DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *IDH2* EM INDIVÍDUOS COM LEUCEMIA MIELOIDE

Rodrigo Takashi Ohara (PIBIC/CNPq/FA/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; *IDH2*; Mutações somáticas;

RESUMO

A Hematopoiese clonal (HC) é um processo decorrente de mutações em células-tronco ou progenitoras, considerado o mecanismo inicial para o desenvolvimento da leucemia mieloide (LM). Esse fenômeno pode estar relacionado a mutações no gene *IDH2*, codificador da enzima isocitrato-desidrogenase-2 (IDH2), envolvida no ciclo de Krebs. Essa enzima, quando mutada, altera o processo de diferenciação celular. Estudos recentes demonstram que identificar essas mutações pode contribuir para diagnósticos mais precisos e tratamentos individualizados. O projeto buscou desenvolver uma metodologia para detectar e avaliar mutações no gene *IDH2* em indivíduos com LM. Para isso, pares de *primers* foram desenhados com auxílio de *softwares* de bioinformática e Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram conduzidas para padronização e otimização, visando as melhores condições para amplificação do fragmento. A padronização final se deu com 0,4 µL de cada *primers* (10 µM) e 0,5 µL de $MgCl_2$ (50 mM), com a temperatura de anelamento de 58ºC.

INTRODUÇÃO

O processo de Hematopoiese clonal (HC) é decorrente de mutações em células-tronco ou progenitoras e trata-se do primeiro mecanismo para o desenvolvimento das leucemias mieloides (LM), contudo, também é considerado um processo natural do envelhecimento (CHAN, 2024). As Leucemias Mieloides (LM) são neoplasias malignas caracterizadas pela expansão clonal desordenada de leucócitos ou de blastos mutantes da linhagem mieloide na medula óssea e/ou no sangue periférico (HOFFMAN, 2023). A HC já foi relacionada com mutações em diferentes genes, incluindo o gene *IDH2* (KHOURY, 2022).

O gene *IDH2* é responsável por codificar a enzima isocitrato-desidrogenase-2 (IDH2), membro da família de enzimas isocitrato desidrogenase (IDH1, IDH2 e IDH3), localizada nas mitocôndrias celulares. A IDH2 participa do ciclo de Krebs como uma enzima chave responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa de isocitrato em α-cetoglutarato (α-KG) (QIN, 2024). Quando mutada, IDH2 resulta na produção anormal de 2-hidroxiglutarato (2HG), um inibidor competidor análogo de α-

KG que impede a ação de outras enzimas dependentes de α-KG e resulta em metilação anormal do DNA e histonas, em alteração da expressão genética e em danos na diferenciação de células-tronco (QIN, 2023).

As principais mutações da proteína IDH2 ocorrem nas posições 140 e 172, sendo reconhecidas como IDH2R140 (rs121913502) e IDH2R172 (rs1057519906), respectivamente (QIN, 2023). Tais mutações já foram relacionadas com risco de desenvolvimento da Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) e Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) (QIN, 2023; MONDESIR, 2016). Entretanto, novos estudos são necessários para melhor compreensão dos valores prognósticos dessas mutações (QIN, 2023).

Atualmente, o diagnóstico da LM é baseado na presença de achados celulares característicos das neoplasias, seguido de análises citogenéticas e moleculares que comprovem a suspeita clínica e laboratorial (HOFFMAN, 2023). Contudo, os avanços na biologia molecular estão permitindo avanços nos estudos da LM e, consequentemente, possibilitando o surgimento de possíveis tratamentos mais individualizados e com melhor eficácia, dentre os quais está o uso de inibidores da IDH2, como o IDHIFA® (enasidenib) (QIN, 2023)

Diante do discutido, o presente projeto buscou desenvolver uma metodologia que permita a detecção e a avaliação de mutações no gene *IDH2* em indivíduos com LM, a fim de contribuir com o desenvolvimento de um painel de detecção de mutações em pacientes onco-hematológicos e que, portanto, também possibilite a adoção de medidas terapêuticas mais individualizadas e eficazes no futuro.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Design de primers para o gene IDH2

O desenho dos pares de *primers* para as regiões mutantes de interesse foi realizado a partir da busca da sequência FASTA do gene *IDH2*, no Banco de Dados de Genomas (GenBank®).

