

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO BECKMANN MARQUES

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE
TRANSLOCAÇÕES ENVOLVENDO O GENE *MLL* NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA

CURITIBA

2019

RODRIGO BECKMANN MARQUES

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE
TRANSLOCAÇÕES ENVOLVENDO O GENE *MLL* NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA

Projeto de pesquisa referente ao Trabalho de
Conclusão de Curso II (TCC II), requisito parcial à
obtenção de Bacharelado em Biomedicina, curso
de graduação do setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaqueline Carvalho de
Oliveira.
Co-orientador: Dr. Mateus Nobrega Aoki.

CURITIBA

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Karina e Laercio, que desde o início da vida lutaram por mim e me deram todo o suporte para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje, sempre com muita atenção e um amor gigantesco.

À minha irmã, Maria Fernanda, uma fonte de carinho e alegria, que me inspira todo dia a ser uma pessoa melhor e um irmão exemplar.

Ao meu padrasto, Nico, que sempre se preocupou comigo, me apoiou muito ao longo da jornada e trouxe ensinamentos valiosos que levarei para o resto da vida.

À toda a minha família, pessoas gentis e atenciosas comigo, cada um à sua maneira, que a cada encontro contribuem para o meu crescimento como pessoa.

Às minhas grandes amigas de Curitiba: Gabriel, um verdadeiro irmão pra mim, com quem sempre dá pra trocar boas risadas; Suzen, uma das pessoas mais resilientes que conheço e que me mostrou o real significado de amizade; Guilherme, cuja presença e conversas sempre trazem conforto; Sofia, que leva alegria aonde vai e tenta me animar em qualquer situação; Caio, com quem sinto falta de cantar ou dar risada sobre qualquer coisa, mas que, apesar da distância, considero muito; Beatriz, que sempre se preocupou comigo e cujas conversas nesse ano foram muito importantes para mim; Luan, responsável por momentos históricos dos últimos anos e que sempre tentou me motivar a ir em toda festa possível; Nathália, uma das pessoas mais legais que a faculdade me apresentou e cuja sinceridade me inspira; e Pedro, uma pessoa de bom coração e com quem sempre é um prazer parar para conversar. Levarei nosso grupo no coração para o resto da vida.

A todos que estiveram comigo na Chromos, especialmente aqueles que fizeram essa EJ incrível crescer neste ano: Ana, Baltazar, Darciane, Murilo, Thaís, Aymee, Celina, Gabrielle, Beatriz e Laura. Obrigado por me ensinarem o que significa construir algo em equipe e por contribuírem para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus velhos amigos de Guarapuava, especialmente Lucas, Urbano e Matheus, que há anos são grandes parceiros e de quem valorizo muito a amizade.

Aos meus orientadores, Jaqueline e Mateus, pela paciência, pelos ensinamentos e por toda ajuda neste último ano.

E a todos não citados anteriormente que de alguma forma me deram algum apoio ao longo de toda essa jornada.

De coração, muito obrigado.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é um tipo de câncer que corresponde a um quarto dos casos de neoplasia pediátrica. Grande parte dos casos de LLA apresenta algum tipo de anormalidade citogenética, como os rearranjos do gene *MLL*, comumente associados a piores prognósticos da doença. No Brasil, a investigação de causas genéticas ainda é incomum no diagnóstico da leucemia. Este trabalho teve o propósito de auxiliar no desenvolvimento de um teste diagnóstico molecular para as principais translocações envolvendo o gene *MLL* na leucemia linfóide aguda. Para isso, foi proposto usar o método de RT-qPCR para otimizar um sistema *multiplex* que detectasse as translocações t(4;11) e t(9;11), que geram os genes de fusão *MLL-AF4* e *MLL-AF9*, respectivamente. Os testes iniciais com cada molde destes genes garantiram a funcionalidade dos *primers* utilizados. Em seguida, testes com *primers* não específicos a estes moldes demonstraram que a presença destes não prejudica a performance da reação. Além disso, por meio de testes de otimização, foi possível definir um conjunto mais adequado de sondas específicas para *MLL*, cujo propósito é aumentar a especificidade da reação. Por fim, foram feitas tentativas de validação com amostras clínicas de pacientes diagnosticados com leucemia. O teste com *primers* para *MLL-AF4* teve duas amostras de LLA apresentando amplificação, enquanto o teste com *primers* para *MLL-AF9* não foi bem sucedido. Com essas avaliações, pode-se constatar que o sistema *multiplex* é uma possibilidade interessante e útil para o futuro do diagnóstico da leucemia.

Palavras-chave: Leucemia. *MLL*. *AF4*. *AF9*. *Multiplex*.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a type of cancer that corresponds to one fourth of all pediatric malignancies. A major portion of ALL cases present some kind of cytogenetic abnormality, like recombinations of the *MLL* gene, which are commonly associated to worse prognosis of this disease. In Brazil, the investigation of genetic causes is still uncommon in the diagnosis of leukemia. This project intended to help the development of a molecular diagnostic test of the main translocations involving the *MLL* gene in ALL. To achieve that, we proposed the use of the RT-qPCR method to optimize a multiplex system capable of detecting translocations t(4;11) and t(9;11), which generate the *MLL-AF4* and *MLL-AF9* fusion genes, respectively. The initial tests with each mold of these genes assured that the primers being used were functional. The following tests with the addition of primers that were not specific to the mold demonstrated that the presence of these primers did not affect the performance of the reaction. Besides that, through optimization tests, it was possible to define the most adequate set of specific probes to the *MLL* gene, with the purpose of increasing the specificity of the reaction. Lastly, we tried to validate the system with clinical samples of leukemia-diagnosed patients. In the test with primers specific to *MLL-AF4*, two ALL samples amplified. The test with primers specific to *MLL-AF9* was not successful. These experiments showed that the multiplex system is a very interesting and useful possibility to the diagnosis of leukemia in the future.

Keywords: Leukemia. *MLL*. *AF4*. *AF9*. Multiplex.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 LEUCEMIA	7
1.2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	8
1.3 GENE <i>MLL</i> E TRANSLOCAÇÕES ENVOLVIDAS	9
1.4 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM) E PROTÓCOLOS DE TRATAMENTO	12
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	14
2.1 JUSTIFICATIVA	14
2.2 OBJETIVO GERAL	14
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	16
3.1.2 <i>PRIMERS</i> E SONDAS	17
3.1.3 SÍNTESE DE cDNA	18
3.1.4 AVALIAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> COM SYBR <i>GREEN</i>	19
3.1.5 AVALIAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> E DAS SONDAS PARA TRANSLOCAÇÃO <i>MLL-AF4</i>	20
3.1.6 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> DE <i>AF9</i> E <i>ENL</i> NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE <i>AF4</i>	21
3.1.7 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF4</i>	21
3.1.8 AVALIAÇÃO DE <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF9</i> COM <i>PRIMERS FORWARD</i> DE <i>MLL</i>	22
3.1.9 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> DE <i>AF4</i> E <i>ENL</i> NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE <i>AF9</i>	23
3.1.10 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF9</i>	23
4. RESULTADOS	25
4.1 AVALIAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> COM SYBR <i>GREEN</i>	25
4.2 AVALIAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> E DAS SONDAS PARA TRANSLOCAÇÃO <i>MLL-AF4</i>	25

4.3	AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> DE <i>AF9</i> E <i>ENL</i> NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE <i>AF4</i>	26
4.4	AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF4</i>	27
4.5	AVALIAÇÃO DE <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF9</i> COM <i>PRIMERS FORWARD</i> DE <i>MLL</i>	28
4.6	AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> DE <i>AF4</i> E <i>ENL</i> NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE <i>AF9</i>	29
4.7	AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E <i>PRIMERS REVERSE</i> DE <i>AF9</i>	30
5.	DISCUSSÃO	31
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	34
7.	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIA

A leucemia é um tipo de câncer que acomete as células do tecido sanguíneo, mais especificamente os leucócitos, que possuem, em geral, papel de defesa do organismo. Nessa doença, há uma produção excessiva de precursores desses leucócitos, que se acumulam, principalmente, na medula óssea, local onde essas células são produzidas (INCA, 2018).

Segundo relatório de 2018 do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), projeto da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), houve aproximadamente 437 mil novos casos de leucemia no mundo em 2018 e cerca de 309 mil mortes em decorrência da doença no mesmo ano. Na classificação de tipos de câncer com maior incidência, a leucemia se encontra na 14ª posição, estando em 11º lugar no ranking de mortalidade (ambas as classificações considerando os cânceres de cólon, reto e ânus separadamente) (GLOBOCAN-IARC, 2018).

No Brasil, a estimativa de novos casos de leucemia para o ano de 2018 era de 5.940 novos casos para homens e de 4.860 para mulheres (INCA, 2018). No caso de leucemia infanto-juvenil (0 a 14 anos de idade), foram estimados 1691 novos casos, sendo 960 casos no sexo masculino e 731 no sexo feminino (GLOBOCAN-IARC, 2018).

A classificação dos tipos de leucemia segue dois critérios: o nível de diferenciação dos precursores leucocitários afetados – aguda ou crônica – e a linhagem celular afetada – linfóide ou mieloide. Desta forma, há quatro principais tipos de leucemia: a leucemia linfóide aguda (LLA), a leucemia linfóide crônica (LLC), a leucemia mieloide aguda (LMA) e a leucemia mieloide crônica (LMC) (JIN et al., 2016).

Em casos de leucemia aguda, os leucócitos da linhagem afetada permanecem imaturos, em estágios iniciais da diferenciação hematopoiética, os chamados blastos. Esses blastos, sem ter suas funções bem desenvolvidas, acabam se proliferando rapidamente, provocando a insuficiência da medula óssea e fazendo com que a doença tenha uma progressão também rápida. Já em casos de leucemia crônica, os leucócitos se encontram em estágio parcial de diferenciação, apresentando algumas funções de uma célula normal. Assim, conseguem se manter na circulação sanguínea

por mais tempo, inclusive na medula óssea, levando a uma progressão mais lenta da doença (HOFFBRAND E MOSS, 2013; JIN et al., 2016).

