DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *SF3B1* EM INDIVÍDUOS COM NEOPLASIAS MIELOIDES

Julia Moraes Molinero (PIC/UEM), Dr.(a) Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora). E-mail: jelvisentainer@uem.br, Giovana Paola Zaccarias Bemvides (Coorientadora). E-mail: giovanap.zaccarias@hotmail.com.

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

Área e subárea do conhecimento: Imunologia/ Imunogenética

Palavras-chave: Regiões *hotspots*; Mutações genéticas; *Primers*; Padronização PCR.

RESUMO

As neoplasias mieloides constituem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas caracterizadas por alterações genéticas e epigenéticas que desregulam a hematopoiese e podem favorecer a transformação leucêmica. Nesse contexto, o gene *SF3B1* apresenta relevância clínica, estando associado a alterações no *splicing* do RNA e a prognóstico desfavorável em diferentes neoplasias mieloides. O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) permite a análise simultânea de múltiplos genes, porém seu custo e a necessidade de infraestrutura especializada limitam sua aplicação em serviços públicos. Assim, este projeto teve como objetivo desenvolver e padronizar *primers* para regiões mutacionais relevantes do gene *SF3B1*, com ênfase nos éxons 14, 15 e 16, visando sua posterior incorporação a um painel direcionado para NGS. Os *primers* foram desenhados utilizando ferramentas bioinformáticas e avaliados por PCR em gradiente de temperatura de anelamento de 56, 58, 60 e 62 °C, utilizando três amostras independentes de DNA. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Foram obtidos amplicons compatíveis com os tamanhos esperados, de aproximadamente 290 pb para o éxon 14, 194 pb e 310 pb para o éxon 15, utilizando os *primers* F1 e F2, respectivamente, e 189 pb para o éxon 16. Para os éxons 14, 15-F1 e 16, as condições mais promissoras foram 62, 60 e 60 °C. Os resultados demonstram potencial dos *primers* para amplificação das regiões-alvo e fornecem condições iniciais para sua validação e posterior integração ao painel molecular, contribuindo para estratégias de diagnóstico mais acessíveis de neoplasias mieloides no Sistema Único de Saúde.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloides compreendem um grupo heterogêneo de doenças clonais originadas de células-tronco hematopoiéticas, caracterizadas por alterações genéticas e epigenéticas que afetam a hematopoiese. Incluem síndromes mielodisplásicas, neoplasias mieloproliferativas e leucemia mieloide aguda,

apresentando ampla variabilidade clínica e prognóstica, o que torna essencial a caracterização molecular para diagnóstico, estratificação de risco e direcionamento terapêutico (Carbonell et al., 2019).

Nesse contexto, destaca-se o gene *SF3B1* (*Splicing Factor 3b Subunit 1*), localizado no braço longo do cromossomo 2 (*locus* 2q33.1) e responsável por codificar uma subunidade do complexo SF3b, componente da U2 snRNP, essencial para o processamento do RNA. Suas mutações somáticas são predominantemente *missense* e concentram-se nas repetições HEAT da proteína, evidências indicam que o efeito prognóstico pode variar de acordo com os *hotspots* envolvidos: E622, R625, H662, K666 e K700, sendo recorrentes em neoplasias mieloides, especialmente nas mielodisplásicas/mieloproliferativas (Rujirachaivej et al., 2018). Essas alterações podem comprometer a interação entre SF3B1 e SUGP1, afetando a seleção do *branch point* e promovendo *splicing* aberrante, com formação de transcritos anormais (Zhang et al., 2019).

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) possibilita a análise simultânea de múltiplos genes, porém seu custo e a necessidade de infraestrutura especializada dificultam sua aplicação em serviços públicos. Nesse cenário, painéis direcionados a regiões *hotspot* podem reduzir o número de amplicons e os custos de preparo e sequenciamento, mantendo informações molecularmente relevantes (Carbonell et al., 2019).

O presente projeto integra o desenvolvimento de um painel imunogenético direcionado para neoplasias mieloides. A validação de *primers* específicos para os éxons 14, 15 e 16 de *SF3B1* constitui etapa fundamental para a construção de um *pipeline* padronizado para análise por NGS, visando uma abordagem molecular de menor custo e maior acessibilidade ao diagnóstico no SUS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Primers *forward* e *reverse* foram construídos para os éxons 14, 15 e 16 do gene *SF3B1*, a partir de sequências FASTA do GenBank/NCBI, visando flanquear as regiões mutacionais de interesse. As sequências foram avaliadas pelas ferramentas Primer-BLAST, Multiple Primer Analyzer e OligoAnalyzer, considerando temperatura de *melting* de 50–65 °C, conteúdo GC de 50–60% e formação de *self-dimers*, *hetero-dimers* e *hairpins*. Após aprovação pelo Comitê de Ética e assinatura do TCLE, amostras de sangue periférico de doadores voluntários de medula óssea foram utilizadas para padronização. O DNA genômico foi extraído com o kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen®, USA) e avaliado quanto à concentração, pureza e qualidade por Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®, USA).