As sequências foram avaliadas por meio dos *softwares Primer-BLAST* e, *Multiple Primer Analyzer* a fim de determinar a temperatura de *melting* (*Tm*), proporção de citosina/guanina, formação de fragmentos de DNA inespecíficos, *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*, os quais são importantes para avaliação dos *primers*, permitindo a seleção dos melhores pares para as regiões em que se encontram as mutações de interesse. Visando a implementação desse gene em um painel oncohematológico de sequenciamento de nova geração (NGS), os *primers* foram adquiridos com adaptadores *Nextera* em suas extremidades 5'.

2) Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase para avaliar mutações em IDH2

Para padronizar a técnica de PCR para amplificação dos fragmentos de interesse do gene *IDH2* foram avaliadas as melhores concentrações de *primers* e $MgCl_2$, além da temperatura de anelamento, obtendo-se as condições ideias para

realização da técnica. Como controle da reação, foi utilizado o gene do Hormônio do Crescimento Humano (*HGH*).

A avaliação dos *amplicons* foi realizada utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *SYBR*™ *Safe*, a 100V – 300mA – 150 W – 20 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do desenho e análises dos pares de *primers* foram delineados 17 pares de iniciadores, dos quais apenas um foi selecionado e adquirido para realização da padronização da PCR. O par selecionado foi o específico para o éxon 4 do gene *IDH2*, local onde encontram-se as mutações de interesse. O produto da reação de PCR corresponde à 241 pares de base (pb), porém, em conjunto dos adaptadores *nextera* torna-se de 308 pb.

Os experimentos conduzidos para a padronização da PCR concluíram, para o par de *primer* escolhido e para a região de interesse do gene *IDH2*, as melhores concentrações de reagentes e condições de ciclagem, conforme descrito nas tabelas 1 e 2 a seguir. A utilização de volumes de iniciadores maiores resultou na formação de dímeros e a aplicação de volumes maiores de $MgCl_2$ implicou na formação de fragmentos de DNA inespecíficos.

Tabela 1: Concentração e Volume dos Reagentes por Amostra

Reagente (Concentração)	Volume por Amostra	
	IDH2	*HGH*
Água *nuclease-free*	14 µL	13,6 µL
Buffer (10X)	2 µL	2 µL
dNTP (10 mM)	0,6 µL	0,6 µL
Primer F (10 µL)	0,4 µL	0,6 µL
Primer R (10 µL)	0,4 µL	0,6 µL
$MgCl_2$ (50 mM)	0,5 µL	0,5 µL
Taq DNA Polimerase (5 U)	0,1 µL	0,1 µL
DNA (20 ng/µL)	2 µL	2 µL

F: *primer Forward*. R: *primer Reverse*.

Tabela 2: Condições Ciclagem das Reações de PCR para o fragmento de *IDH2*

Etapa	Temperatura (ºC)	Tempo (segundos)	Ciclagem
Desnaturação Inicial	95	60	
Desnaturação	95	30	35x
Anelamento	58	30	
Extensão	72	60	
Extensão Final	72	300	

Considerando a relação das mutações no gene *IDH2* com o desenvolvimento da LM e a necessidade da maior compreensão do papel dessas alterações no prognóstico dos pacientes, possibilitando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais individualizadas e eficazes (QIN, 2023), o desenvolvimento de uma metodologia padronizada para detecção das mutações de *IDH2* é de extrema importância.

CONCLUSÕES

Com base nos experimentos conduzidos foi possível padronizar a PCR para o par de *primers* avaliados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à CAPES por financiar o projeto de iniciação científica realizado. Ademais, estendo minha gratidão ao professor orientador Quirino Alves de Lima, à mestranda Giovana de Rossi Palma e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (Imunogen) pelo apoio prestado durante a elaboração do presente projeto.

REFERÊNCIAS

CHAN, I. C. C.; *et al*. ArCH: improving the performance of clonal hematopoiesis variant calling and interpretation. Bioinformatics, v. 40, n. 4, 01 abr. 2024.

HOFFMAN, R. **Hematology – basic principles and practice**. 8ª ed. Filadelfia: Elsevier, 2023.

KHOURY, J. D.; *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, jul. 2022.

MONDESIR, J.; *et al*. IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. J Blood Med., v. 7, p. 171, 2016.

QIN, B. M. H.; XU, M. M. R.; YANG, M. M. Y. Acute myeloid leucemia treatment outcomes with isocitrate dehydrogenase mutations: A sistematic review and meta-analysis. Medicine, 06 dez. 2024. http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000040565.

QIN, Y.; *et al*. Prognostic value of IDH2R140 and IDH2R172 mutations in patients with acute myeloid leucemia: a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer, v. 23, n. 527, 09 jun. 2023. doi: 10.1186/s12885-023-11034-7.