A linhagem linfoide de células sanguíneas inclui os leucócitos, de forma geral, mais ligados à atividade adaptativa do sistema imune. São eles: linfócitos B, linfócitos T e células NK (*Natural Killer*). Já a linhagem mieloide engloba, além das hemácias e plaquetas, os leucócitos que atuam na resposta imune inata: monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos (HOFFBRAND E MOSS, 2013).

1.2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A LLA é marcada pela proliferação desregulada de precursores linfoides na medula óssea e no sangue. Esse tipo de leucemia acomete, principalmente, crianças. Dentre as leucemias, é o subtipo mais comum, tendo uma incidência cinco vezes maior do que a LMA, além de corresponder a 25-30% de todos os casos de neoplasias pediátricas (JIN et al., 2016; NADEAU et al., 2019). Cerca de 75% dos casos da doença ocorre entre 0 e 6 anos de idade (HOFFBRAND E MOSS, 2013). Em crianças, a taxa de sobrevivência em 5 anos é de cerca de 90% dos casos, sendo que essa taxa diminui conforme o aumento da idade, chegando a 35% dos casos em adultos e menos de 30% dos casos em idosos (MOHSENI et al., 2018).

Quanto à etiologia da LLA, alguns fatores ambientais são comprovadamente fatores de risco para a doença, sendo a radiação ionizante o principal exemplo. Outros fatores, como consumo de cigarro e drogas, alcoolismo e exposição a pesticidas têm uma associação mais fraca, mas seguem sendo estudados (JIN et al., 2016).

Para o diagnóstico da doença, a observação de morfologia leucocitária e a imunofenotipagem dessas células são as ferramentas mais utilizadas (INCA, 2018). Adicionalmente, uma investigação genética auxilia na confirmação do diagnóstico; afinal, cerca de 80% dos casos da leucemia linfoide aguda apresentam anormalidades citogenéticas. Os resultados moleculares dessas anormalidades são mostrados no gráfico a seguir (FIGURA 1) (IARC, 2014):

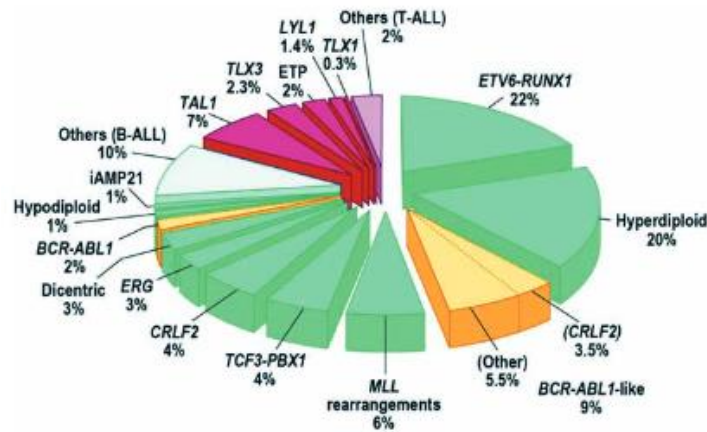


FIGURA 1. Taxas de prevalência de subtipos de LLA em pacientes pediátricos. Vermelho: LLA em linhagem de linfócitos T; verde e amarelo: LLA em linhagem de linfócitos B. Fonte: IARC (2014).

Como visto na imagem acima, o gene de fusão *ETV6-RUNX1*, proveniente da translocação t(12;21), caracteriza o subtipo mais comum de LLA infantil. O segundo subtipo mais frequente é de LLA com hiperdiploidia, em 20% dos pacientes pediátricos. Em adultos, a anormalidade citogenética mais prevalente é o gene de fusão *BCR-ABL1*, proveniente da translocação t(9;22), que gera o cromossomo Philadelphia (MOHSENI et al., 2018). Dentre as principais translocações da LLA, as que envolvem o gene *MLL* são as que apresentam pior prognóstico (MEYER et al., 2013).

1.3 GENE *MLL* E TRANSLOCAÇÕES ENVOLVIDAS

O gene *MLL* está mapeado na banda 3, região 2 do braço longo do cromossomo 11 (11q23). Uma das funções gerais do produto do gene *MLL* é manter a ativação dos genes *HOX*, que atuam em processos como embriogênese, neurogênese e hematopoiese, incluindo leucogênese. Uma vez produzida a proteína *MLL*, há a clivagem pela Taspase 1 e a separação em dois fragmentos que se dimerizam, formando assim um complexo estável (FIGURA 2). O fragmento *MLL-N* fica com o domínio CXXC, que se liga a regiões CpG não-metiladas. O fragmento *MLL-C* fica com o domínio SET, o qual promove a metilação de H3K4, modulando a cromatina e favorecendo a transcrição gênica (BALLABIO; MILNE, 2012).

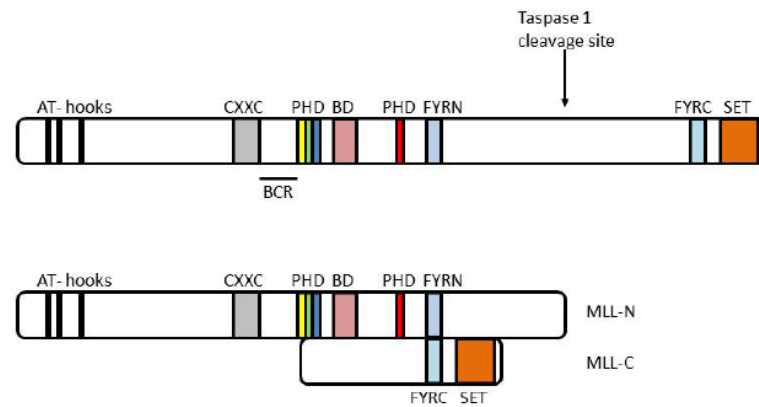


FIGURA 2. Acima, a estrutura da proteína MLL, seus principais domínios e a localização do sítio de clivagem da Taspase 1. Abaixo, o dímero dos fragmentos MLL-N e MLL-C. Fonte: BALLABIO e MILNE, 2012.

Esses domínios têm como alvo, por exemplo, o *HOXA9*, bastante ativo em células da medula óssea. Em casos de leucemia, a proteína MLL, com seus domínios, se liga a estruturas como o complexo de alongamento PAF1 e recruta as proteínas de fusão de MLL (MLL-FP), que mantêm a transcrição ativa (FIGURA 3). Com isso, há o processo desregulado de leucogênese.

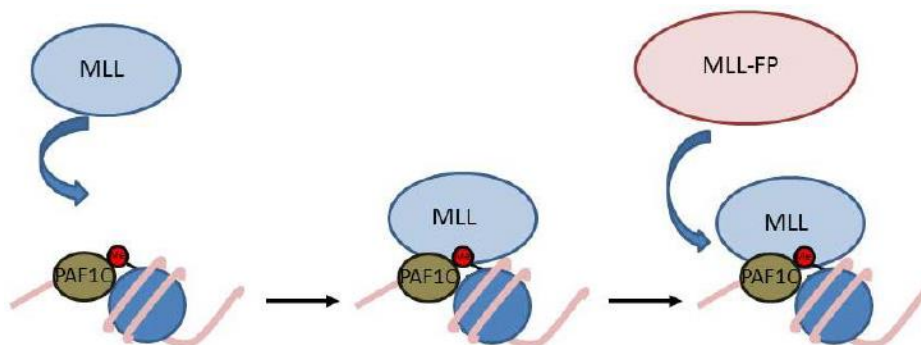


FIGURA 3. Recrutamento das MLL-FPs aos genes *HOX*. Complexo PAF1 em verde. Marcas de metil em vermelho. Fonte: BALLABIO e MILNE, 2012.

Os rearranjos de *MLL* (*MLL-r*) ocorrem em aproximadamente 5% dos casos de LLA na infância em geral, mas, em lactentes (crianças com menos de 1 ano de idade), 80% dos casos de leucemia linfóide aguda são *MLL-r*. Para a leucemia mieloide aguda, até 20% dos casos na infância em geral são *MLL-r*, enquanto na faixa de lactentes há uma taxa de 50% de casos *MLL-r* (BROWN, 2013).

As translocações envolvendo *MLL* normalmente estão associadas a um pior prognóstico do quadro leucêmico, especialmente na LLA. O principal rearranjo cromossômico envolvendo esse gene é a $t(4;11)(q21;q23)$, que gera o gene de fusão *MLL-AF4*. Considerando ambos os tipos de leucemia aguda, essa translocação é a mais frequente em lactentes e adultos – 40% e 45% dos casos, respectivamente. Considerando apenas LLA, é a translocação de *MLL* mais comum, seja em lactentes, crianças ou adultos (MEYER et al., 2013).

Outras translocações de destaque do *MLL*, que podem ser observadas na FIGURA 4, são: $t(9;11)$, gerando *MLL-AF9*, encontrado em 13% dos casos de *MLL-r*-LLA; e $t(11;19)$, gerando *MLL-ENL*, encontrado em 18% dos casos de *MLL-r*-LLA (MOHSENI et al., 2018). Os três genes mencionados (*AF4*, *AF9* e *ENL*) codificam proteínas envolvidas em um mesmo super-complexo, o AF4/AF5-SEC, que atua no alongamento transcricional da RNA polimerase II. Esses genes de fusão, envolvendo o *MLL* e esses três genes parceiros, estão presentes em quase 90% dos casos de *MLL-r*-LLA (leucemia linfóide aguda com rearranjo de *MLL*), enquanto na *MLL-r*-LMA essa frequência é reduzida, como mostra a FIGURA 4 (STEINHILBER; MARSCHALEK, 2017).

