precisão em MPNs (JACQUELIN *et al.*, 2018).

CONCLUSÕES

Portanto, o conjunto de *primers* concebidos para os dez éxons de *DNMT3A* (3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) revelaram-se tecnicamente consistentes: os produtos amplificados foram únicos e reproduzíveis entre replicatas, com identidade confirmada por sequenciamento de Sanger, fornecendo a padronização necessária para sua futura integração ao painel de NGS do Imunogen-Uem. A robustez do ensaio foi demonstrada por ajustes finos nos parâmetros críticos de PCR e por controle analítico dos *amplicons*, resultando em desempenho compatível com rotinas de construção de bibliotecas. Sob a perspectiva translacional, a cobertura dirigida dessas regiões de *DNMT3A* tende a tornar o rastreo genômico mais factível e escalável em neoplasias mieloproliferativas, reduzindo o intervalo entre a suspeita clínica e a confirmação

molecular e oferecendo base objetiva para a estratificação do prognóstico e a tomada de decisão terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos nossos orientadores Dra. Jeane Visentainer e Dr. Quirino Alves de Lima Neto e à coorientadora Ma. Giovana Bemvides pelos ensinamentos, bem como aos demais membros do Laboratório de Imunogenética da UEM (Imunogen – UEM) e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

JACQUELIN, S.; STRAUBE, J.; COOPER, L.; et al. **Jak2V617F and Dnmt3a loss cooperate to induce myelofibrosis through activated enhancer-driven inflammation.** *Blood*, v. 132, n. 26, p. 2707–2721, 2018. DOI: 10.1182/blood-2018-04-846220.

LASHO, T. L.; MUDIREDDY, M.; FINKE, C. M.; et al. **Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms.** *Blood Advances*, v. 2, n. 4, p. 370–380, 2018. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018015875.

McNAMARA, C. J.; PANZARELLA, T.; KENNEDY, J. A.; et al. **The mutational landscape of accelerated- and blast-phase myeloproliferative neoplasms impacts patient outcomes.** *Blood Advances*, v. 2, n. 20, p. 2658–2671, 2018. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018021469.

NANGALIA, J.; NICE, F. L.; WEDGE, D. C.; et al. **DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype.** *Haematologica*, v. 100, n. 11, p. e438–e442, 2015. DOI: 10.3324/haematol.2015.129510.

STEGELMANN, F.; BULLINGER, L.; SCHLENK, R. F.; et al. **DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, v. 25, n. 7, p. 1217–1219, 2011. DOI: 10.1038/leu.2011.77.