

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOIZE PAULA ZANON DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA AS PRINCIPAIS
TRANSLOCAÇÕES DE IMPACTO CLÍNICO NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA

CURITIBA

2018

HELOIZE PAULA ZANON DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA AS PRINCIPAIS
TRANSLOCAÇÕES DE IMPACTO CLÍNICO NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA

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

Orientadora: Jaqueline Carvalho de Oliveira

Co-orientador: Mateus Nobrega Aoki

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus que está sempre ao meu lado me guiando, abençoando e sendo tão bom em todos os momentos.

À minha mãe que me deu todo amor e apoio desde o início e mesmo que não esteja mais nesse mundo fisicamente, está sempre me acompanhando de coração e de alma. Obrigada por me ensinar que nessa vida nada é impossível com fé, esperança, amor e muita alegria, eu não conseguiria concluir sem você ao meu lado.

À minha família, em especial meus primos Isabela, Lais, Lucas, Raissa e Franciele, minhas queridas “Marias”, Benjamin e Clarice que mostraram que a vida é melhor quando estamos juntos.

Às amigas que a faculdade me deu de presente, Ana, Sophia, Nicoli, Luiza, Thaina, Priscilla, Fernanda, Gabriela e Rafaela, por todo o apoio, conselhos e puxões de orelha.

Aos amigos que a vida me deu de presente, Adriana, Giulia, Mariana, Reron, Glaucia, Eliete, Paulo, Sandra, Cosmo, Alana, Rosana, Julia, Renata, Luciana, Angélica, que mesmo em estados diferentes sempre se fizeram presentes.

Aos meu orientadores, Mateus e Jaqueline, por terem me guiado durante todo esse ano com muita paciência, apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À todos que não foram mencionados aqui, mas que se fizeram presente neste último ano.

E também ao Instituto Carlos Chagas e todos os pesquisadores, colaboradores e técnicos, que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

Muito Obrigada.

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma patologia que afeta, no Brasil, 1 a cada 25.000 crianças principalmente de 2 e 3 anos de idade. Além dos testes diagnósticos mais comuns, como a anamnese, hemograma e mielograma, a OMS indica a aplicação também de testes para identificar anormalidades cromossômicas. Este trabalho foi desenvolvido para suprir a necessidade de ter disponível um kit diagnóstico que seja preciso, mais sensível, rápido e de baixo custo para identificar translocações presentes em pacientes com LLA. Para isto foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), para identificar 3 translocações cromossômicas mais frequentes da LLA: *BCR-ABL1* [t(9;22)]; *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] e *TCF3-PBX1* [t(1;19)]. Testes comparativos indicaram que realizar o teste em sistema *multiplex* não afeta a precisão do kit, sendo possível então realizar em uma única reação a identificação do *BCR-ABL1* p190 e p210, e em outra o *ETV6-RUNX1* e o *TCF3-PBX1*, adicionalmente à amplificação do controle positivo. Em cada reação foi utilizada a RNA polimerase II como controle positivo endógeno, que de acordo com os testes realizados com amostras de indivíduos saudáveis, devem ter um CT entre 20 e 25 para que o resultado seja considerado válido. Este kit apresenta uma sensibilidade de 10^2 cópias/ μ L para o transcrito *BCR-ABL1* p190, 10^3 cópias/ μ L para o *BCR-ABL1* p210, 10^2 cópias/ μ L para o *ETV6-RUNX1* e 10^1 cópias/ μ L para o *TCF3-PBX1*. O limite de detecção (LoD) para o *ETV6-RUNX1* e o *TCF3-PBX1* foi de 135,48 cópias e 8,83 cópias, respectivamente, sendo necessário mais testes para determinar os valores de LoD para o *BCR-ABL1*. Esses valores indicam uma maior sensibilidade desta técnica do que comparada ao FISH (*fluorescent in situ hybridization*), sendo possível estratificar os pacientes em grupos de risco, acompanhar da resposta aos tratamentos quimioterápicos, identificar pacientes com doença residual mínima e resposta citogenética completa.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda; LLA; qRT-PCR; translocações cromossômicas; *BCR-ABL1*; *ETV6-RUNX1*; *TCF3-PBX1*.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) affects 1 in 25.000 children in Brazil, mostly those with 2 or 3 years old. Besides common diagnostic tests, such as anamnesis, WBC (white blood cell) count at diagnosis and bone marrow examination, World Health Organization (WHO) recommends testing for chromosomal aberrations as well. This project aim to develop diagnostic kit more precise, more sensitive, faster and with a lower cost than the current commercial available to detect translocations in ALL patients. To develop this kit it was used the quantitative real-time PCR (qRT-PCR), to detect three frequent translocations on ALL: *BCR-ABL1* [t(9;22)]; *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] and *TCF3-PBX1* [t(1;19)]. Comparative tests showed that the triplex system does not affect the accuracy of the kit, making it possible to identify in one reaction the presence of *BCR-ABL1* p190 and p210, and in other reaction the presence of *ETV6-RUNX1* and *TCF3-PBX1*, further the positive control. In all reactions RNA polymerase II was used as endogenous positive control and, according to the tests in samples from healthy donors, positive control must have a CT (cycle threshold) between 20 and 25 to validate the reaction. This kit is sensible enough to detect 10^2 copies/ μL of *BCR-ABL1* p190 transcript, 10^3 copies / μL of *BCR-ABL1* p210, 10^2 copies/ μL of *ETV6-RUNX1* and 10^1 copies/ μL of *TCF3-PBX1*. The limit of detection (LoD) for *ETV6-RUNX1* and *TCF3-PBX1* is 135.48 copies e 8.83 copies, respectively, and additional tests are required to determine the LoD for *BCR-ABL1*. These values indicate greater sensitivity of this technique when compared to FISH (*fluorescent in situ hybridization*), making it possible to classify ALL patients in groups of risk, follow the response to chemotherapeutic treatment, detection of minimal residual disease and complete cytogenetic response.

Key-words: Acute lymphoblastic leukemia; ALL; qRT-PCR; chromossomic translocations; *BCR-ABL1*; *ETV6-RUNX1*; *TCF3-PBX1*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Leucemias	8
1.2. Leucemia Linfoide Aguda (LLA)	10
1.3. Translocações cromossômicas	14
1.3.1. Translocação t(9;22)	14
1.3.2. Translocação t(12;21)	16
1.3.3. Translocação t(1;19)	17
1.4. JUSTIFICATIVA	18
1.5. OBJETIVOS	18
1.5.1. Objetivo Geral	18
1.5.2. Objetivos Específicos	19
2. METODOLOGIA	20
2.1. Materiais e Métodos	20
2.1.1. <i>Primers</i> e Sondas	20
2.1.2. <i>Template</i> de síntese de cDNA	21
2.1.3. Confirmação, clonagem dos amplicons e geração de controles positivos	22
2.1.4 Desenho da qRT-PCR	22
2.1.5. Comparação <i>singleplex</i> vs <i>multiplex</i>	24
2.1.6. Critérios de avaliação	24
2.1.7. Cálculo eficiência e sensibilidade da reação	24
2.1.8. Critérios Éticos	25
2.1.9. Determinação de linha de corte do endógeno RNA Polimerase II	26
2.1.9. Avaliação em amostras clínicas	26

2.2. Teste cego	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Comparação da Reação em <i>singleplex</i> e <i>multiplex</i>	28
3.2. Comparação de diferentes Reagentes.....	29
3.3. Sensibilidade do ensaio	32
3.4. Determinação de linha de corte do endógeno RNA Polimerase II	35
3.5. Avaliação em Amostras Clínicas.....	36
3.5.1. Amostras de Leucemia Linfoide Aguda	36
3.5.2. Teste cego	37
4. DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemias

As leucemias são um grupo de doenças caracterizadas pelo acúmulo de células hematopoiéticas na medula óssea e no sangue e representam 2,5% de todos os tipos de câncer em todo o mundo (HOFFBRAND, 2011; IARC, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a leucemia corresponde a 33,2% de todos os tipos de cânceres infantis e 10,9% de todos os tipos de câncer em adolescentes e adultos, sendo considerada uma das principais causas de morte por câncer até 29 anos em ambos os sexos no Brasil. (INCA, 2017).

As leucemias são divididas em quatro tipos principais: leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC). Essa classificação é baseada no fenótipo celular e no grau de diferenciação das células neoplásicas. (GINSBURG, WILLARD, 2012).

O fenótipo celular se refere ao tipo de linhagem celular afetada, podendo ser mieloide ou linfóide, identificada a partir de sua morfologia e citoquímica visualizados no mielograma. A linhagem linfóide dá origem aos linfócitos T e B e às células NK. Já a mieloide dá origem às outras células hematopoiéticas, como basófilo, neutrófilo, eosinófilo, monócito, macrófago e trombócitos (FIGURA 1) (HOFFBRAND, 2011; INCA, 2017).

O grau de diferenciação classifica as leucemias em aguda ou crônica, com base no tempo de evolução da doença. As agudas apresentam um quadro de evolução rápido e têm uma rápida proliferação das células leucêmicas, fazendo com que a hematopoese não seja completa e acumule células indiferenciadas e imaturas, denominadas precursores mieloide ou linfóide (FIGURA 1), no sangue e na medula óssea (O'DONNELL, 2012; LÖWENBERG, 1999; INCA, 2007)

As crônicas têm um desenvolvimento mais lento, geralmente é diagnosticado em estágio mais avançado e as células apresentam uma maturação parcial, ocasionando em função celular fique debilitada e certa resistência ao ciclo normal de morte celular, acumulando na medula óssea e aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea (INCA, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