Esses rearranjos envolvendo o *MLL* podem gerar proteínas de fusão funcionais nos dois sentidos de síntese: no caso da $t(4;11)$, por exemplo, pode ser gerada a *MLL-AF4* (da translocação 5'-*MLL*) ou a *AF4-MLL* (da translocação 3'-*MLL*), ambas com potencial oncogênico. Apesar disso, na maioria dos pacientes de leucemia com rearranjo de *MLL*, o transcrito 3', quando produzido, não atinge níveis detectáveis, enquanto o transcrito 5' está sempre presente. Por isso, este é considerado como fator leucemogênico (MILNE, 2017).

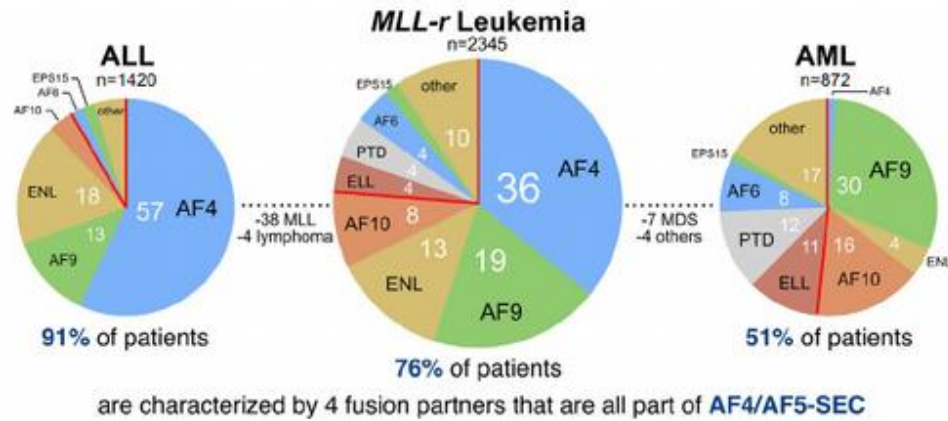


FIGURA 4. Frequências das principais translocações envolvendo o *MLL* na LLA, na leucemia aguda em geral e na LMA. Fonte: STEINHILBER e MARSCHALEK, 2017.

1.4 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM) E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

A doença residual mínima (DRM) consiste na quantidade de células neoplásicas que se mantêm mesmo após a remissão completa da leucemia. A avaliação dos níveis de DRM é cada vez mais importante, pois estes vêm sendo usados como critério para classificação dos pacientes com LLA nos diferentes grupos de risco, o que influencia diretamente no tratamento a ser seguido. Além de fornecer informações sobre o prognóstico da doença, a DRM possibilita a detecção de recaídas antes mesmo do diagnóstico por observação de morfologia celular (GANAZZA, 2014). Com a análise dos níveis de DRM, também é possível averiguar a eficácia de um tratamento em comparação a regimes anteriores.

Diferentes protocolos de tratamento usam a DRM como parâmetro para categorização dos pacientes em grupos de risco (FIGURA 5). Exemplos desses protocolos são o GBTLI-LLA-2009, do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil, e o ALL IC-BFM 2009, do *International BFM Study Group*. Como um dos métodos para avaliação da DRM é a análise por PCR de genes de fusão provenientes de translocação cromossômica (GANAZZA, 2014), inclusive as que envolvem o gene *MLL*, é importante que a análise dessas translocações seja feita como parte do diagnóstico da LLA, para posterior avaliação da DRM.

ALL IC-BFM 2009 CLASSIFICATION

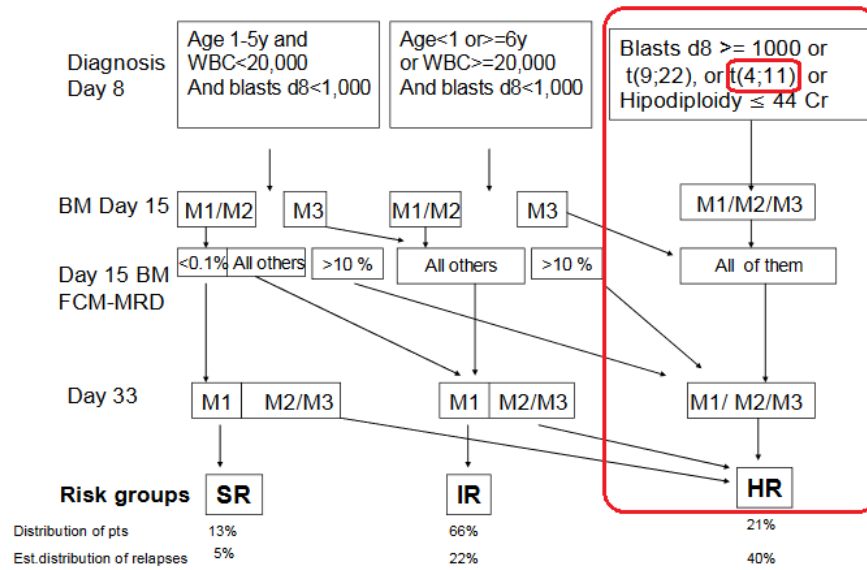


FIGURA 5. Estratificação do protocolo de 2009 do *Acute Lymphoblastic Leukemia International Committee*, do *BFM Study Group*. Em destaque, a principal translocação envolvendo o gene *MLL*, a t(4;11), associada ao grupo de alto risco no tratamento da LLA (HR – *high risk*). Fonte: ALL IC-BFM 2009.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

No atual cenário da saúde no Brasil, o diagnóstico de leucemias, em geral, ocorre pela observação de sinais clínicos, exames de sangue e visualização da morfologia celular do paciente. Apesar de serem ferramentas válidas para o diagnóstico da doença, não é sempre que há uma investigação profunda do estado leucêmico do paciente, voltada para as causas genéticas.

Com a realização de um teste molecular que investigue possíveis translocações causadoras da leucemia, pode-se ter mais uma confirmação do diagnóstico. Além disso, conforme protocolos de tratamento já estabelecidos na área, essa análise genética auxilia na estratificação dos pacientes em grupos de risco, com a observação dos níveis de DRM de acordo com a translocação de cada subtipo da LLA.

Desta forma, é fundamental o desenvolvimento de um teste de precisão, a nível molecular, com sensibilidade elevada e custo acessível à grande parte dos hospitais, clínicas e laboratórios. A intenção deste trabalho é auxiliar no desenvolvimento de um teste diagnóstico, usando a metodologia de RT-qPCR, para as principais translocações cromossômicas envolvendo o gene *MLL* em pacientes com leucemia.

2.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de teste RT-qPCR *multiplex* para detecção das duas principais translocações envolvendo o gene *MLL*, de interesse clínico na LLA: t(4;11) e t(9;11).

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Otimização de oligonucleotídeos;
- b) Teste de funcionalidade dos *primers* e sondas;
- c) Comparação do teste RT-qPCR proposto entre sistema *singleplex* e sistema *multiplex*;
- d) Análise do ensaio em amostras clínicas de pacientes com leucemia e doadores saudáveis.

3 METODOLOGIA

A grande dificuldade da detecção da translocação *MLL* é sua diversidade de pontos de quebra e fusão, podendo gerar diversos transcritos, conforme demonstrado para a fusão *MLL-AF4* na FIGURA 6. Para isso, propusemos uma estratégia por RT-qPCR *multiplex* para detecção de translocação *MLL* com os parceiros *AF4* e *AF9*. Para isso usamos 7 *primers* principais, sendo 2 *forward* com especificidade ao *MLL* e 5 *reverse*, sendo dois com especificidade ao parceiro *AF4* e três ao parceiro *AF9*, além de 2 sondas conjugadas com fluoróforo FAM, que tem como alvo o *MLL*. Ainda usamos 2 *primers reverse* específicos para *ENL*, a fim de verificar a influência de *primers* não-específicos ao molde em certos testes. Essa estratégia permite, em uma única reação, a detecção da expressão do rearranjo *MLL*, mas sem discriminar seu parceiro, o que pode ser determinado por reações separadas com os *primers* específicos para cada parceiro.

Para o desenvolvimento do projeto duas abordagens foram planejadas: a primeira, com a utilização de *primers* específicos com composto intercalante de dupla fita de DNA (*SYBR Green*); a segunda – e principal – utilizando *primers* e sondas conjugadas com fluoróforos (FAM), específicos para as translocações estudadas.

Neste projeto, foram utilizados para RT-qPCR os *master mix SYBR Green PCR Master Mix* (ThermoFischer) e *TaqPath ProAmp Master Mix 2x* (Thermo Fisher) e para PCR convencional o *Master Mix ZDC 3x* (IBMP). As reações foram realizadas nas plataformas *LightCycler 96* (Roche) e *7500 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher). Inicialmente, a funcionalidade dos *primers* foi testada em moldes sabidamente positivos para a translocação de interesse, sendo esses de amostra clínica ou de linhagem celular caracterizada para a presença da translocação *MLL-AF4* ou *MLL-AF9*. Em seguida, para buscar um cenário mais complexo e real, foram utilizadas amostras clínicas de pacientes leucêmicos e amostras de indivíduos saudáveis.