A padronização foi realizada por PCR, avaliando temperatura de anelamento, concentração de $MgCl_2$, tempo de extensão, rendimento, tamanho dos amplicons e especificidade. O *master mix* foi preparado contendo 82,44 µL de água, 12 µL de *buffer*, 3,6 µL de $MgCl_2$, 3 µL de cada *primer,* 3 µL de dNTP e 0,96 µL de Taq polimerase. A reação em cada tubo, por sua vez, foi composta por 18 µL de *master mix* e 2 µL de DNA (20 µL finais por reação). Os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2% com SYBR Safe (Invitrogen®, USA) e

posteriormente submetidos ao sequenciamento de Sanger. Após a padronização, os amplicons serão incorporados ao painel de NGS em desenvolvimento pelo Laboratório Imunogen – UEM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pares de *primers* apresentaram produtos compatíveis com os tamanhos esperados: aproximadamente 290 pb para o éxon 14, 194 pb para o éxon 15-F1, 310 pb para o éxon 15-F2 e 189 pb para o éxon 16, confirmando a amplificação das regiões-alvo. As diferenças de intensidade e definição entre as temperaturas são esperadas, uma vez que temperaturas de anelamento abaixo ou acima do ideal podem favorecer amplificações inespecíficas ou reduzir a eficiência da reação, respectivamente (Khaira, 2023; Rychlik; Spencer; Rhoads, 1990).

Para o éxon 14, houve amplificação em todas as temperaturas, mas a 62 °C foi observada maior definição e reprodutibilidade, selecionada para continuidade da padronização. Para o éxon 15-F1, as temperaturas de 58 e 60 °C apresentaram amplificação satisfatória, sendo 60 °C mais favorável pela maior definição e uniformidade das bandas. A 58 °C observou-se discreto arraste, enquanto a 62 °C apresentou sinal no controle sem DNA molde, cuja origem deverá ser investigada, podendo estar relacionada à contaminação ou a produtos inespecíficos, como dímeros de *primers* (Bustin et al., 2025).

O *primer* F2 apresentou desempenho inferior ao F1, com produtos adicionais e menor especificidade. O F2 apresentou CG% inferior ao F1 e diferença superior a 2% em relação ao seu *primer reverse*, características que podem influenciar a eficiência da amplificação. Aspectos como conteúdo GC, temperatura de *melting*, estabilidade do pareamento e formação de estruturas secundárias podem contribuir para o comportamento diferencial entre os *primers* (Khaira, 2023).

Para o éxon 16, as temperaturas 56 e 60 °C apresentaram condições mais favoráveis. A 58 °C observou-se fluorescência de fundo e, a 62 °C, bandas mais fracas. A condição de 60 °C apresentou maior intensidade, nitidez e consistência entre as três amostras, sendo selecionada para continuidade da padronização.

Em conjunto, os resultados demonstram que os *primers* avaliados apresentam potencial para amplificação das regiões-alvo dos éxons 14, 15 e 16 de *SF3B1*. A análise dessas regiões se faz válida uma vez que é onde se concentram mutações recorrentes na região C-terminal do gene. Em pacientes com neoplasias mieloides, foram identificadas as variantes E622D, R625C/G, H662Q e K666T no éxon 14, enquanto K700E foi identificada no éxon 15, com predominância das alterações nos éxons 14 e 15 (Rujirachaivej et al., 2018).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que os pares de *primers* desenvolvidos apresentam potencial para a amplificação das regiões-alvo dos éxons 14, 15 e 16 do gene *SF3B1*. As condições de 62 °C para o éxon 14, 60 °C para o éxon 15 com o *primer* F1 e 60 °C para o éxon 16 apresentaram os perfis eletroforéticos mais

favoráveis. Dessa forma, a padronização estabelece condições iniciais adequadas para a continuidade da validação dos amplicons por sequenciamento de Sanger e posterior incorporação ao painel de NGS direcionado para neoplasias mieloides, com potencial para otimizar recursos, aumentar direcionamento a regiões *hotpots* e ampliar a acessibilidade ao diagnóstico molecular no SUS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa Institucional de Iniciação Científica e aos órgãos de fomento responsáveis pelo apoio ao desenvolvimento deste projeto, bem como ao Laboratório de Imunogenética, à Orientadora Dr.(a) Jeane Eliete Laguila Visentainer, à Coorientadora Giovana Paola Zaccarias Bemvides e aos demais pesquisadores envolvidos, pelo suporte e contribuição para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BUSTIN, S. A. et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. **Clin. Chem.**, v. 71, n. 6, p. 634-651, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043. Acesso em: 29 ago. 2026.

CARBONELL, D. et al. Next-Generation Sequencing Improves Diagnosis, Prognosis and Clinical Management of Myeloid Neoplasms. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1364, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/cancers11091364. Acesso em: 29 ago. 2026.

KHAIRA, A. et al. Primer Design and Optimization of Annealing Temperature for Analysis of Glutathione Reductase Gene Expression in Rice (*Oryza sativa* L.). **3BIO: Journal of Biological Science, Technology and Management**, v. 5, n. 1, p. 142-148, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.5614/3bio.2023.5.1.3. Acesso em: 29 ago. 2026.

RUJIRACHAIVEJ, P. et al. The Frequency of *SF3B1* Mutations in Thai Patients with Myelodysplastic Syndrome. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 19, n. 7, p. 1825-1831, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.7.1825. Acesso em: 29 set. 2026.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 21, p. 6409-6412, 1990. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409. Acesso em: 29 ago. 2026.

ZHANG, J. et al. Disease-causing mutations in SF3B1 alter splicing by disrupting interaction with SUGP1. **Molecular Cell**, v. 76, n. 1, p. 82–95.e7, 2019. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.07.017.