FIGURA 1: HEMATOPOESE

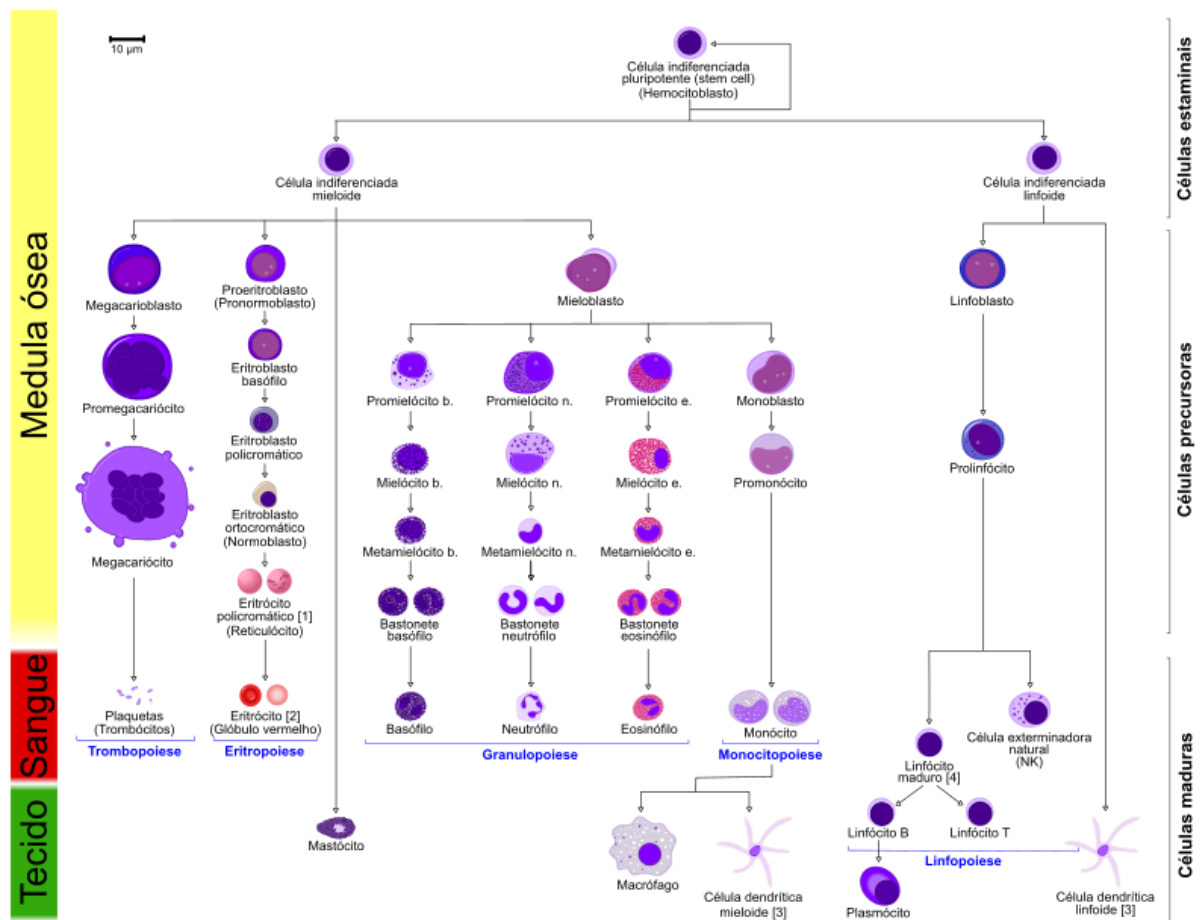


Figura 1: Hematopoiese é o processo de síntese das células sanguíneas. Na leucemia a síntese é incompleta fazendo com que acumule na medula óssea e no sangue células precursoras linfóides ou mielóides, no caso das leucemias agudas, ou células parcialmente maduras, nas leucemias crônicas. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Hematopoiese>

A LMA é rara antes dos 45 anos, sendo 68 anos a média nacional, de acordo com o INCA, com uma sobrevida global de 26,6% calculado no período de 2006 a 2012. É possível diagnosticar esta leucemia de 1 a 3 meses após o aparecimento inicial dos sintomas e o hemograma mostra eritropenia, neutropenia e plaquetopenia (INCA, 2018; LEYTO-CRUZ, 2018).

A LLC é diagnosticada raramente em adultos abaixo de 40 anos e é extremamente rara em crianças. De acordo com a estimativa do INCA, a média nacional para este tipo de leucemia é de 70 anos de idade. Geralmente os sintomas se apresentam quando a doença já está em quadro avançado e no hemograma pode-se detectar quadro de linfocitose (acima de 10,000 linfócitos/mm³), leucopenia e eritropenia (INCA, 2018; ACS, 2018)

Aproximadamente 15% dos novos casos de leucemia são LMC, e ocorre comumente em adultos a partir dos 50 anos de idade, sendo a média nacional de 64 anos. O diagnóstico inicial para a LMC é feito a partir do hemograma, encontrando frequentemente leucocitose e trombocitose e a confirmação depende da presença do cromossomo Philadelphia (translocação 9;22) no sangue periférico ou na medula óssea. (INCA, 2018; ABHH, 2012)

Além das características morfológicas das células neoplásicas, a classificação e subclassificação das leucemias são feitas a partir de estudos citoquímicos, citogenéticos e imunofenotípicos, contribuindo para melhor diagnóstico e tratamento mais específicos, além de determinar o prognóstico (PUI, ONCIU, 2006).

1.2. Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

A LLA é a mais comum em crianças de 0 a 14 anos, com um pico de incidência entre 2 e 3 anos de idade. Essa leucemia afeta anualmente aproximadamente 1 a cada 25.000 crianças e 1 a cada 100.000 adultos. Além da incidência diferente em adultos e crianças, o prognóstico também é bem distinto, dependendo da faixa etária. Por exemplo, a taxa de sobrevida livre de eventos é de

80% em crianças e de 20-35% em pacientes entre 18 a 60 anos, no Brasil (ABBASI, 2013; INCA, 2016).

A característica principal da LLA é a presença em excesso de blastos linfoides na medula óssea (MO), devido à rápida proliferação clonal e acúmulo de células neoplásicas substituindo os linfócitos normais na circulação sanguínea (SILVA, 2009). O diagnóstico inicial é feito a partir do exame citológico do sangue periférico e da medula óssea, e é confirmado pela presença de 25% ou mais de linfoblastos no mielograma. Em seguida, é necessário realizar exames citoquímicos e morfológicos (*PAS*, *Sudam Black* e Fosfatase Ácida) e imunofenotipagem das amostras. Além disso, a Organização Mundial da Saúde recomenda a investigação de outras anormalidades cromossômicas, por citogenética convencional, como *Fluorescence in situ hybridization* (FISH). (ZERBINI, 2008; INCA, 2001).

De forma a tornar o acompanhamento, prognóstico e tratamento de paciente com LLA mais adequado, os pacientes são divididos em grupos de risco segundo alguns critérios clínicos e laboratoriais. Segundo as condutas do Instituto Nacional do Câncer e do Ministério da Saúde, para LLA infantil os pacientes são estratificados em grupo de risco básico, médio e alto, de acordo com a quantidade de células leucêmicas no sangue periférico após tratamento com Prednisona e Metotrexato, idade, infiltrado testicular ou de sistema nervoso central e presença de translocação $t(9;22)$ *BCR-ABL1* e $t(4;11)$ *MLL-AFF4* (INCA, 2001). Nesse grupo de pacientes, a estratificação é um critério importante na conduta clínica e terapêutica, para que o tratamento seja eficaz.

O documento de conduta do INCA/MS indica para o profissional quais protocolos seguir para cada um dos grupos de risco (FIGURA 1), sendo que cada um desses protocolos inclui uma lista com cada medicamento, a dosagem e o tempo de utilização. O protocolo I inclui 5 medicamentos em um período de 60 dias, aproximadamente, o protocolo M 4 medicamentos em 50 dias e o protocolo II 8 medicamentos em 40 dias. Para os protocolos HR1, HR2 e HR3, são 6 dias para cada um, utilizando 6, 7 e 5 tipos diferentes de medicamentos, respectivamente. Os grupos de risco básico e médio devem receber em torno de 17 medicamentos ao longo do tratamento, de acordo com este documento, enquanto que os pacientes de

alto risco devem receber 31 fármacos até o final do período de manutenção, sendo importante ressaltar que a condução depende da resposta clínica e laboratorial do paciente. .

FIGURA 2 – PROTOCOLO PARA TRATAMENTO DE LLA COM OS DIFERENTES GRUPOS DE RISCO

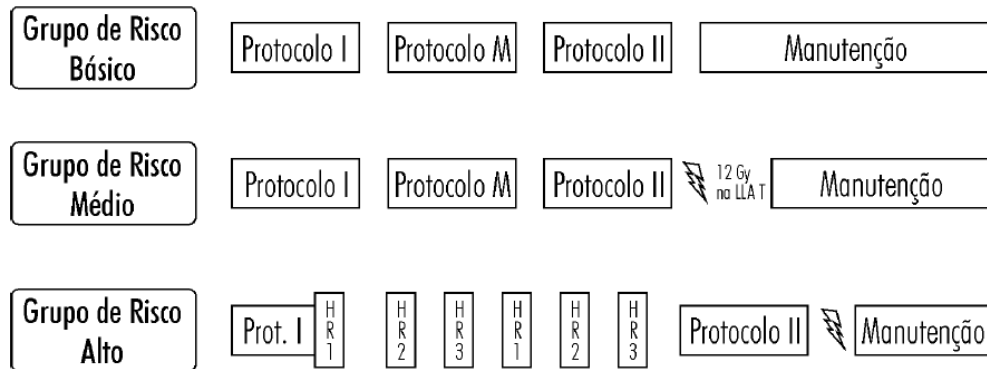


Figura 2: A partir da classificação do paciente em um dos três grupos de risco se inicia o tratamento. Cada um dos protocolos da imagem apresenta uma lista de medicamentos, com as respectivas doses e o tempo de utilização de cada um. FONTE: Condutas do INCA/MS (2001).

Seguindo o mesmo documento de conduta do INCA/MS, os adultos com LLA são divididos em grupos de bom e mau prognóstico, sendo que o último apresenta 7 fatores de risco, incluindo idade igual ou maior de 60 anos e presença translocação $t(9;22)$ *BCR-ABL1*. Esses fatores são analisados em conjunto e estão diretamente relacionados à taxa de sobrevida em 3 anos dos pacientes, sendo de 91% para ausência de todos e de 0% para presença de 4.

Além de mutações aleatórias causadas por falhas de mecanismos intrínsecos das células, existem diversos fatores externos que aumentam a chance de formação de alterações genéticas, como exposição à radiação ionizante durante o período neonatal, exposição a determinadas drogas e pesticidas, deficiência de ácido fólico e tabagismo (PINKEL, 2006). Entre as alterações genéticas, as aneuploidias e translocações estão entre as mais frequentemente encontradas em pacientes com LLA (PUI, 2002).

Na LLA infantil, as translocações mais comuns são *ETV6-RUNX1* [t(12;21)], que corresponde a cerca de 25% dos casos, *MLL-AFF4* [t(4;11)] correspondendo a 9%, *TCF3-PBX1* [t(1;19)], correspondendo a 5%, e *BCR-ABL1* [t(9;22)] a aproximadamente 3% dos casos (BHOJWANI, 2015).

Essas alterações genéticas são consideradas fatores prognósticos importantes e auxiliam na determinação de tratamento mais específico e eficiente para o paciente. A presença da translocação *MLL-AFF4* [t(4;11)] classifica os pacientes como sendo de alto risco, sendo o prognóstico variável de acordo com a idade, mas 80% das crianças abaixo de 1 que apresentam essa translocação têm uma taxa de sobrevida de aproximadamente 50%. Pacientes positivos para a translocação *BCR-ABL1* [t(9;22)] apresentam baixa taxa de sobrevida e são classificados como de alto risco. Adicionalmente, a presença desta translocação indica o tratamento complementar com Mesilato de Imatinibe, um inibidor tirosina-quinase específico para a proteína quimérica gerada nessa translocação, permitindo um melhor controle da progressão do quadro. A presença da translocação *TCF3-PBX1* [t(1;19)] faz com que os pacientes sejam classificados como sendo de risco intermediário e bom prognóstico. A translocação *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] está correlacionada a uma taxa de sobrevida de aproximadamente 93%, que faz com que os pacientes com essa translocação sejam classificados em baixo risco, permitindo que o tratamento seja menos intenso. (BHOJWANI, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Além dessas, existem outras anormalidades cromossômicas menos frequentes que são utilizadas para determinação do prognóstico e estratificação, como a síndrome de Down (+21), trissomia do cromossomo 8 (+8), que são considerados como risco intermediário; síndrome de Bloom (defeito no sistema de reparo do DNA) e síndrome Li-Fraumeni (mutação hereditária no gene *TP53*) considerados de alto risco, (BASSAN, 2011; BHOJWANI, 2011).