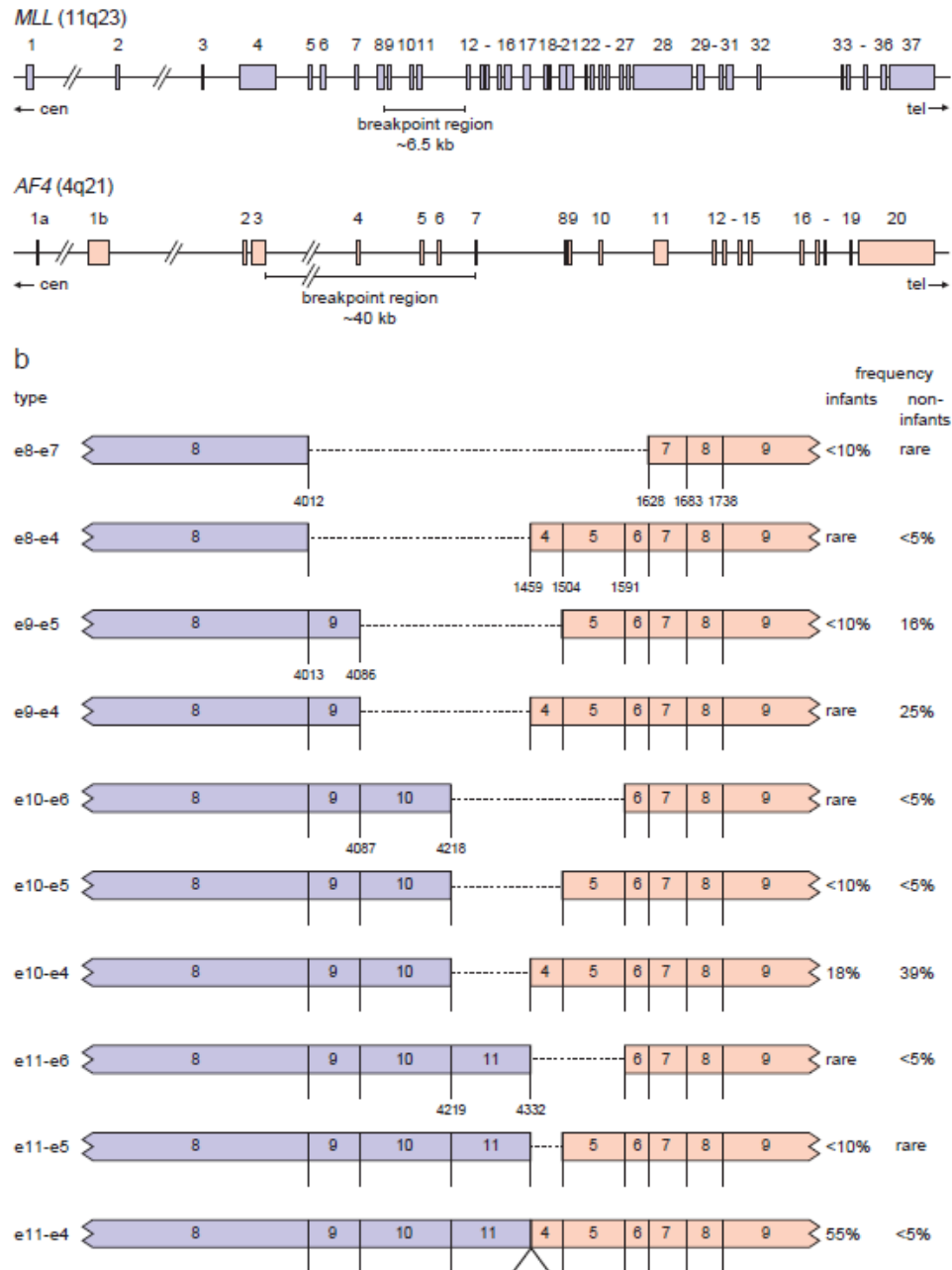


FIGURA 6. Pontos de quebra dos genes *MLL* (roxo) e *AF4* (rosa claro) e os possíveis transcritos para o gene de fusão *MLL-AF4* com suas respectivas frequências em lactentes e não-lactentes. Fonte: VAN DOGEN et al., 1999.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Para as amostras de pacientes leucêmicos, uma cooperação com o Hospital Erasto Gaertner foi formalizada, sendo utilizadas amostras com diagnóstico confirmado de leucemia, entretanto sem a avaliação da presença da translocação de

MLL. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner sob CAAE 08809419.0.0000.0098. Para esse grupo foram utilizadas 23 amostras de pacientes diagnosticados com LLA e 19 amostras de pacientes diagnosticados com LMC. Para os indivíduos saudáveis, houve disponibilidade de sangue periférico de doadores do Biobanco do Instituto de Medicina Tropical da USP, projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz sob CAAE 92414818.6.0000.5248.

3.1.2 PRIMERS E SONDAS

A construção foi feita de acordo com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank, de acordo com os números de acesso disponibilizados a seguir:

Gene	Número de acesso
<i>MLL</i>	L04284
<i>AF4</i> [t(4;11)]	L13773
<i>AF9</i> [t(9;11)]	L13774
<i>ENL</i> [t(11;19)]	D14539

TABELA 1. Números de acesso das sequências dos genes no Genbank.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). O desenho do projeto envolve 7 *primers* e 2 sondas para detecção simultânea das duas translocações, conforme apresentado abaixo, entretanto sem a possibilidade inicial de se especificar qual o parceiro translocado com o *MLL*. Essa determinação específica pode ser feita em uma segunda reação utilizando os *primers* separados. Para as sondas foram desenhados três pares para avaliação e escolha do melhor conjunto a ser utilizado. Devido ao escopo e o estado de andamento do projeto, as sequências dos oligonucleotídeos utilizados não serão disponibilizadas.

Transcrito	Primers forward (MLL)	Primers reverse (parceiro)	Sondas
<i>MLL-AF4</i>	2	2	2
<i>MLL-AF9</i>	2	3	2

TABELA 2.

O RNA das amostras clínicas foi extraído com o kit QIAmp RNA Blood Mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. De forma resumida, entre 1 e 1,5 mL de sangue dos pacientes com leucemia ou doadores saudáveis foram utilizados, sendo as hemácias lisadas e os leucócitos obtidos por centrifugação a 4 °C. Esses leucócitos foram lisados com solução de lise específica com beta-mercapto, adicionado etanol 70%, aplicados em coluna do kit e lavados com soluções próprias. O RNA final foi eluído em água RNase-free e quantificado por espectrofotometria no NanoDrop One (ThermoFischer).

3.1.3 SÍNTESE DE cDNA

Para padronização das reações, foi obtido cDNA de paciente com a translocação *MLL-AF4* e de linhagem THP-1, caracterizada como positiva para a translocação *MLL-AF9*. Esses cDNAs foram usados como controles positivos em reações envolvendo *primers reverse* de *AF4*, e *AF9* respectivamente.

Para as amostras clínicas, após a obtenção de amostra de RNA para padronização e teste, a síntese de cDNA foi realizada segundo o protocolo abaixo:

1. Com os microtubos no gelo, foram adicionados 5 µL de RNA;
2. Em cada microtubo foram adicionados 4,5 µL do mix 1 abaixo

Reagente	Volume (µL)
dNTP 10 mM	2
<i>Random primers</i> 500ng/µL	1
OligodT 5 µM	0,5
MgCl₂ 25 mM	1
Água	2,5
TOTAL	7

3. Os microtubos foram incubados a 65 °C por 5 minutos e colocados imediatamente no gelo;

4. Em cada microtubo foram adicionados 8 µL do mix 2 abaixo;

Reagente	Volume (µL)
RT <i>buffer</i> 5x	4
DTT 0,1M	2
RT 160U/µL	1
RNAse OUT 40U/µL	1
TOTAL	8

5. Os microtubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos;

6. Em seguida, foram incubados a 42 °C por 50 minutos e a 70 °C por 15 minutos;

7. Por fim, os microtubos foram armazenados a -20 °C.

3.1.4 AVALIAÇÃO DOS *PRIMERS* COM SYBR *GREEN*

Nessa primeira etapa, o objetivo era avaliar a especificidade e propriedades do *primers*, avaliando-os em amostras de DNA molde sabidamente positivas para essas translocações e utilizando SYBR *Green*. Foram feitas combinações de *primers* entre si (1 *primer forward* de *MLL* + 1 *primer reverse* de *AF4* ou de *AF9*) e combinação de todos os *primers* possíveis para cada amostra de cDNA puro (todos os *primers forward* de *MLL* + todos os *primers reverse* de *AF4* ou de *AF9*), totalizando 12 reações, mais duplicatas. Além disso, para as combinações de todos os *primers* possíveis, foram feitos controle negativo (com cDNA de paciente saudável) e branco. Os protocolos de reação seguem abaixo:

Reagente	1 reação (µL)	Reagente	1 reação (µL)
<i>Master Mix</i> SYBR <i>Green</i>	10	<i>Master Mix</i> SYBR <i>Green</i>	10
<i>MLL For</i> 5 µM	1	<i>MLL For</i> 1 5 µM	1
		<i>MLL For</i> 2 5 µM	1
<i>AF4 Rev</i> 5 µM	1	<i>AF4 Rev</i> 1 5 µM	1

		<i>AF4 Rev2</i> 5 μ M	1
cDNA	3	cDNA	3
H ₂ O	5	H ₂ O	3
Total	20	Total	20

Reagente	1 reação (μ L)	Reagente	1 reação (μ L)
<i>Master Mix SYBR Green</i>	10	<i>Master Mix SYBR Green</i>	10
<i>MLL For</i> 5 μ M	1	<i>MLL For1</i> 5 μ M	1
		<i>MLL For2</i> 5 μ M	1
<i>AF9 Rev</i> 5 μ M	1	<i>AF9 Rev1</i> 5 μ M	1
		<i>AF9 Rev2</i> 5 μ M	1
		<i>AF9 Rev3</i> 5 μ M	1
cDNA	3	cDNA	3
H ₂ O	5	H ₂ O	2
Total	20	Total	20

Ciclagem:

95°C – 5 minutos

95°C – 30secs

60°C – 30secs } 45x

72°C – 30secs

Curva de melting – 10 minutos

3.1.5 AVALIAÇÃO DOS *PRIMERS* E DAS SONDAS PARA TRANSLOCAÇÃO *MLL-AF4*

Após a análise dos *primers* foi feita a seleção do melhor conjunto de sondas, utilizando amostras sabidamente positivas para a translocação *MLL-AF4*, com todos os *primers forward* de *MLL* e todos os *primers reverse* de *AF4* juntos. As sondas foram testadas individualmente e nas seguintes combinações: Sonda 2 + Sonda 3, Sonda 4 + Sonda 5, Sonda 11 + Sonda 12. Os protocolos de reação seguem abaixo:

