DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE *SRSF2* EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Amanda do Nascimento Gardioli Pishinin (PIBIC/FA), Quirino Alves de Lima Neto, Daniel Caligari (Coorientador), Mariana de Souza Terron (Orientadora). E-mail: msterron@uem.br.

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

Ciências da Saúde / **Imunologia**

Palavras-chave: NGS; genotipagem; oncohematologia.

RESUMO

A mutação no gene *SRSF2* é reconhecida como fator de risco adverso para Leucemia Mieloide Aguda, visto que está mutação resulta em splicing aberrante de vários genes. O diagnóstico por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) possibilita a melhor identificação dessa mutação, promovendo um diagnóstico, prognóstico, estratificação de risco e estratégias terapêuticas mais adequadas. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar *primers* para detecção da mutação GRCh38/hg38 17q24.3-25.3 (ID ClinVar: 58703) no gene *SRSF2*, a qual gera a alteração p.Pro95His. Os *primers* foram desenhados e validados *in silico e* a otimização da PCR se deu pelos testes de concentrações de reagentes, dos *primers* e temperaturas de anelamento. Foram desenhados três pares de *primers in silico* (NCBI/OligoAnalyzer Tool) que obtiveram *amplicon* < 300 pb. Amostras de sangue periférico foram submetidas à extração de DNA (QIAmp®) com controle de qualidade e pureza (NanoDrop 2000®; A260/280 entre 1,8 e 2,0). Testes de otimização *in vitro* padronizaram o par E1F1 com a concentração de *primer* a 0,4 µM e temperatura de anelamento a 60 ºC, apresentando banda específica e de tamanho esperado. A padronização desse biomarcador permite a sua integração ao painel multiplex, oferecendo autonomia regional e suporte à estratificação de risco e diagnóstico preciso na LMA.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é caracterizada por uma variedade de mutações genéticas e o diagnóstico baseado no padrão mutacional permite uma estratificação mais assertiva de grupos de risco e contribui para o planejamento terapêutico

(Khoury et al. 2022). O painel de especialistas da European LeukemiaNet (ELN) reconhece a mutação no gene *SRSF2* (fator de emenda rico em serina/arginina 2) como fator de risco adverso para LMA, estando associado ao mau prognóstico clínico. A principal mutação descrita no gene *SRSF2* ocorre principalmente pela substituição de Pro95 por histidina, esta mutação está localizada dentro do domínio RRM (Motivo de reconhecimento de RNA), alterando assim a afinidade de ligação a RNA da proteína de GGNG para CCNG, resultando em splicing aberrantes de vários genes (Yu et al. 2025).

O emprego do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) possibilita o exame simultâneo de múltiplas sequências de DNA, ampliando a eficácia na detecção de variantes genéticas ligadas a processos malignos (Coccaro et al. 2019). No âmbito da oncohematologia, o uso de painéis genéticos favorece a obtenção de diagnósticos e prognósticos com maior acurácia, auxiliando na classificação de risco e no direcionamento de condutas terapêuticas. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi desenvolver biomarcadores para detectar a mutação GRCh38/hg38 17q24.3-25.3 (ID clinivar: 58703) do gene *SRSF2* e padronização das reações de PCR para inclusão deste alvo em painéis genéticos multiplex que estão em desenvolvimento pelo grupo de oncohematologia da UEM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os *primers* foram desenhados a partir da sequência em formato ".fasta" e ".gbk" do gene-alvo, obtido no banco de dados *RefSeq Nucleotide* da plataforma *NCBI*, no qual foi realizado o alinhamento dos exons e íntrons contra o gene completo utilizando a função *AlignSeqs* do pacote *DECIPHER*. O desenho foi realizado manualmente, bem como com o auxílio dos softwares Primer-blast (NCBI) e OligoAnalyzer Tool (IDT- Integrated DNA Technologies USA), em que foi possível verificar a especificidade, os parâmetros de qualidade, o tamanho do *amplicon* e a especificidade. As amostras foram adquiridas da coleta de sangue de pacientes do serviço de atendimento do ambulatório de Hematologia da Elo Oncologia Integral e Pesquisa Clínica de Maringá e do Hospital Paraná (Maringá – PR), seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá. A amostra foi armazenada em solução anticoagulante (EDTA) à -20 ºC, o DNA foi extraído dos leucócitos com o kit QIAmp®, de acordo com as orientações do fabricante (Qiagen), foram realizadas análises para verificar a pureza e qualidade do DNA com o equipamento NanoDrop 2000® (Invitrogen). Os *primers* sintetizados foram analisados quanto ao seu funcionamento através da PCR seguindo todos os parâmetros de acordo com o fabricante. Foi realizado testes adicionais para verificar a melhor concentração de *primers*, no qual foi testado a concentração final de 0,2 µM e 0,4 µM. A temperatura de anelamento foi testada