1.3. Translocações cromossômicas

Alterações genéticas primárias são encontradas em mais de 75% dos pacientes com LLA, podendo ser aneuploidia, deleção de fragmentos do DNA, mutação da sequência de DNA e rearranjo cromossomal, que pode resultar na desregulação da expressão gênica ou formação de proteínas quiméricas (HARRISON, 2009).

As translocações cromossômicas são possivelmente o evento inicial do desenvolvimento da leucemia e é possível detectá-las em algumas amostras sanguíneas de recém-nascidos antes mesmo da manifestação dos sintomas (HUNGER, 2015).

1.3.1. Translocação t(9;22)

Aproximadamente 5% das crianças e 25%-40% dos adultos diagnosticados com LLA apresentam a translocação t(9;22), que resulta na formação do cromossomo Philadelphia (Ph). Este codifica a proteína quimérica *BCR-ABL1*, uma proteína tirosina quinase ativada constantemente, levando à multiplicação celular de forma desregulada (PUI, 2006).

Essa translocação é encontrada também em pacientes diagnosticados com leucemia mieloide crônica (LMC), porém estes apresentam um melhor prognóstico do que pacientes com LLA (RAFIEI, 2015).

O ponto de quebra no gene ABL (cromossomo 9) ocorre numa região entre o íntron 1b e o éxon 2, indicado na imagem como éxon a2. No gene BCR (cromossomo 22) pode ter dois pontos de quebra: *minor breakpoint cluster region* (m-BCR) ou *major breakpoint cluster region* (M-BCR). O m-BCR está entre dois éxons alternativos e o éxon 2, e o M-BCR está entre o íntron 13 e 14. Devido ao ponto de quebra m-BCR somente o éxon 1 (indicado na imagem também como e1) se une ao éxon a2 do ABL, formando a junção e1-a2, que produz uma proteína de

190 kDA, conhecida como p190. E o M-BCR pode levar a transcritos diferentes dependendo se a quebra ocorrer no íntron 13 ou 14, podendo ocorrer a fusão b2-a2 ou b3-a2, ambos produzindo uma proteína de 210 kDA, chamada de p210 (FIGURA 3) (DONGEN, 1999).

FIGURA 3 – TRANSCRITOS *BCR-ABL1* p190 e p210

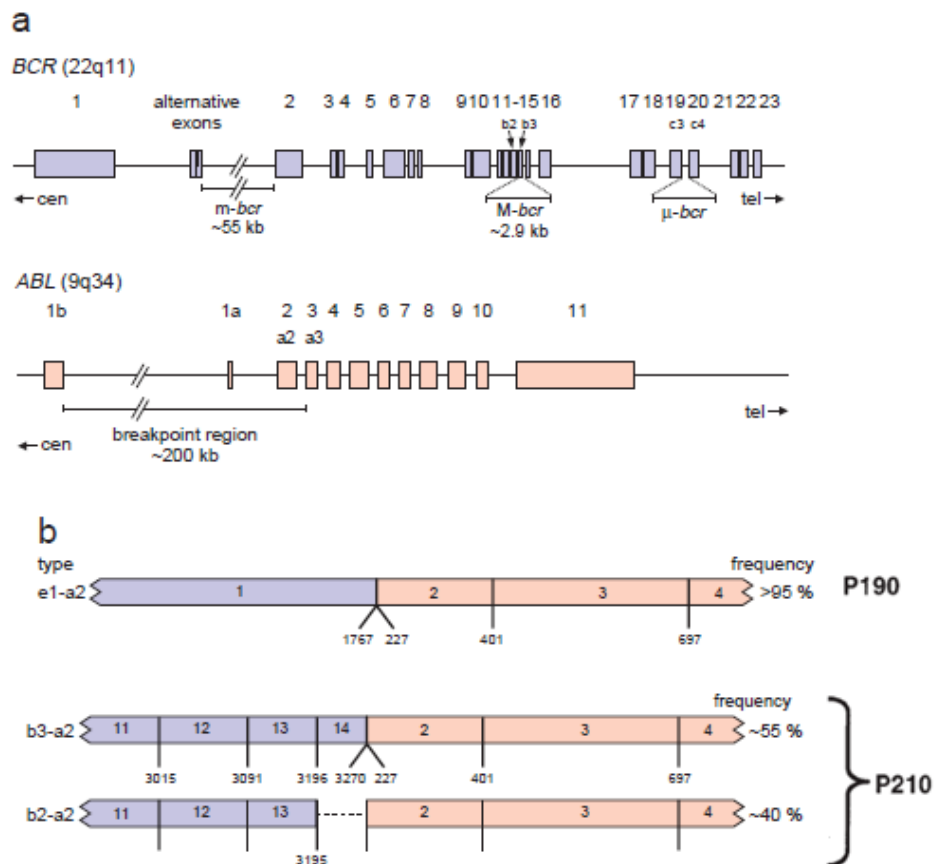


Figura 3: a) Imagem esquemática dos íntrons e éxons dos genes *BCR* e *ABL*. O ponto de quebra do *ABL* fica entre o íntron 1b e o éxon a2. O *BCR* apresenta dois pontos de quebras, o m-*BCR* e o M-*BCR*; b) O *ABL* quando se une ao m-*BCR* (e1-a2) forma o transcrito *BCR-ABL1* p190 e quando se funde com o M-*BCR* (b2-a2 ou b3-a2) forma o *BCR-ABL1* p210. Fonte: adaptação Dongen, 1999.

1.3.2. Translocação t(12;21)

A translocação t(12;21) é a mais comum em crianças diagnosticadas com ALL (aproximadamente 25%) e está presente em apenas em 3% dos adultos, representando um bom prognóstico. Essa translocação leva à formação de um oncogene quimérico conhecido como *ETV6-RUNX1* ou TEL-AML1 (GREAVES, 2003).

O ponto de quebra no gene *ETV6* (cromossomo 12) é entre os éxons 5 e 6; e no gene *RUNX1* (cromossomo 21) a quebra ocorre principalmente no íntron 1, mas pode ocorrer também no íntron 2. Em 90% dos pacientes positivos para essa translocação é identificada a fusão do éxon 5 do *ETV6* com o éxon 2 do *RUNX1* (FIGURA 4) (JIN, 2016).

FIGURA 4 – TRANSCRITO *ETV6-RUNX1*

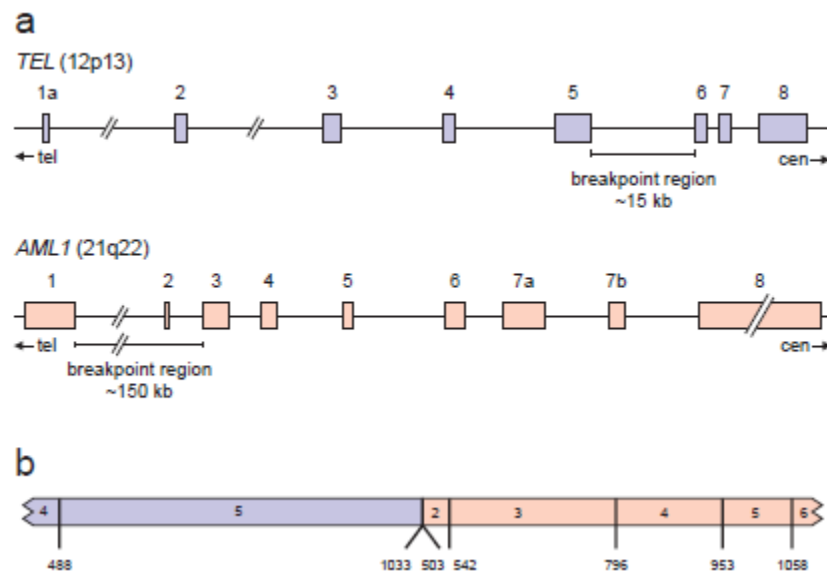


Figura 4: a) Imagem esquemática dos íntrons e éxons dos genes *ETV6* e *RUNX1*. O *breakpoint region* ou ponto de quebra no gene *ETV6* é entre os éxons 5 e 6, e no *RUNX1* o ponto de quebra mais comum é no íntron 1, mas pode ocorrer também no íntron 2. b) Principal fusão destes genes, formando o transcritos *ETV6-RUNX1*. Fonte: Dongen, 1999.

1.3.3. Translocação t(1;19)

A translocação t(1;19), denominada *TCF3-PBX1* ou *E2A-PBX1*, é encontrada em aproximadamente 5%-6% das crianças e 3% dos adultos diagnosticados com ALL. É considerado como um pior prognóstico, por causar a hiperexpressão de genes envolvidos com o ciclo celular e está comumente relacionado com outros quadros clínicos de alto risco, como alta contagem celular (GB alto ao diagnóstico) e envolvimento do sistema nervoso central (PAULSSON, 2009; DONGEN, 1999).

O ponto de quebra no gene E2A (cromossomo 19) ocorre entre os éxons 13 e 14; e no gene PBX1 (cromossomo 1) entre os éxons 1 e 2, sendo que o mais comum é a fusão do éxon 13 do E2A e o éxon 2 do PBX1 (FIGURA 5) (DONGEN, 1999).

FIGURA 5 – TRANSCRITO E2A-PBX1

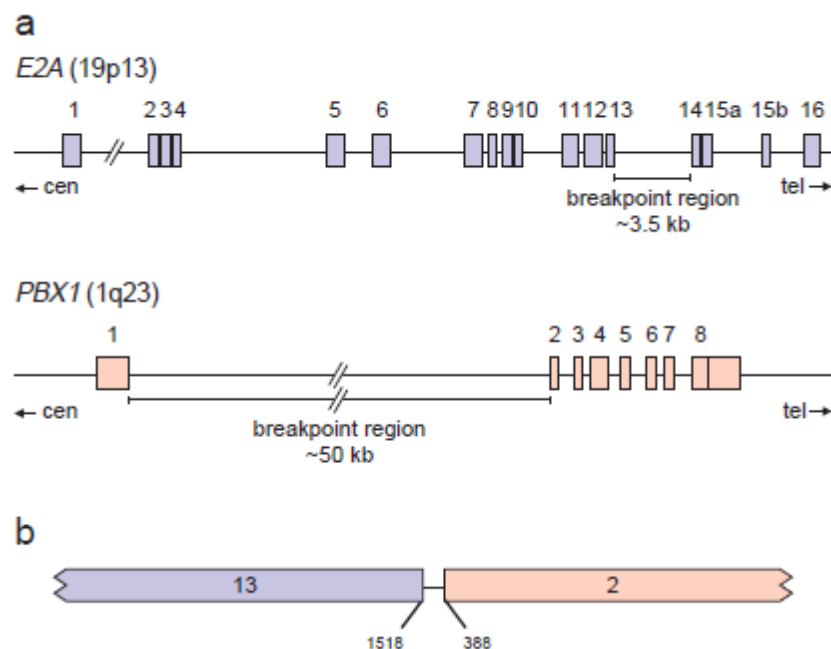


Figura 5: a) Imagem esquemática dos íntrons e éxons dos genes E2A e PBX1. O local determinado como "breakpoint region" é o ponto de quebra em cada um dos genes, sendo que no E2A é entre os éxons 13 e 14, e no PBX1 é entre os éxons 1 e 2. b) Fusão mais comum dos genes, formando o transcritos E2A-PBX1. Fonte: Dongen, 1999.