Reagente	1 reação (μ L) – Sondas individuais	1 reação (μ L) – Sondas combinadas
<i>Master Mix</i> 2x	10	10
<i>MLL For1</i> 5 μ M	0,6	0,6
<i>MLL For2</i> 5 μ M	0,6	0,6
<i>AF4 Rev1</i> 5 μ M	0,6	0,6

<i>AF4 Rev2</i> 5 µM	0,6	0,6
Sonda A 5 µM	0,4	0,4
Sonda B 5 µM	-	0,4
cDNA	3	3
H ₂ O	4,2	3,8
Total	20	20

Ciclagem:

95°C – 5 minutos
 95°C – 30secs
 60°C – 30secs
 72°C – 30secs

} 45x

3.1.6 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE *PRIMERS* DE *AF9* E *ENL* NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE *AF4*

Com a etapa anterior foi possível escolher o melhor conjunto de sondas para detecção da translocação *MLL-AF4*, entretanto em um contexto só com *primers* reversos para *AF4*. Por isso foi testado se a presença de *primers reverse* de *AF9* e de *ENL* afetaria a performance dos *primers reverse* de *AF4* na reação de amplificação, como forma de averiguar a funcionalidade de um sistema *multiplex* com um cDNA para *AF4*. O protocolo utilizado foi o mesmo protocolo de “Sondas combinadas” descrito no item anterior, adicionando 0,6 µL de cada *primer* reverso de *AF9* e de *ENL* e diminuindo a quantidade de H₂O para completar a reação até 20 µL.

3.1.7 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E *PRIMERS REVERSE* DE *AF4*

Nessa etapa, para se ter um contexto real e mais complexo, amostras clínicas de pacientes diagnosticados com LLA e de pacientes diagnosticados com LMC foram testadas, utilizando o conjunto de sondas que obteve melhor performance nos testes anteriores e somente os *primers reverse* de *AF4*, segundo o protocolo de reação descrito abaixo:

Reagente	1 reação (µL)
<i>Master Mix</i> 2x	10
<i>MLL For1</i> 20 µM	0,25
<i>MLL For2</i> 20 µM	0,25
<i>AF4 Rev1</i> 20 µM	0,25

AF4 Rev2 20 µM	0,25
Sonda 2 20 µM	0,3
Sonda 3 20 µM	0,3
cDNA	3
H ₂ O	5,4
Total	20

Ciclagem:

95°C – 5 minutos
 95°C – 30secs
 60°C – 30secs
 72°C – 30secs

} 45x

3.1.8 AVALIAÇÃO DE PRIMERS REVERSE DE AF9 COM PRIMERS FORWARD DE MLL

Essa etapa foi utilizada para avaliar em PCR convencional os *primers forward MLL* e *reverse AF9* em amostra positiva para a translocação *MLL-AF9* (linhagem THP-1). Após a reação de PCR, o produto foi aplicado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para visualização da banda. Com a determinação aproximada do tamanho do produto amplificado é possível confirmar a presença da translocação *MLL-AF9* na amostra THP-1, além de ser possível indicar qual o ponto de quebra dessa amostra. Para isso, foram realizadas reações utilizando combinações de *primers MLL forward* e *AF9 reverse*, segundo os protocolos abaixo:

Reagente	1 reação (µL)	Reagente	1 reação (µL)
<i>Master Mix ZDC 3x</i>	8,33	<i>Master Mix ZDC 3x</i>	8,33
<i>MLL For 5 µM</i>	1	<i>MLL For1 5 µM</i>	1
		<i>MLL For2 5 µM</i>	1
<i>AF9 Rev 5 µM</i>	1	<i>AF9 Rev1 5 µM</i>	1
		<i>AF9 Rev2 5 µM</i>	1
		<i>AF9 Rev3 5 µM</i>	1
cDNA	2	cDNA	2
H ₂ O	12,67	H ₂ O	9,67
Total	25	Total	25

Ciclagem:

95°C – 10mins
 95°C – 30secs
 60°C – 30secs
 72°C – 30secs

} 45x

3.1.9 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE *PRIMERS* DE *AF4* E *ENL* NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE *AF9*

Essa etapa foi realizada para observar se a reação de detecção da translocação *MLL-AF9* por RT-qPCR na linhagem THP-1 seria afetada pela presença de *primers* reversos pra *AF4* e *ENL*, ou seja, se o sistema *multiplex* com os *primers forward MLL* e reversos *AF4*, *AF9* e *ENL* afetaria a performance da reação. Os protocolos utilizados nessa etapa estão apresentados abaixo:

Reagente	1 reação (µL) – Reversos de <i>AF9</i>	Reagente	1 reação (µL) – Reversos de <i>AF4</i> , <i>AF9</i> e <i>ENL</i>
<i>Master Mix</i> 2x	10	<i>Master Mix</i> 2x	10
<i>MLL F1</i> 5 µM	1	<i>MLL F1</i> 20 µM	0,25
		<i>MLL F2</i> 20 µM	0,25
<i>MLL F2</i> 5 µM	1	<i>AF4 R1</i> 20 µM	0,25
		<i>AF4 R2</i> 20 µM	0,25
<i>AF9 R1</i> 5 µM	1	<i>AF9 R1</i> 20 µM	0,25
		<i>AF9 R2</i> 20 µM	0,25
<i>AF9 R2</i> 5 µM	1	<i>AF9 R3</i> 20 µM	0,25
		<i>ENL R1</i> 20 µM	0,25
<i>AF9 R3</i> 5 µM	1	<i>ENL R2</i> 20 µM	0,25
Sonda 2 10 µM	0,5	Sonda 2 10 µM	0,5
Sonda 3 10 µM	0,5	Sonda 3 10 µM	0,5
cDNA	2	cDNA	2
H ₂ O	2	H ₂ O	4,75
Total	20	Total	20

Ciclagem:

95°C – 10mins

95°C – 30secs

60°C – 30secs

72°C – 30secs

} 45x

3.1.10 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E *PRIMERS REVERSE* DE *AF9*

Em RT-qPCR, amostras clínicas de pacientes com leucemia foram testadas, utilizando o melhor conjunto de sondas e somente os *primers reverse* de *AF9*, seguindo o protocolo a seguir:

Reagente	1 reação (µL)
<i>Master Mix 2x</i>	10
<i>MLL For1 20 µM</i>	0,25
<i>MLL For2 20 µM</i>	0,25
<i>AF9 Rev1 20 µM</i>	0,25
<i>AF9 Rev2 20 µM</i>	0,25
<i>AF9 Rev3 20 µM</i>	0,25
Sonda 2 10 µM	0,5
Sonda 3 10 µM	0,5
cDNA	3
H ₂ O	4,75
Total	20

Ciclagem:

95°C – 10mins

95°C – 30secs

60°C – 30secs

72°C – 30secs

} 45x

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS COM SYBR GREEN

Nesta primeira etapa tivemos como objetivo observar se as amostras sabidamente positivas para as translocações *MLL-AF4* e *MLL-AF9* seriam detectadas pelos *primers* desenhados para o projeto. Para a amostra de *MLL-AF4* foi possível observar amplificação na combinação *MLLF1+AF4R1*, enquanto na amostra de *MLL-AF9* foi possível observar amplificação na combinação *MLLF1+AF9R3*, indicando que os *primers* do projeto são capazes de detectar as amostras caracterizadas como controle positivo, de acordo com a FIGURA 7.

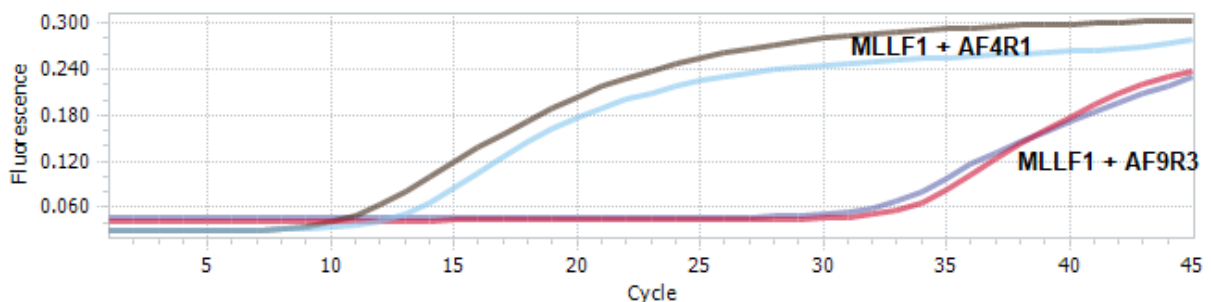


FIGURA 7. Curvas de amplificação da combinação *MLLF1+AF4R1* (em cinza e em azul claro) e da combinação *MLLF1+AF9R3* (em lilás e em rosa).

4.2 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS E DAS SONDAS PARA TRANSLOCAÇÃO *MLL-AF4*

Com a observação de que os *primers* para *MLL-AF4* e para *MLL-AF9* são capazes de detectar a translocação nas amostras positivas, nessa segunda etapa realizamos a análise para a escolha do melhor conjunto de sondas para essa detecção. Foi possível observar que a reação com a combinação das sondas 2 e 3 apresentou amplificação na amostra positiva *MLL-AF4*, enquanto os outros dois conjuntos não apresentaram, como mostra a FIGURA 8.