buscando a eficiência mínima e máxima, variando 2 °C em torno da temperatura média de anelamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram desenhados três pares de *primers* que amplificam a região codificadora correspondente ao códon p.Pro95His no gene *SRSF2.* Destaca-se que os 3 *amplicons* mantiveram o tamanho < 300 pb garantindo a compatibilidade para o NGS. Foi realizada a análise da quantidade do DNA, pureza e especificidade, no qual respectivamente foi obtida 5 amostras com concentração média de 23,9 ng/µL, e a razão A260/280 obtida esteve entre 1,8 e 2,0 a avaliação *in silico e in vitro* demonstrou a amplificação de um único produto correspondente à região-alvo do gene *SRSF2,* conforme demonstra a figura 1. O par de *primers* nomeado E1F1 foi padronizado, no qual a sua melhor concentração foi obtida em 0,4 µM para cada *primer* e a temperatura de anelamento foi determinada em 60 ºC. Conforme descrito por SCHIRMER et al. 2015, há um declínio de qualidade no sequenciamento de produtos longos, sendo assim essencial que o produto de amplificação seja curto, garantindo uma cobertura completa, além disso, a padronização e otimização da concentração ideal de *primers* garantiu a redução de dímeros de *primers*, que por sua vez é um dos maiores problemas no ensaio de Sequenciamento de Nova Geração.

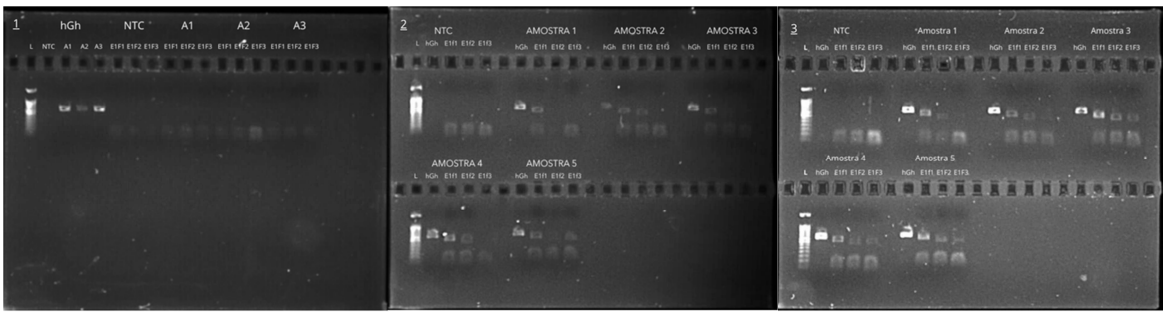


Figura 1 - Eletroforeses em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR utilizando os *primers* desenhados para amplificar a mutação GRCh38/hg38 17q24.3-25.3 (ID clinivar: 58703) do gene *SRSF2*. (1) Otimização inicial com as amostras A1-A3 sob as variáveis de [0,2 µM] final de *primers* e Tm a 58 ºC. (2) Otimização com as amostras A1-A5 sob as variáveis: [0,4 µM] final de *primers* e Tm a 58 ºC. (3) Ensaio com 5 amostras sob as variáveis: [0,4 µM] final de *primers* e Tm a 60 ºC. Identificação das bandas: L- Marcador de peso molecular de 50 pb; NTC-Controle negativo; hGh-Controle positivo (Gene do Hormônio de Crescimento Humano); E1F1- Exon 1 fragmento 1; E1F2-Exon 1 fragmento 2; E1F3 - Exon 1 fragmento 3.

CONCLUSÕES

A padronização do par de *primers* E1F1 garantiu a amplificação específica do éxon que contém a mutação p.Pro95His no gene *SRSF2*, gerando um amplicon < 300 pares de base, ideal para a integração no painel multiplex do grupo de oncohematologia da UEM, promovendo uma solução nacional e de menor custo em comparação aos painéis comerciais importados. Esse produto desenvolvido e padronizado proporciona uma ferramenta acessível para triagem, estratificação de risco, prognóstico e direcionamento terapêutico para pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.ª Dr.ª Mariana de Souza Terron e ao meu coorientador Daniel Caligari pelo auxílio na condução deste trabalho. Ao Laboratório de Imunogenética da UEM pela infraestrutura. À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/FA) e pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

COCCARO, N. *et al*. Sequenciamento de próxima geração em leucemia linfoblástica aguda. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 2929, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms20122929.

KHOURY, J. D. *et al*. A 5ª edição da Classificação da Organização Mundial da Saúde de Tumores Hematolinfóides: neoplasias mieloides e histiocíticas/dendríticas. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022. DOI:https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1.

SCHIRMER, Melanie *et al*. Insight into biases and sequencing errors for *amplicon* sequencing with the Illumina platform. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, n. 6, p. e37, 31 mar. 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gku1341. Acesso em: 27 ago. 2026.

YU, H. *et al*. O papel das mutações ASXL1, SRSF2 e EZH2 na desregulação da cromatina da neoplasia mielodisplásica e leucemia mieloide aguda. **Leukemia**, v. 39, n. 10, p. 2329-2339, out. 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41375-025-02657-9.