1.4. JUSTIFICATIVA

Atualmente no Brasil, o diagnóstico para leucemias é realizado, principalmente pelo quadro clínico, hemograma e observação da morfologia celular, mas raramente são realizados testes genéticos e moleculares para detecção das translocações cromossômicas, que além de confirmar o diagnóstico, são importantes marcadores prognósticos, permitindo uma adaptação terapêutica específica para o paciente. Portanto, o desenvolvimento de um teste molecular preciso, com alta sensibilidade, baixo custo e de resultado rápido para as principais translocações de impacto clínico em LLA é essencial para evolução no diagnóstico, tratamento e acompanhamento. Este auxilia na estratificação de risco dos pacientes, e também para exames de doença residual mínima.

A proposta do projeto é desenvolver um kit diagnóstico, através da PCR em tempo real (qRT-PCR), das 3 translocações cromossômicas entre as mais frequentes da LLA: *BCR-ABL1* [t(9;22)]; *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] e *TCF3-PBX1* [t(1;19)]. Esta técnica é mais sensível, rápida, economicamente viável, além de ser de fácil acesso, já que está presente na grande maioria dos hospitais, laboratórios centrais de saúde (LACEN), centros de pesquisa e laboratórios privados.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo Geral

Desenvolver um teste por qRT-PCR *multiplex* para detecção de translocações de interesse clínico em LLA, sendo estas: *BCR-ABL1* [t(9;22)], *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] e *TCF3-PBX1* [t(1;19)].

1.5.2. Objetivos Específicos

- Comparar as reações no sistema *singleplex* e *multiplex*;
- Comparar reagentes de diferentes marcas;
- Determinar a sensibilidade do ensaio;
- Traçar linhas de cortes para a detecção dos genes endógenos para validação do ensaio;
- Validar o ensaio em amostras clínicas e em indivíduos sem histórico de câncer.

2. METODOLOGIA

O desenho experimental utiliza uma sequência pequena de nucleotídeos iniciadores da síntese de DNA, chamado de *primers*. Estes *primers* são específicos para cada translocação contemplada, além de sondas de hidrólise específicas conjugadas com fluoróforos. Para essa reação ser rápida, prática e economicamente viável foi delineado e padronizado reações *multiplex*, ou seja, a presença de mais de um par de *primer* e sondas marcadas com fluoróforos distintos, incluindo a presença de *primers* e sonda para o controle positivo endógeno RNA Polimerase II, o que indicará a presença de material genético e qualidade dos reagentes.

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. *Primers* e Sondas

Foram desenhados de acordo com as sequencias disponíveis em banco de dados Pubmed de acordo com os números de acesso na tabela abaixo:

Translocação	Gene	Número de acesso
<i>BCR-ABL1</i> [t(9;22)]	BCR	X02596
	ABL	X16416
<i>ETV6-RUNX1</i> [t(12;21)]	ETV6	U11732
	RUNX1	D43969
<i>TCF3-PBX1</i> [t(1;19)].	TCF3	M31222
	PBX1	M86546

A síntese dos *primers* foi realizada em 40nM e purificados com cartucho, enquanto as sondas em escala de 200nM e purificadas por HPLC no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Devido ao escopo e a não finalização do

projeto as sequencias dos oligonucleotídeos utilizados não serão disponibilizadas.

2.1.2. *Template* de síntese de cDNA

Para padronização das reações, foi obtido cDNA de amostras positivas para *BCR-ABL1* p190 e p210, e *TCF3-PBX1*. Para a translocação *ETV6-RUNX1* foi realizada a cultura da linhagem ReH em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e o RNA extraído com kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®). Este RNA foi quantificado em NanoDrop 2000 (ThermoFischer®) e 1µg foi utilizado para síntese de cDNA, seguindo o protocolo abaixo:

Reagente	Volume (uL)
dNTP 10mM	2
Random <i>primers</i> 500ng/uL	0,5
OligodT 5uM	0,5
MgCl ₂ 25mM	1
Água	3

Incubar a 65°C por 5 minutos e adicionar o mix 2 abaixo.

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

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, incubar a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos.

2.1.3. Confirmação, clonagem dos amplicons e geração de controles positivos

Com os cDNAs descritos acima, uma PCR convencional foi realizada com os mesmos *primers* da qRT-PCR para confirmação da presença e tamanho do *amplicon*. Quando da confirmação, esse *amplicon* foi clonado em vetor pGem T-easy (Promega®) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. De forma resumida, a ligação foi realizada de um dia para o outro a 4°C e a transformação por choque térmico em bactéria termocompetente DH5α. A seleção inicial de colônias foi realizada em placa LB/IPTG-XGAL e, devido ao sistema Operon-Lac, colônias brancas foram transferidas para a placa-mãe. Estas colônias foram submetidas a PCR convencional com os mesmos *primers* para confirmação da presença do inserto, sendo que uma colônia positiva foi cultivada em meio LB líquido e o DNA plasmidial extraído por kit comercial seguindo protocolo indicado (Macherey-Nagel®). Esse plasmídeo extraído foi submetido à digestão enzimática para confirmação da presença do inserto. Essa parte do trabalho foi de extrema importância para prover *template* para a curva de sensibilidade e para garantir um suprimento ilimitado de controles positivos para o desenvolvimento e produção dos kits.

2.1.4 Desenho da qRT-PCR

Conforme indicado anteriormente, o objetivo principal é o desenvolvimento de uma qRT-PCR *multiplex* com sondas conjugadas com fluoróforos FAM, Hex e Cy5, de acordo com a tabela a seguir (TABELA 1):

<i>Multiplex</i>	Transcrito	Fluoróforos
<i>BCR-ABL1</i> + RNA Pol II	<i>BCR-ABL1</i> p190	FAM
	<i>BCR-ABL1</i> p210	Hex
	RNA Pol II	Cy5
<i>ETV6-RUNX1</i> + <i>TCF3-PBX1</i> + RNA Pol II	<i>ETV6-RUNX1</i>	Hex
	<i>TCF3-PBX1</i>	FAM
	RNA Pol II	Cy5

Tabela 1: Para realizar a reação em sistema *multiplex* cada gene precisa de um fluoróforo específico para que haja diferenciação pelo programa. Serão feitas duas reações: *BCR-ABL1* p190 e *BCR-ABL1* p210; e *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1*, ambos utilizando a RNA polimerase II como controle positivo. Os fluoróforos utilizados foram FAM, Hex e Cy5 conjugados com as sondas específicas de cada transcrito.

A inclusão de *primers* e sonda para RNA Polimerase II é essencial como controle endógeno positivo, indicando a presença de material genético e a qualidade dos insumos da reação. Além disso, a amplificação deste alvo é essencial para a determinação de linhas de corte do kit, indicando um valor mínimo de ciclo *threshold* para a validação do ensaio.

Neste projeto serão utilizados master mix para qRT-PCR provenientes do IBMP, *Qiagen*, *IDT* e *Applied* e as reações foram realizadas em plataforma *LightCycler 96* (Roche). Inicialmente foram testadas reações de forma *singleplex*, contendo somente um par de *primer*, uma sonda e um *template* positivo, com *primers* e sondas nas concentrações de 250nM e de 125nM para as translocações de interesse e de 125nM e 62,5nM para a RNA Polimerase II, respectivamente.

A partir do momento que as reações individuais foram padronizadas houve otimização para *multiplex*, com curva de diluição de *templates*, com o intuito de buscar o limite de detecção das reações e verificar o melhor insumo de mastermix. Como último passo, para buscar um cenário mais complexo e real, foram utilizadas amostras clínicas de pacientes com leucemia e de indivíduos saudáveis como validação piloto.

2.1.5. Comparação *singleplex* vs *multiplex*

Para padronizar uma reação de qRT-PCR *multiplex*, foi essencial a comparação do desempenho neste modelo em comparação a *singleplex*, com a presença de somente um par de *primer* e uma sonda. Para isso, foram utilizados os *templates* previamente descritos, comparando ambos os sistemas e também insumos da *Qiagen*, *Applied*, IDT e IBMP.

2.1.6. Critérios de avaliação

Para a avaliação da comparação *singleplex* e *multiplex*, além do melhor master mix a ser utilizado foram avaliados alguns critérios: 1. Ciclo *threshold*; 2. Intervalo entre diferentes concentrações de *templates*; 3. Amplitude de sinal; 4. *Slope* das curvas de amplificação.

2.1.7. Cálculo eficiência e sensibilidade da reação

A eficiência das reações foi realizada por quantificação absoluta dos transcritos. Para isso, os cDNAs previamente descritos foram submetidos a PCR convencional com os *primers* específicos, subsequente eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. Os *amplicons* para cada translocação foram recortados e purificados do gel com kit comercial (QIAquick Gel extraction kit - Qiagen®) e quantificados por espectrofotometria a 260nm por NanoDrop®.

A quantidade absoluta de *amplicon* purificado foi convertida para número de cópias de *amplicons* de acordo com o seu tamanho. Cada *amplicon* foi diluído para uma concentração de 10^7 cópias/ μ L e diluído seriadamente até 10^1 cópias/ μ L, sendo

esta curva utilizada para calcular a eficiência e iniciar a determinação sensibilidade de cada reação.

Para cálculo da eficiência da reação foi utilizada a fórmula:

$$Eficiência = 10^{(-\frac{1}{slope})} - 1$$

Sendo que o *slope* a inclinação da curva, indicado pelo valor de *a*, na fórmula da reta ($y = ax + b$), que estarão identificadas nos gráficos.

É necessário também calcular o Limite de detecção (LoD) para o teste. O LoD que é menor quantidade de analito a ser detectado em 95% das amostras, mas não necessariamente quantificado com um valor exato (FOOROTAN, 2017). Para realizar este cálculo é necessário utilizar o último valor positivo obtido no teste de eficiência anterior e 3 diluições intermediárias até o ponto de diluição 10 vezes menor, com 12 replicatas de cada uma das diluições. Para maior exatidão, este valor foi determinado a partir do modelo probit, utilizando R para ajustar o modelo e interpolar os dados.

2.1.8. Critérios Éticos

As amostras clínicas de pacientes com LLA e de doadores saudáveis utilizadas neste projeto foram submetidas e aprovadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa.