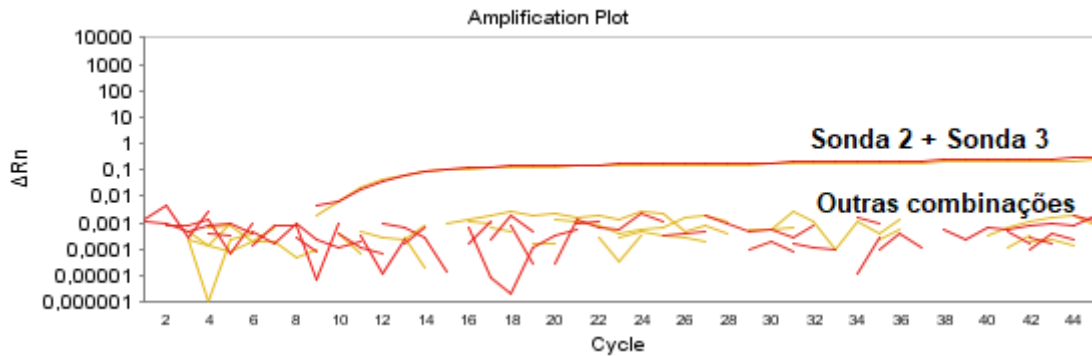


FIGURA 8. Curva de amplificação da reação com o conjunto de sondas 2 e 3, em alaranjado, isolada das demais curvas.

Adicionalmente, para otimização da reação, a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi reduzida de 60°C para 58°C. Como mostrado na FIGURA 9, novamente houve amplificação somente no conjunto de sondas 2+3 e não houve amplificação das reações do conjunto 4 e 5 e do conjunto 11 e 12.

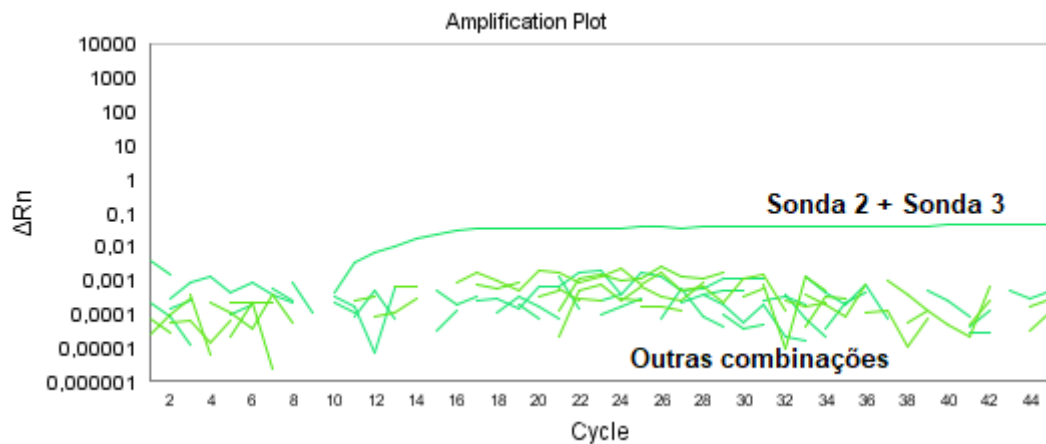


FIGURA 9. Curva de amplificação da reação com o conjunto de sondas 2 e 3, em verde, destacada das demais curvas.

4.3 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE *PRIMERS* DE *AF9* E *ENL* NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE *AF4*

Com a escolha do conjunto de sondas 2+3, essa etapa tinha como objetivo observar se a adição de *primers* reversos para *AF9* e *ENL*, juntamente com os *primers*

reversos para *AF4*, provocariam uma perda de performance na reação. Como mostrado na FIGURA 10, a presença destes *primers reverse* adicionais não alterou a performance da reação de amplificação, gerando curvas muito similares em ambos os casos. Isso indica que o sistema *multiplex* com presença simultânea de *primers* para detecção de *AF4*, *AF9* e *ENL* não reduz a performance para amostras com a translocação *MLL-AF4*.

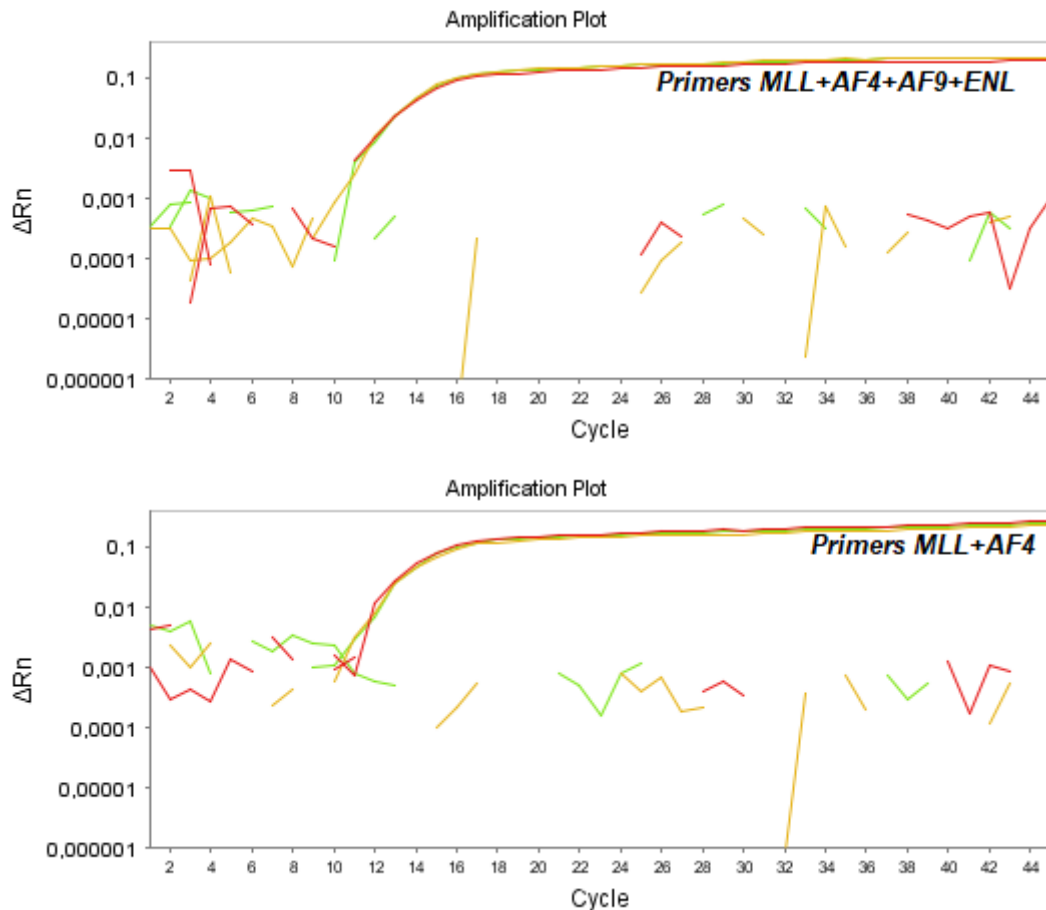


FIGURA 10. Comparação entre curvas de amplificação da reação com a presença de mais *primers reverse* com as curvas da reação com *primers reverse* apenas de *AF4*.

4.4 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E *PRIMERS REVERSE* DE *AF4*

Nesta etapa de avaliação da detecção da translocação *MLL-AF4*, utilizamos um contexto real e complexo, com o uso de amostras clínicas de pacientes com leucemia. Houve amplificação somente em 2 amostras de LLA e 5 amostras de LMC, como

mostra a FIGURA 11. Entretanto, a intensidade de fluorescência (ΔRn) foi pequena, com amplificação tardia em diversas amostras e sem repetição nas réplicas de LMC.

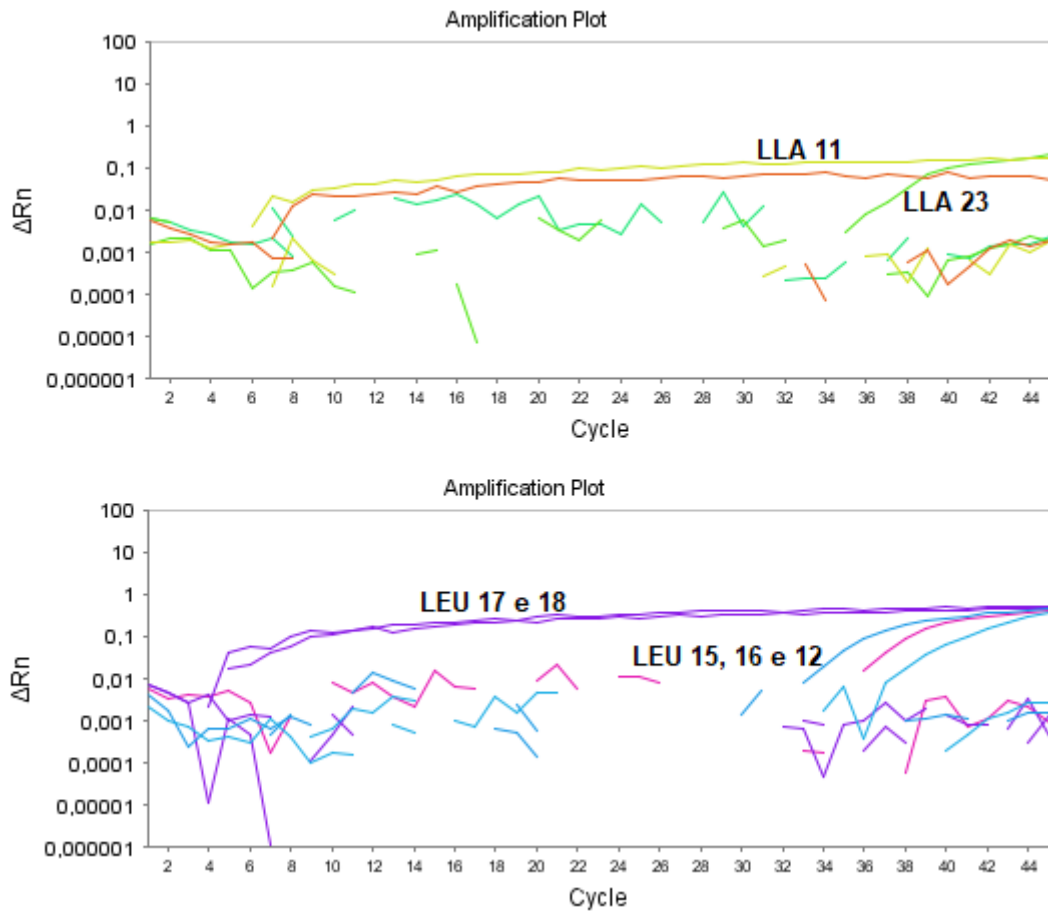


FIGURA 11. Acima: Curvas de amplificação da amostra LLA 11 (em amarelo e em vermelho) e da amostra LLA 23 (em verde). Abaixo: Curvas de amplificação das amostras LEU 17 e LEU 18 (em roxo, sobrepostas) e das amostras LEU 15, LEU 16 e LEU 12 (em azul, rosa e azul, respectivamente).