As amostras saudáveis obtidas em colaboração com o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná, Hemepar de Curitiba e o Instituto de Medicina Tropical (IMT) estão aprovado a partir do CAAE número 2.833.516. E as amostras clínicas de LLA obtidas do Hospital do Câncer de Londrina estão aprovadas a partir do CAAE número 171123113.4.9999.5231.

2.1.9. Determinação de linha de corte do endógeno RNA Polimerase II

Para estabelecimento de linha de corte do ciclo *threshold* do gene endógeno RNA Polimerase II nos sistemas *multiplex*, foi utilizado sangue total fresco de pacientes saudáveis obtidas em colaboração com o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná, Hemepar de Curitiba, e amostras de sangue congelado a -80°C obtidos em parceria com o Instituto de Medicina Tropical (IMT).

O RNA foi extraído com TRIzol LS, de acordo com o protocolo utilizando clorofórmio, isopropanol e etanol 75%. Em seguida essas amostras foram processadas a cDNA de acordo com o protocolo previamente descrito. A qRT-PCR dessas amostras indica um intervalo de ciclo *threshold* que este gene deve ser detectado, com objetivo de validação da amostra e reação.

Além da determinação da linha de corte da RNA polimerase II foi possível também avaliar se há variação com base no protocolo de armazenagem (sangue fresco e sangue congelado).

A síntese de cDNA só foi realizada em amostras com uma concentração mínima de 200 ng de RNA/ μ L, razão 260/280 entre 1,75 e 2,0 e razão 260/230 entre 0,5 e 2,0, para que fosse utilizadas amostras com menos contaminação por reagentes utilizados na extração. Ao todo foram utilizadas 33 amostras do Hemepar e 31 do IMT para síntese do cDNA.

2.1.9. Avaliação em amostras clínicas

As amostras clínicas foram obtidas do Hospital do Câncer de Londrina, em colaboração com a Dr^a Maria Angélica Watanabe, sendo utilizadas aquelas com diagnóstico clínico confirmado de leucemia. Essas amostras são de sangue total congeladas a -80°C com TRIzol LS e a extração do RNA foi realizada no ICC com o

protocolo de extração com clorofórmio, isopropanol e etanol 75%, em seguida processadas a cDNA e submetidas à qRT-PCR.

Das amostras de LLA obtidas foram processadas a cDNA somente aquelas que o RNA apresentavam a razão 260/230 entre 1,75 e 2,3, totalizando uma quantidade final de 29 amostras.

2.2. Teste cego

Para validar a técnica foi realizado um teste cego em que o manipulador não sabia o conteúdo de cada amostra. As amostras com diferentes diluições e quantidades de cDNA e podem ou não conter algum transcrito em estudo em concentrações diferentes. A avaliação foi feita com base nos CT's, presença ou ausência das translocações e comparação das diluições e CT da RNA polimerase II.

3. RESULTADOS

3.1. Comparação da Reação em *singleplex* e *multiplex*

O desempenho do sistema com três pares de *primers* e três sondas (*multiplex*) em comparação com o sistema de apenas um par de *primers* e uma sonda (*singleplex*) foi similar para todas as translocações em estudo. Não houve mudanças significativas no ciclo *threshold* (CT), na amplitude de fluorescência e no *slope* das curvas de amplificação (GRÁFICOS 1).

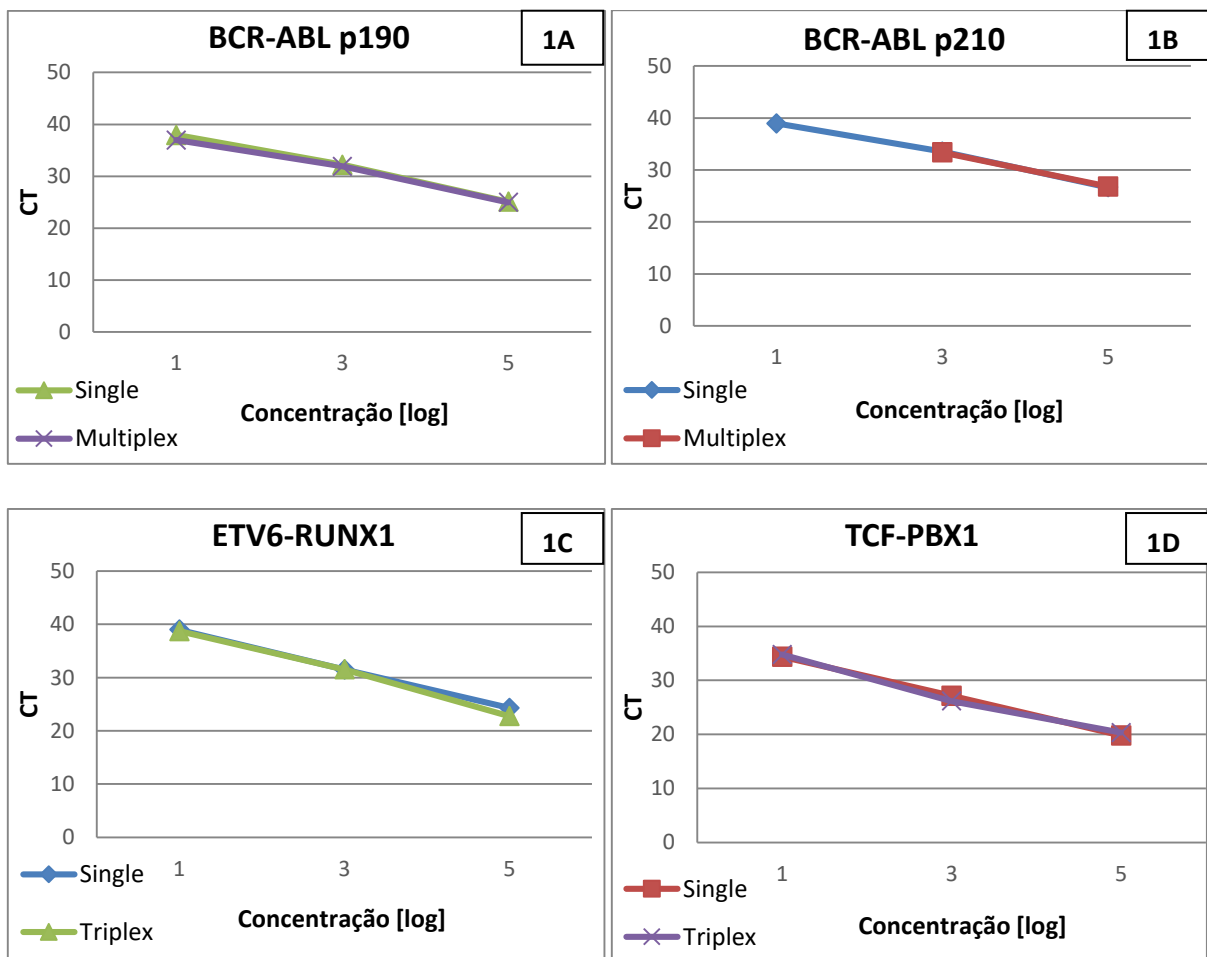


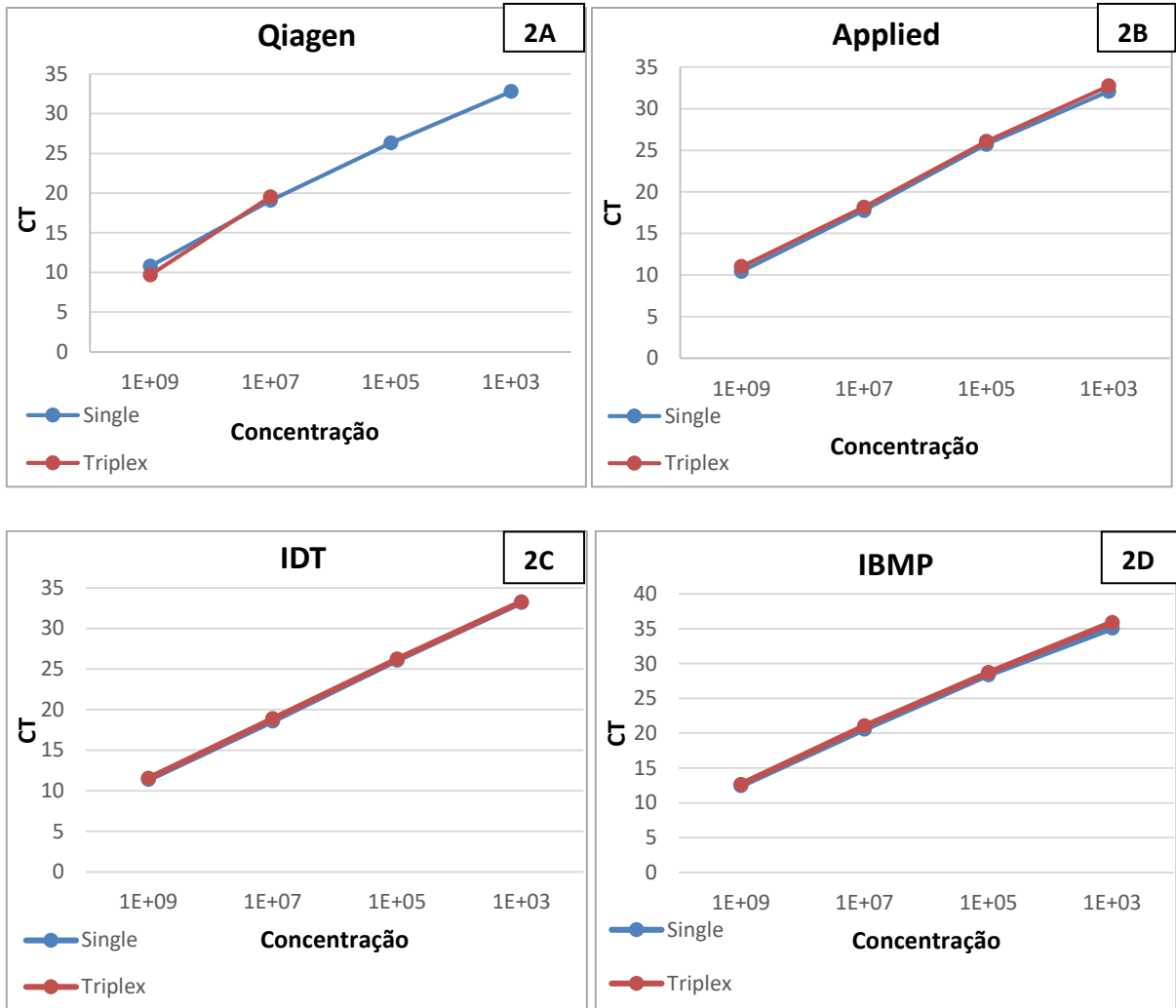
GRÁFICO 1A, 1B, 1C, 1D: Os valores do ciclo *threshold* (CT) se sobrepõem indicando que os sistemas *singleplex* e *multiplex* nas concentrações 10^5 , 10^3 e 10^1 não apresentam alterações significativas. No GRÁFICO 1B a concentração 10^1 apresentou um CT tardio no sistema *singleplex* e um CT negativo no *multiplex*, devido à sensibilidade da reação.