4.5 AVALIAÇÃO DE *PRIMERS REVERSE* DE *AF9* COM *PRIMERS FORWARD* DE *MLL*

Com o início da padronização da detecção da translocação *MLL-AF9*, a PCR realizada conforme descrito nos materiais e métodos foi aplicada em gel de agarose 1%, sendo possível observar a presença de banda entre 200 e 300pb na reação com o conjunto *MLLF1+AF9R2*. Isso indica que a linhagem celular THP-1 apresenta a translocação *MLL-AF9*, que é detectada pelo conjunto de *primers* acima indicado.

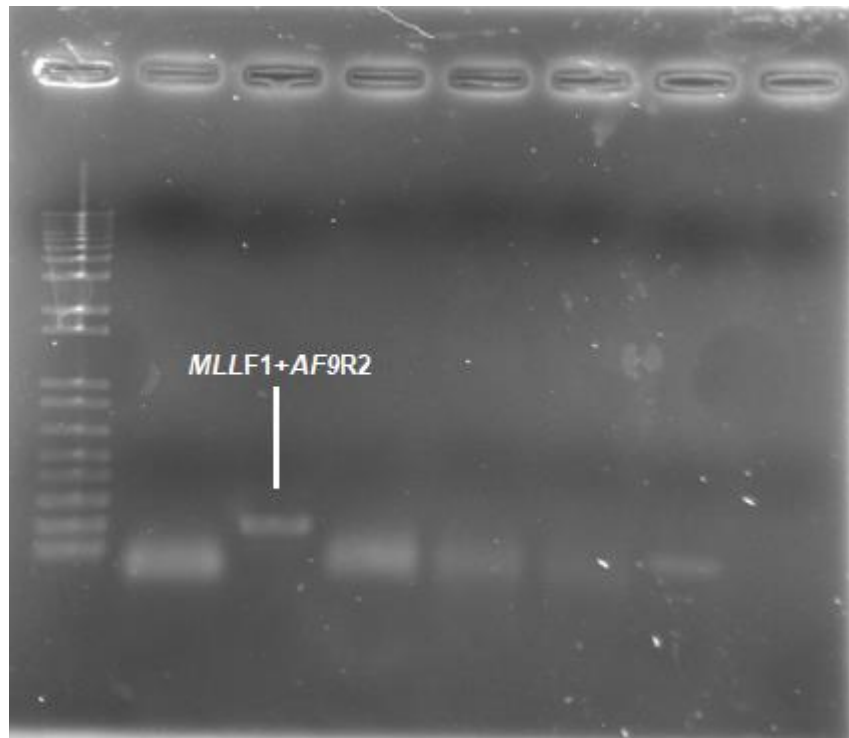


FIGURA 12. Banda de 200pb-300pb apresentada pela amplificação com *MLLF1+AF9R2* da translocação *MLL-AF9*, presente na linhagem de THP-1.

4.6 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIA DE *PRIMERS* DE *AF4* E *ENL* NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE *AF9*

Com a confirmação da detecção da translocação *MLL-AF9* na amostra THP-1, e como observado anteriormente que o conjunto de sondas 2+3 é o de melhor performance, foi realizada RT-qPCR para avaliação do sistema *multiplex*. Nesse contexto, a reação utilizando somente *primers MLL forward* e *AF9 reverse* apresentou performance semelhante a obtida quando os *primers reverse* para *AF4* e *ENL* foram adicionados, conforme mostrado na FIGURA 13. Isso indica que o sistema *multiplex*, contendo *primers* para a detecção simultânea das translocações *MLL-AF4*, *MLL-AF9* e *MLL-ENL* não reduz a performance para a detecção da translocação *MLL-AF9*.

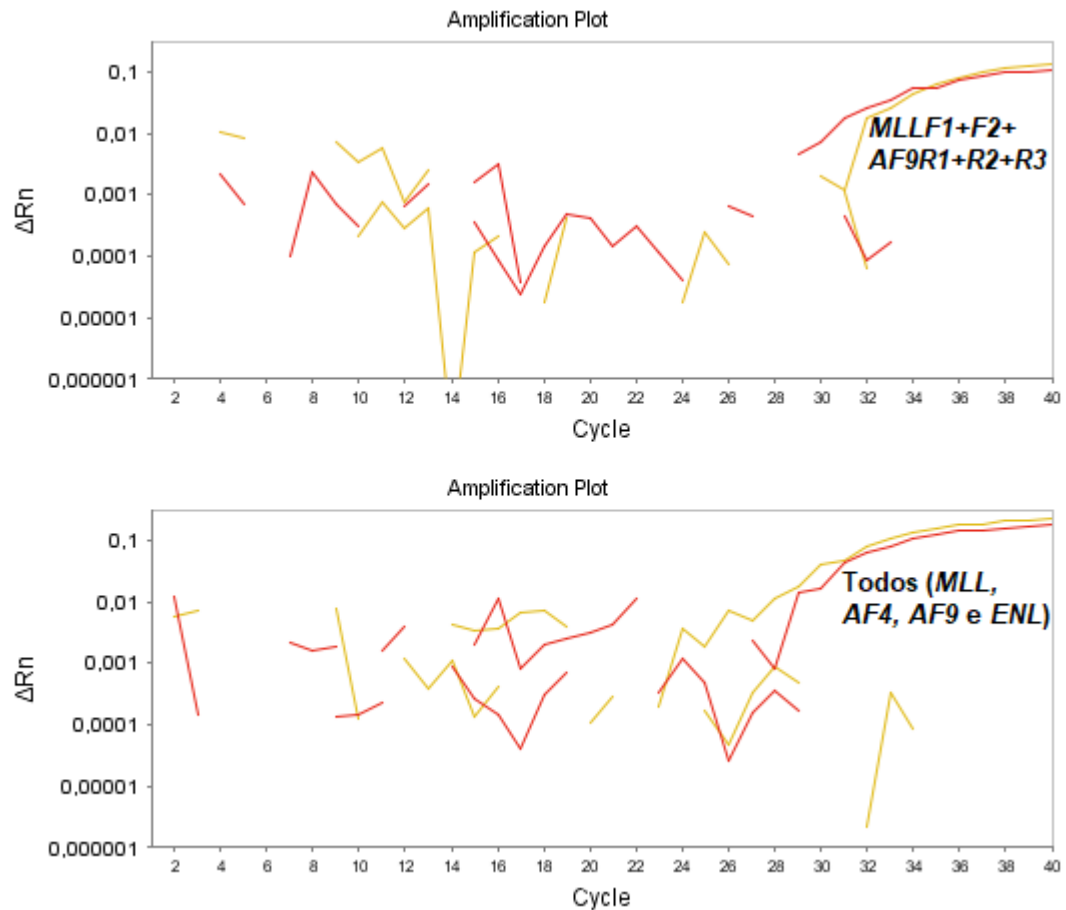


FIGURA 13. Superior: amplificação da reação com todos os *primers forward* de *MLL* e todos os *primers reverse* de *AF9*. Inferior: amplificação da reação com todos os *primers forward* de *MLL* e todos os *primers reverse* de *AF4*, *AF9* e *ENL*.

4.7 AVALIAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS, COM O CONJUNTO DAS SONDAS 2 E 3 E *PRIMERS REVERSE* DE *AF9*

Nessa última etapa do trabalho com a translocação *MLL-AF9*, foram realizadas reações para a detecção desta em amostras clínicas de pacientes. Essa etapa não foi bem-sucedida, pois não foi possível observar amplificação em nenhuma amostra, além de também não ter apresentado amplificação do controle positivo.

5 DISCUSSÃO

Considerando que o diagnóstico de LLA hoje no Brasil é, em geral, realizado por métodos nem sempre capazes de confirmar a presença de transcritos de leucemia no paciente, é importante desenvolver estudos que contribuam para a construção de ferramentas que possam aprofundar essa análise. Este projeto, ao voltar-se para o ensaio de um sistema *multiplex* que abrange os dois principais tipos de rearranjo com translocação do gene *MLL*, busca auxiliar e facilitar esse tipo de diagnóstico.

É necessário destacar a importância de se desenvolver um sistema *multiplex* para esse tipo de investigação. Sistemas *singleplex*, por focarem em apenas um alvo, demandam de maior tempo para constituírem uma análise completa. Considerando ainda a baixa frequência de casos em geral de leucemia com recombinação de *MLL* (JANSEN et al., 2005), não é viável investigar um rearranjo por vez. Ao analisar várias possibilidades de translocação de *MLL* ao mesmo tempo, é possível determinar, de forma mais rápida, se o caso se trata de uma leucemia com rearranjo de *MLL* ou não, o que torna o diagnóstico mais ágil. Inclusive, já houve um estudo utilizando-se de *multiplex* RT-qPCR para analisar a presença de 10 diferentes transcritos envolvidos em leucemia e até mesmo a presença de um transcrito envolvido em tumores renais (OSUMI et al., 2002).

Alguns estudos recentes propõem a análise de transcritos presentes em leucemia, inclusive os não relacionados ao *MLL*, por meio de *multiplex* RT-PCR (LIMSUWANACHOT et al., 2016; YANG et al., 2017). Porém, a versão em tempo real deste método pode ser uma alternativa mais interessante, visto que, além de levar menos tempo, a RT-qPCR não necessita de técnicas pós-amplificação para visualização de resultados, que aumentam o risco de contaminação do produto (JANSEN et al., 2005).

Além da RT-qPCR, há outros métodos moleculares de detecção de translocações de *MLL*, como *Southern Blotting* e *FISH*. Porém, esses métodos são incapazes de detectar qual o gene parceiro na translocação com o *MLL* (JANSEN et al., 2005), o que constitui uma vantagem para a RT-qPCR.

Este projeto teve um escopo e planejamento para desenvolvimento, otimização e validação de um teste diagnóstico molecular. A ideia e passo a passo foi realizar a validação dos *primers* com a estratégia de utilização de SYBR *Green* e com PCR convencional, com eletroforese em gel da agarose. Com a confirmação de que os

primers escolhidos são capazes de detectar a translocação de interesse, buscamos em seguida realizar a escolha do melhor conjunto de sondas. O objetivo com a utilização das sondas é aumentar a especificidade da reação, inserindo mais duas sequências que são específicas a região de interesse a ser detectada, além de vislumbrarmos reações de detecção de mais de um alvo simultâneo, com sondas com fluoróforos distintos. A escolha dos oligonucleotídeos e suas propriedades (sequências, estruturas secundárias, temperatura de *melting*) em uma reação de RT-qPCR para diagnóstico molecular pode ser caracterizada como a etapa mais importante do desenvolvimento da reação, por isso realizamos o teste com três conjuntos de sondas. Seguindo a lógica experimental, precisamos demonstrar que uma reação *multiplex*, ou seja, com a presença de mais do que um par de *primers* e uma sonda, não reduz a performance da reação, principalmente em testes que exigem alta sensibilidade diagnóstica. Como última etapa realizamos a busca pelas translocações de estudos em amostras clínicas, por ser um ambiente real e mais complexo do que o utilizado no desenvolvimento.

Neste projeto, observamos que a estratégia com as sondas específicas conjugadas com FAM se mostrou interessante, com o conjunto das sondas 2 e 3 promovendo amplificação, tanto no caso da reação com *AF4* quanto no caso da reação com *AF9*.

Além disso, a presença de *primers reverse* não-específicos para a translocação presente na amostra - seja ela com o parceiro *AF4* ou para *AF9* - não prejudicou a performance de amplificação. Dessa forma, a expectativa de sucesso para o sistema *multiplex* se confirmou, pelo menos em situação experimental. Infelizmente, como a quantidade disponível de cada amostra clínica era baixa e, portanto, não seria viável refazer os testes que obtiveram resultado negativo (reação com *AF9*) ou baixa qualidade das curvas de amplificação (reação com *AF4*), não foi possível validar o ensaio *multiplex* com as amostras clínicas, assim como não foi possível prosseguir com o sequenciamento destas amostras para comparação com os resultados dos testes.

Ainda sobre o sistema *multiplex*, foi importante utilizar também os *primers reverse* de *ENL*, apesar de não haver disponibilidade de um controle positivo com translocação envolvendo este gene para realizar um estudo mais robusto. Ao inseri-los nas reações de amplificação com *AF4* e *AF9*, foi possível verificar que essas amplificações não foram afetadas pela presença desses *primers*, o que é útil para

estudos futuros que venham a estudar a translocação t(11;19) no contexto de um diagnóstico para leucemia.

Para o desenvolvimento completo e integral de um teste diagnóstico molecular ainda estão pendentes uma série de características. No nosso contexto tínhamos baixa disponibilidade de amostra sabidamente positiva para *MLL-AF4*. A disponibilidade de mais material biológico desta translocação, seja através de linhagem celular caracterizada ou por clonagem em plasmídeos é essencial para o andamento do projeto. Com essa maior disponibilidade de material devem ser realizados ensaios para a obtenção da eficiência de reação e também do limite de detecção, que são propriedades analíticas essenciais para uma reação de diagnóstico molecular.

Outro parâmetro essencial está em função da inserção de um controle endógeno, ou seja, a adição de um par de *primer* e uma sonda com fluoróforo diferente de FAM. Isso é essencial para um controle interno, ou seja, que deve amplificar em todas amostras. Esse controle interno indica que o RNA foi extraído e sintetizado a cDNA, o qual é colocado no poço e indica que a reação funcionou corretamente, tanto pela qualidade dos insumos como *master mix* e oligonucleotídeos, quanto pelo protocolo de ciclagem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Esse projeto teve como intuito auxiliar e iniciar o desenvolvimento de um teste molecular diagnóstico para translocações *MLL* em pacientes com leucemia. Apesar da impossibilidade de testar o sistema *multiplex* em uma condição mais próxima de uma situação real de leucemia, o projeto pôde estabelecer alguns pontos importantes para esse desenvolvimento. Os estudos futuros podem utilizar-se desses resultados e aprofundar ainda mais a análise, abordando outras translocações envolvendo o *MLL* e definindo parâmetros que otimizem as reações de RT-qPCR. Entre os pontos discutidos e abordados como perspectivas e necessidades podemos destacar a obtenção de amostras positivas para a translocação *MLL-AF4* e o desenho e validação de oligonucleotídeos como controle endógeno. Com isso podemos gerar resultados analíticos das reações, como eficiência de reação e limite de detecção e em seguida obter resultados de propriedades diagnósticas como sensibilidade e especificidade. As amostras clínicas de pacientes com leucemia que apresentaram amplificação nesse projeto devem ser sequenciadas por método Sanger para a confirmação da translocação, indicando um resultado adequado do ensaio. Entretanto, acreditamos que o principal ponto a ser abordado inicialmente consiste na qualidade das sondas. Como visto nas figuras, a intensidade de fluorescência gerada nos ensaios é muito pequena, além de uma intensidade de ruído alto, levando a crer na presença de sondas degradadas ou com baixa qualidade de síntese ou acoplamento de fluoróforo. Esperamos que uma nova síntese do conjunto de sondas 2 e 3, com um processo de purificação adequado, deverá aumentar a sensibilidade e performance da reação. Com isso, será possível desenvolver uma metodologia capaz de identificar casos de leucemia linfóide aguda de forma mais prática, ágil e certa, contribuindo para um tratamento mais eficiente da doença.

7 REFERÊNCIAS

ALL IC-BFM 2009 - A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. 2009. International BFM Study Group. Disponível em: <http://www.bialaczka.org/wp-content/uploads/2016/10/ALLIC_BFM_2009.pdf>

BALLABIO, E.; MILNE, T. A. **Molecular and Epigenetic Mechanisms of *MLL* in Human Leukemogenesis.** *Cancers*, v.4, p. 904-944, 2012. MDPI Journals.

BROWN, P. **Treatment of infant leukemias: challenge and promise.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p.596-600, 2013.

Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA) – Ministério da Saúde., 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>

GANAZZA, M. A. **Estudo de doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da criança e do adolescente.** Tese (doutorado), 2014. Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN): Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, 2018. Lyon, França. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>

HOFFBRAND, A. V.; MOSS P. A. H. **Fundamentos em Hematologia.** 6ª edição, 2013. Editora Artmed, Porto Alegre.

JANSEN, M.W.J.C.; VAN DER VELDEN, V.H.J.; VAN DONGEN, J.J.M. **Efficient and easy detection of *MLL*-AF4, *MLL*-AF9 and *MLL*-ENL fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler.** *Leukemia*, v. 19, p. 2016–2018, 2005.

JIN, M. W.; XU, S. M.; AN, Q.; WANG, P. **A review of risk factors for childhood leukemia.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 20, p. 3760-3764, 2016.

Leucemia. Instituto Nacional de Câncer (INCA) – Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>

LIMSUWANACHOT, N. et al. **Multiplex RT-PCR Assay for Detection of Common Fusion Transcripts in Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia Cases.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol 17, p. 677-684, 2016.

MEYER, C. et al. **The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2013.** *Leukemia*, vol. 27, p. 2165-2176, maio de 2013. Nature Publishing Group.

MILNE, T. A. **Mouse models of *MLL* leukemia: recapitulating the human disease.** *Blood*, vol. 129 (16), p. 2217-2223, 2017. The American Society of Hematology.

MOHSENI, M.; ULUDAG, H.; BRANDWEIN, J. M. **Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications**. American Journal of Blood Research, vol. 8 (4), p.29-56, 2018.

NADEAU, G. et al. **Identification of genetic variants associated with skeletal muscle function deficit in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors**. Pharmacogenomics and Personalized Medicine, vol. 12, p. 33-45, 2019.

OSUMI, K. et al. **Rapid Screening of Leukemia Fusion Transcripts in Acute Leukemia by Real-time PCR**. Leukemia & Lymphoma, vol. 43:12, p. 2291-2299, 2002.

STEINHILBER, D.; MARSCHALEK, R. **How to effectively treat acute leukemia patients bearing *MLL*-rearrangements?**. Biochemical Pharmacology, 2017. Editora Elsevier.

VAN DOGEN, J. J. M. et al. **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease**. Leukemia, v. 13, p. 1901-1928, 1999. Nature Publishing Group.

World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer (IARC) – World Health Organization, 2014. Disponível em:
<<https://www.drugsandalcohol.ie/28525/1/World%20Cancer%20Report.pdf>>

YANG, H. et al. **The incidence and distribution characteristics of *MLL* rearrangements in Chinese acute myeloid leukemia patients by multiplex nested RT-PCR**. Technology and Health Care, v. 25, p. S259–S265, 2017.