3.2. Comparação de Diferentes Reagentes

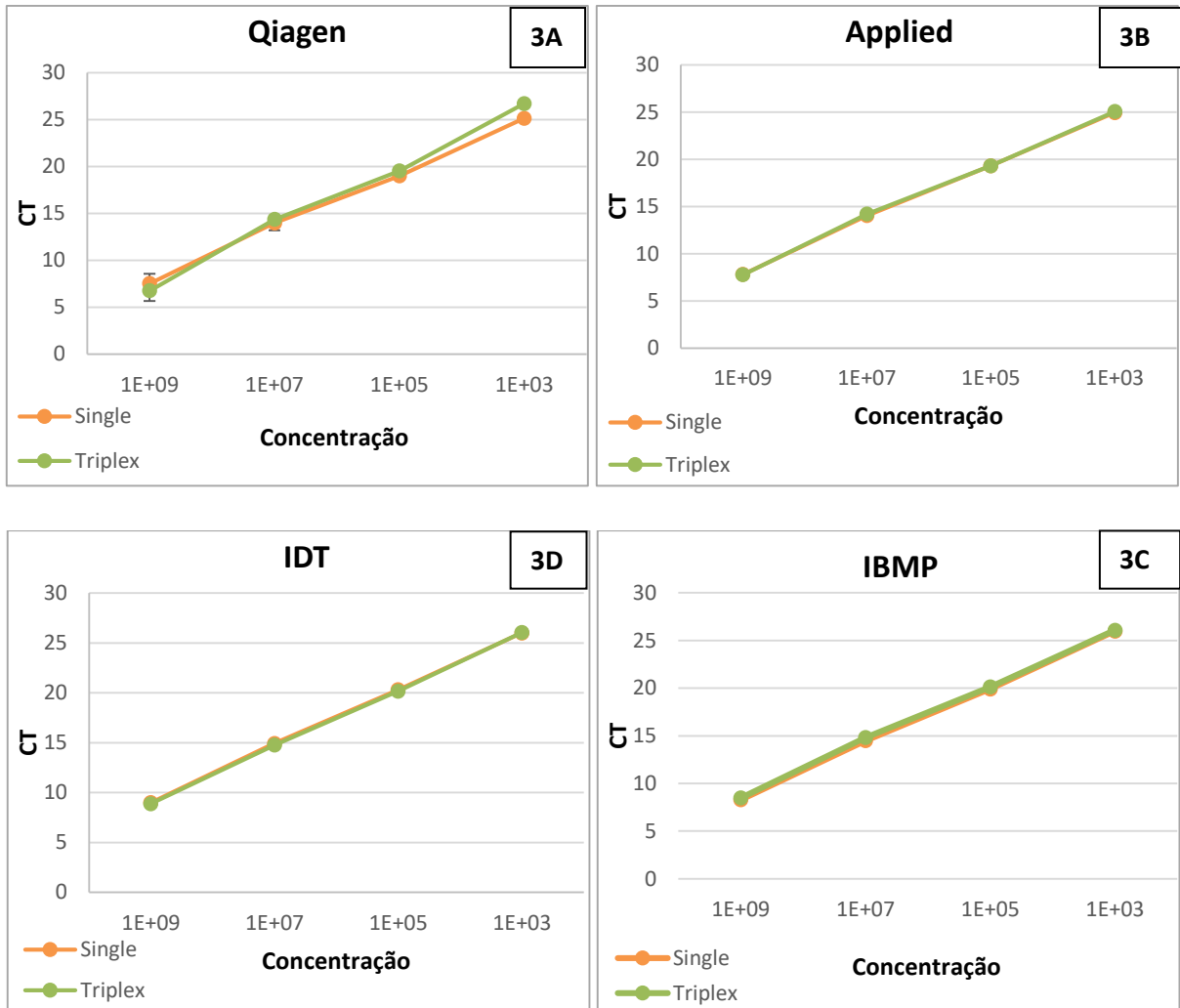
Os mastermix utilizados para comparação foram da *Qiagen*, *Applied*, *IDT* e *IBMP*. Foi feita a comparação dos CT's em sistema *singleplex* e *multiplex*, para a translocações *BCR-ABL1* p190 (GRÁFICOS 2) e p210 (GRÁFICOS 3). Para melhor avaliação foi feita também a comparação do *slope* das curvas em *multiplex* (GRÁFICOS 4).

Comparando os CT's e as concentrações é possível afirmar que o reagente da *Qiagen* é um dos que não se recomenda a utilização para esta técnica, já que em *multiplex* no p190 apresenta uma menor sensibilidade. Comparando os *slopes* determina-se que os melhores reagentes para a técnica em estudo são o da *Applied* e o *IDT* já que têm um crescimento exponencial bem definido e alcançam o platô, além de apresentar uma distância uniforme entre as curvas.

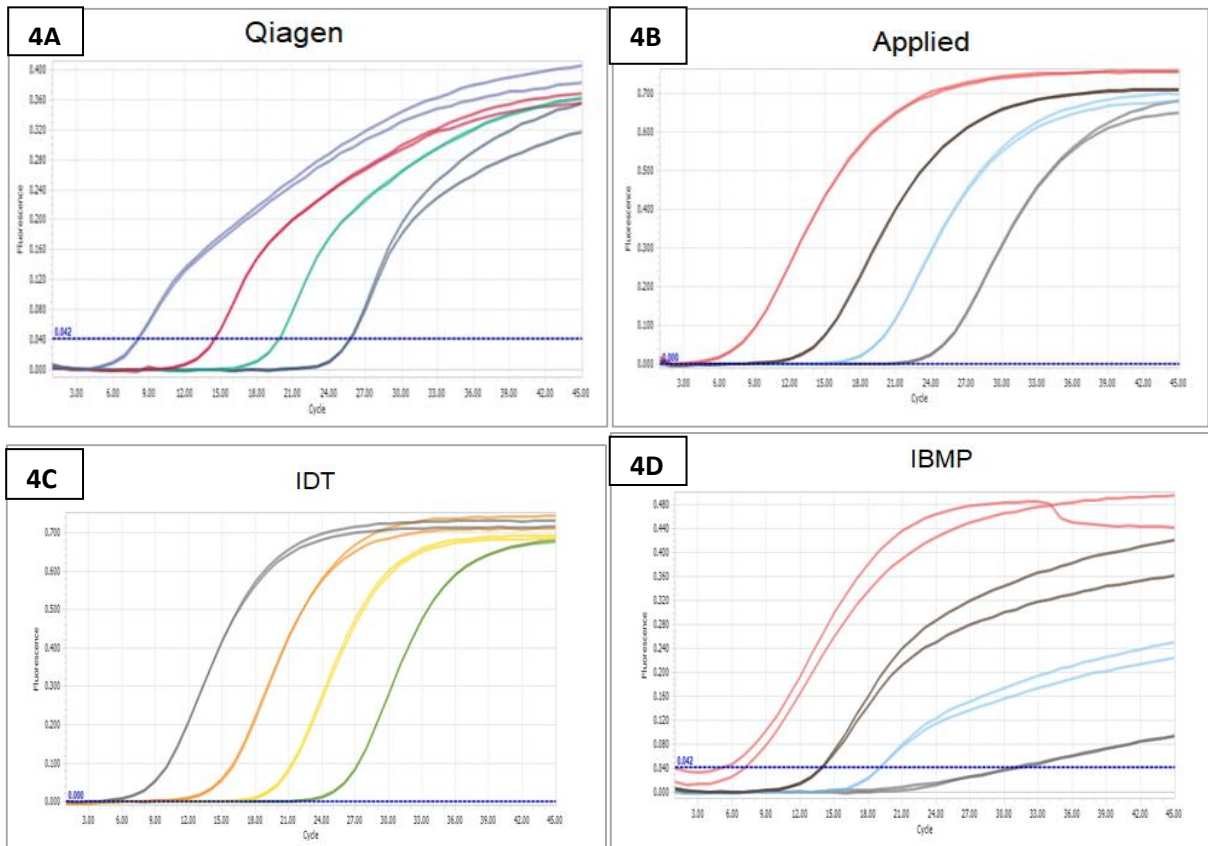
No entanto, por questões de economia financeira e devido ao tempo de compra do reagente, utilizou-se o reagente do *IBMP* para continuar com os experimentos.



GRÁFICOS 2A, 2B, 2C, 2D: Comparação dos diferentes insumos de Mastermix com o transcrito *BCR-ABL1* p190. O único reprovado neste teste foi o reagente da Qiagen, os outros apresentam valores similares, tanto que as retas se sobrepõem. Neste gráfico, o eixo de concentração está em notação científica e se refere à 10^9 , 10^7 , 10^5 e 10^3 .



GRÁFICOS 3A, 3B, 3C, 3D: Comparação das diferentes marcas de Mastermix com o transcrito *BCR-ABL1* p210. As retas de todos os reagentes se sobrepõem por apresentarem valores de CT's similares. Neste gráfico, o eixo de concentração está em notação científica e se refere à 10^9 , 10^7 , 10^5 e 10^3 .



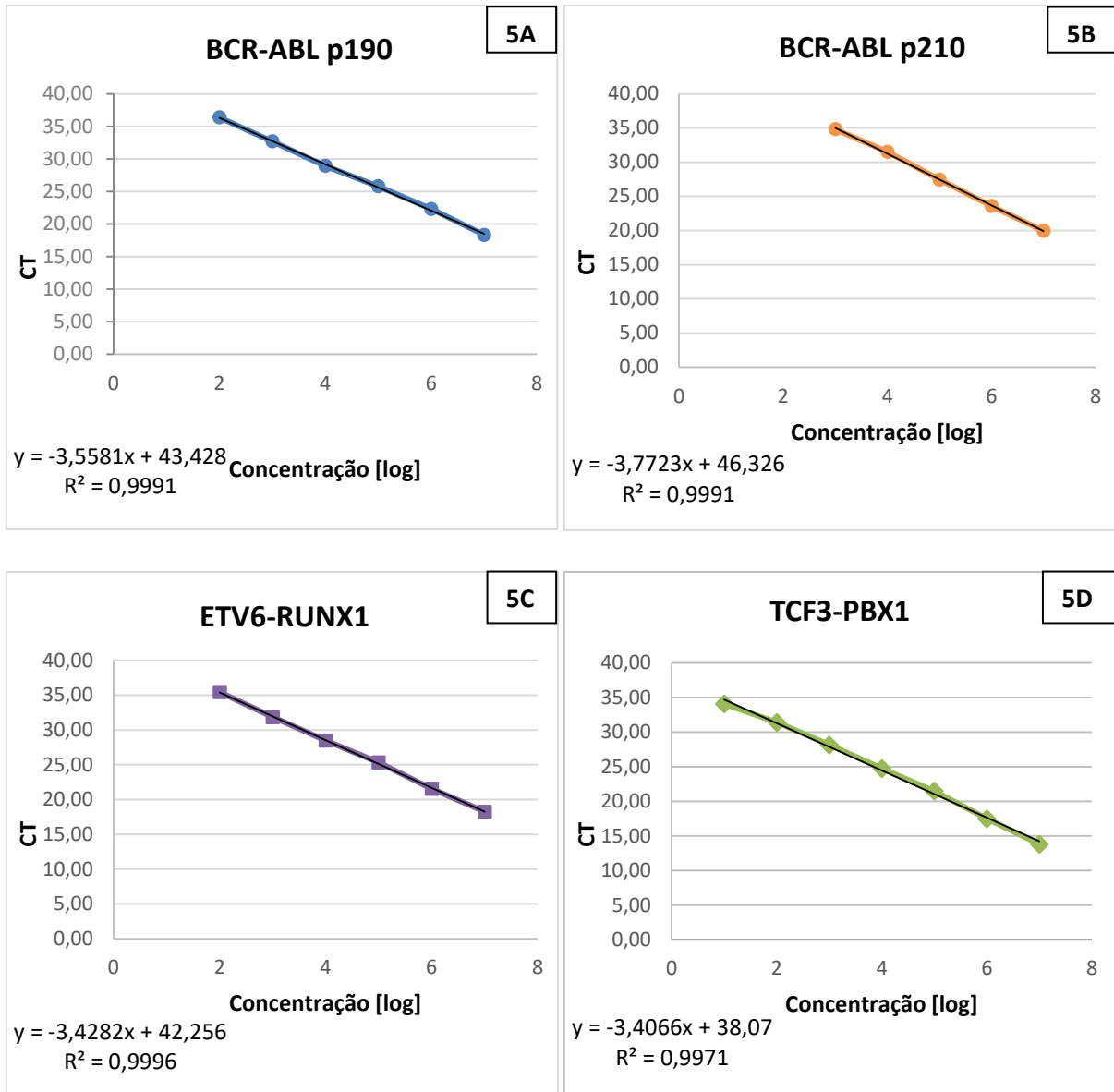
GRÁFICOS 4A, 4B, 4C, 4D: Comparação dos *slopes* das curvas dos diferentes reagentes. O reagente ideal é o da Applied, porque sua curva tem um crescimento exponencial e alcança o platô, tem uma distância constante entre as curvas e as duplicatas se sobrepõem.

3.3. Sensibilidade do ensaio

A curva de sensibilidade do ensaio foi feita utilizando as amostras dos *amplicons* em diluição seriada de 10^7 a 10^1 cópias/ μL .

A curva do transcrito *BCR-ABL1* p190 apresentou um CT positivo até a diluição 10^2 cópias/ μL e, com base na equação da reta indicada no canto superior direito do GRÁFICO, obteve-se que a eficiência da reação foi de 91% (GRÁFICO 5A). O transcrito *BCR-ABL1* p210 apresentou CT positivo até a concentração 10^3 cópias/ μL , com uma eficiência da reação de 86% (GRÁFICO 5B). O transcrito *ETV6-RUNX1* foi detectado até a concentração 10^2 cópias/ μL , com eficiência da reação de

96% (GRÁFICO 5C). Já o TCF3-PBX foi detectado em todas as concentrações apresentadas, com 97% de eficiência (GRÁFICO 5D).



GRÁFICOS 5A, 5B, 5C, 5D: Curva de sensibilidade das reações, utilizando concentrações de 10^7 a 10^3 cópias/ μ L. As eficiências das reações foram de 91%, 86%, 96% e 97% para *BCR-ABL1* p190, *BCR-ABL1* p210, *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1*, respectivamente.

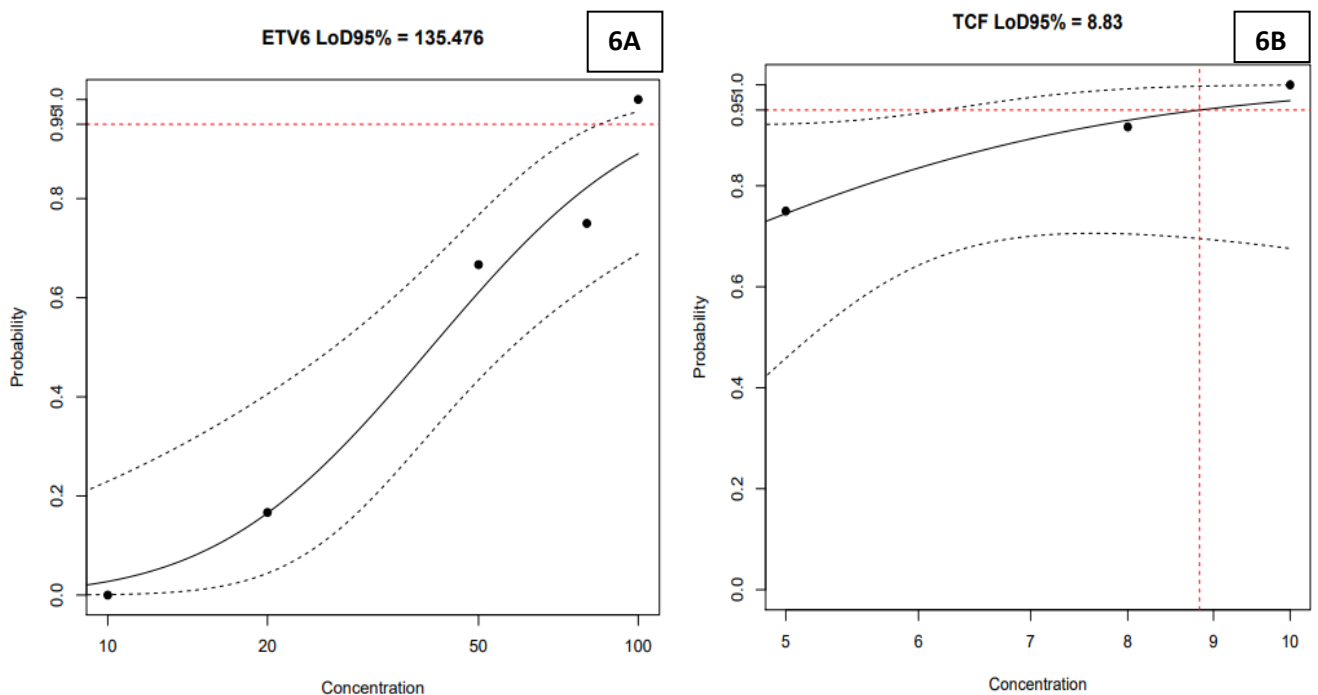
A partir desses resultados foi calculado o LoD (*limit of detection*) de cada um dos transcritos. Para esse cálculo foram utilizadas 5 concentrações mais diluídas a

partir do último valor de concentração obtido na curva de sensibilidade. Utilizou-se 12 pontos de cada uma dessas concentrações.

Para o *BCR-ABL1* p190 foram utilizadas as concentrações 10^2 , 8×10^1 , 5×10^1 , 2×10^1 , 10^1 ; e para o *BCR-ABL1* p210 10^3 , 8×10^2 , 5×10^2 , 2×10^2 , 10^2 . No entanto, nenhum dos dois transcritos alcançou o valor mínimo para cálculo do LOD.

Os transcritos *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1* se encaixaram nas condições pré-determinadas (GRÁFICO 5C e 5D), então foi feita uma nova curva para cálculo do LoD, com as concentrações de 10^2 , 8×10^1 , 5×10^1 , 2×10^1 , 10^1 ; e 10^1 , 8×10^0 , 5×10^0 , 2×10^0 , 10^0 , para *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1*, respectivamente.

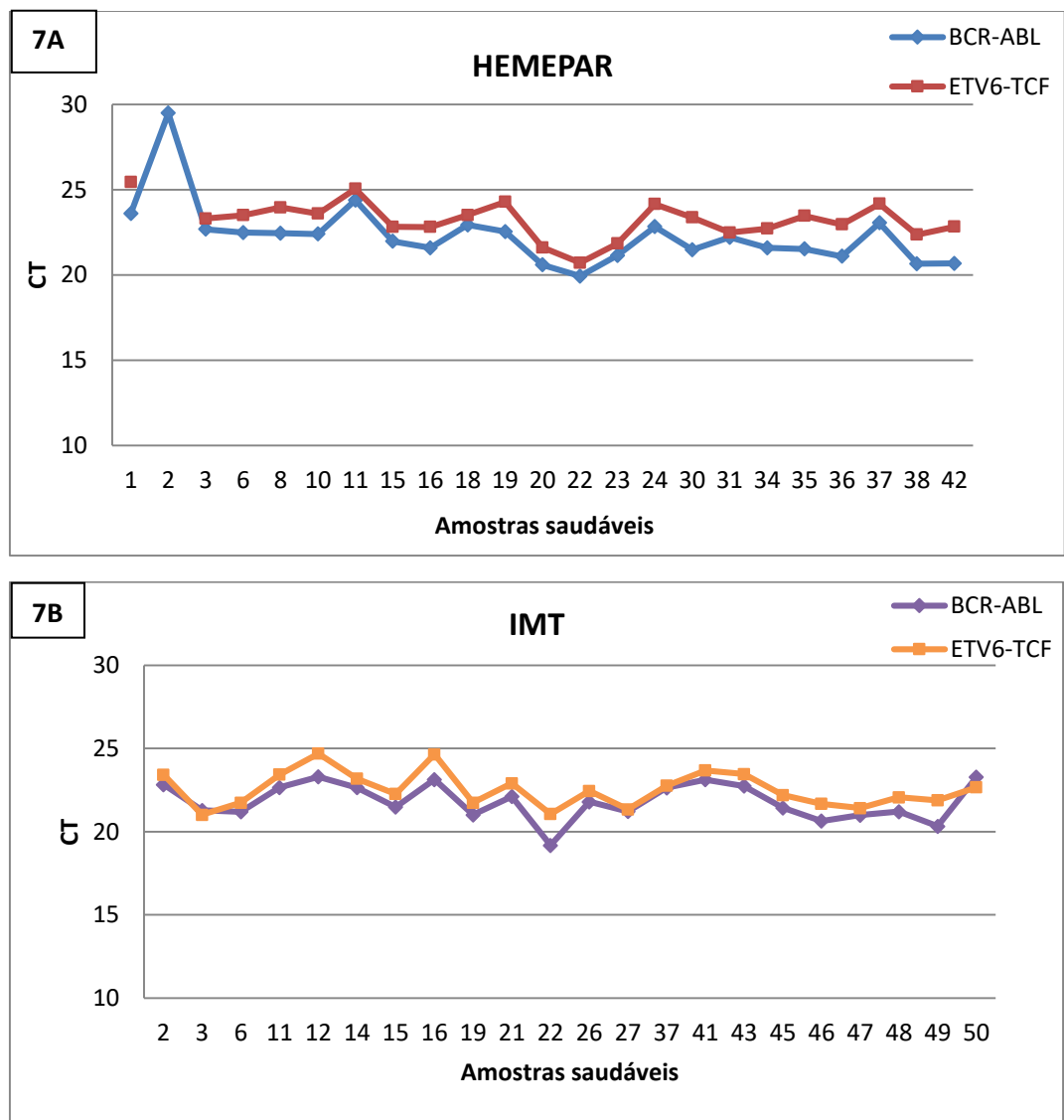
O LoD do *ETV6-RUNX1* é de 135,476 cópias e o LOD do *TCF3-PBX1* é de 8,83 cópias (GRÁFICOS 6A e 6B).



GRÁFICOS 9A e 9B: Com um programa específico, obteve-se a curva e o valor do LoD 95%, obtendo um valor de 135,476 cópias para o *ETV6-RUNX1* e de 8,83 cópias para o *TCF3-PBX1*.

3.4. Determinação de linha de corte do endógeno RNA Polimerase II

A partir do cDNA das amostras saudáveis coletadas no Hemepear e obtidas do IMT foi feito PCR real time em *multiplex* e os resultados tanto no *BCR-ABL* p190 e p210, e *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1* são similares. Determina-se, então, que o intervalo de detecção da RNA polimerase II é de CT entre de 20,0 a 25,0 (GRÁFICO 7A e 7B).



GRÁFICOS 7A e 7B: Amostras saudáveis do IMT (n=23) e do Hemepear (n=23) processadas em sistema *multiplex* determinam que o intervalo de detecção para a RNA polimerase II, controle endógeno da reação, deve estar entre o CT 20 e 25.

3.5. Avaliação em Amostras Clínicas

3.5.1. Amostras de Leucemia Linfoide Aguda

As 29 amostras de LLA têm apenas o diagnóstico clínico, então não há confirmação da translocação apresentada por cada um dos pacientes. Além disso, não se sabe como as amostras foram coletadas e armazenadas, podendo alterar os resultados. O protocolo seguido para o teste foi idêntico aos realizados previamente, então qualquer alteração pode ser devido à manipulação anterior.

O *range* do CT, obtido previamente com amostras saudáveis para a RNA polimerase II, foi entre 20,0 e 25,0, (GRÁFICO 7A E 7B) e para essas amostras clínicas o *range* do CT está entre 22,0 e 30,0 e a média é de 26,41 (GRÁFICO 8).

Dentre as 29 amostras somente a do paciente 12 foi positiva para a translocação *TCF3-PBX1*, com um CT de 25,86. Todas as outras amostras foram negativas para as translocações em estudo.

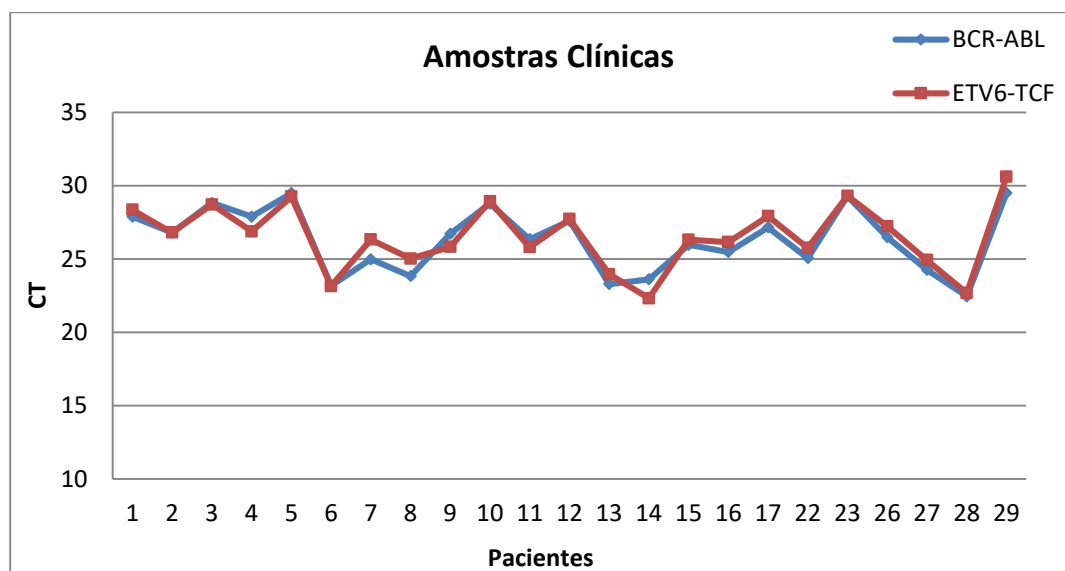


GRÁFICO 8: Amostras de pacientes com Leucemia Linfoide Aguda processadas em sistema *multiplex*(n=29). O endógeno, RNA polimerase II, apresentou um CT entre 22 e 30.

3.5.2. Teste cego

Para avaliação da técnica foi feito um teste cego, em que variava a quantidade de cDNA, a quantidade de água e a presença ou ausência das translocações, de acordo com a tabela a seguir:

Condição	cDNA 1:5	Template	Água
1	5	10 ⁵ TCF3	0
2	6	-	0
3	5	10 ³ TCF3	0
4	5	10 ⁴ p190	0
5	5	10 ⁶ p210	0
6	1	-	5
7	3	-	3
8	2	10 ⁵ TCF3	3
9	5	10 ⁴ ETV6	0
10	5	10 ² TCF3	0
11	6	-	0
12	6	-	0
13	5	10 ² p190	0
14	5	10 ⁵ p190	0
15	6	-	0
16	5	10 ³ p210	0
17	2	10 ³ p210	3
18	4	10 ⁵ ETV6	1
19	5	10 ⁵ ETV6	0
20	6	-	0
21	5	10 ² p210	0
22	5	10 ² ETV6	0
23	6	-	0

Tabela 1: parâmetros do teste cego, com as quantidades em μL de cDNA e água, e concentração do *template* em cópias/ μL .

Considerando que nas condições 2, 6, 7, 11, 12, 15, 20 e 23 não há nenhuma translocação, somente o cDNA, a única detecção deve ser da RNA polimerase II (Tabela 2). Nas condições 1, 3, 8, 10 deve-se detectar a translocação TCF3 (Tabela 3). O ETV6 deve ser detectado nas condições 9, 18, 19, 22 (Tabela

4). Nas condições 4, 13 e 14 deve-se detectar o *BCR-ABL1* p190 (Tabela 5), e o p210 deve ser detectado nas condições 5, 16, 17 e 21 (Tabela 6). Os CT's devem apresentar certa variabilidade devido às diferentes concentrações e diluições, e no caso da RNA polimerase II também à quantidade de cDNA.

Nas tabelas de resultados a seguir estão as médias dos valores de RNA polimerase II para facilitar comparação e análise.

Condição	cDNA 1:5	Água	CT RNA pol	Erro Padrão
2	6	0	24,88	0,7
11	6	0	24,88	0,9
12	6	0	24,81	0,6
15	6	0	24,43	0,3
20	6	0	24,53	0,7
23	6	0	24,85	1,3
6	3	3	26,95	0,4
7	1	5	25,78	0,5

Tabela 2: média dos CT's da RNA polimerase II das condições com apenas cDNA na reação. Para facilitar comparação e análise foi utilizada a média dos CT's da reação *multiplex* ETV6-TCF3 e *BCR-ABL1* p190 e p210.

As condições 6 e 7 apresentavam menores quantidades de cDNA que às outras, fazendo com que o CT de ambas fique mais tardio. As outras condições mostradas apresentaram CT's similares por apresentar parâmetros idênticos.

Condição	cDNA 1:5	Template	Água	CT TCF3	Erro	CT RNA pol	Erro
1	5	10 ⁵ TCF3	0	23,85	0,12	24,82	0,62
8	2	10 ⁵ TCF3	3	23,98	0,61	27,12	0
3	5	10 ³ TCF3	0	30,75	0,64	24,97	0,12
10	5	10 ² TCF3	0	0	0	29,24	0

Tabela 3: valores dos CT's e erros da reação *multiplex* ETV6-TCF3 nas condições em que há presença do *template* do TCF3.

Com relação à RNA polimerase II, as condições 1 e 3 contêm a mesma quantidade de cDNA apresentando CT's similares. A condição 10 deveria apresentar também um CT próximo destas condições, porém o CT tardio indica que esta reação não está adequada. E a condição 8 apresenta uma quantidade menor de cDNA e portanto apresenta um CT mais tardio em comparação.

As condições 1 e 8 têm a mesma quantidade de transcrito TCF3 por isso apresentam CT's similares. A condição 3 apresenta uma quantidade menor do TCF3, por isso fica com um CT mais alto que nas outras condições. Na condição 10 não houve amplificação, provavelmente por algum problema na reação, como ficou indicado pelo CT da RNA polimerase II fora do *range* esperado.

Condição	cDNA 1:5	Template	Água	CT ETV6	Erro	CT RNA pol	Erro
22	5	10 ² ETV6	0	37,05	0	26,52	1,15
9	5	10 ⁴ ETV6	0	31,29	0,37	25,13	0,04
19	5	10 ⁵ ETV6	0	27,62	0,57	25,4	0,2
18	4	10 ⁵ ETV6	1	27,73	0,54	25,53	0,52

Tabela 4: valores dos CT's e erros da reação *multiplex* ETV6-TCF3 nas condições em que há presença do *template* do ETV6.

Para o ETV6, a RNA polimerase II nas condições 9, 19 e 22 devem ser similares por apresentar a mesma quantidade de cDNA. O erro e o CT na condição 22 estão muito altos provavelmente devido a um erro de pipetagem, o que altera a comparação. A condição 18 apresenta menos cDNA que as outras, fazendo com que o seu CT seja um pouco mais alto.

As condições 18 e 19 têm uma concentração de 10⁵ cópias/μL, portanto apresentam CT's próximos. Já a condição 9 tem 10⁴ cópias/μL, fazendo com que o CT seja mais tardio do que as condições anteriores, e a condição 22, com 10² cópias/μL apresente um CT ainda mais alto.

Condição	cDNA 1:5	Template	Água	CT p190	Erro	CT RNA pol	Erro
13	5	10 ² p190	0	-	-	24,37	0
4	5	10 ⁴ p190	0	31,27	0,08	24,27	0,05
14	5	10 ⁵ p190	0	28,33	0,68	24,39	0,16

Tabela 5: valores dos CT's e erros da reação *multiplex* BCR-ABL1 p190 e p210 nas condições em que há presença do *template* do p190.

Para detecção do *BCR-ABL1* p190 foi utilizada a mesma quantidade de cDNA, por isso os CT's da RNA polimerase II são similares. A condição 13 tem 10² cópias/μL do *template*, que é o limite de detecção do teste como mostrado previamente e provavelmente por isso não houve amplificação. As condições 4 e 14

apresentam 10^4 cópias/ μL e 10^5 cópias/ μL , respectivamente e por isso a 4 tem um CT mais tardio que a 14.

Condição	cDNA 1:5	Template	Água	CT p210	Erro	CT RNA pol	Erro
21	5	10^2 p210	0	-	-	24,43	0,12
16	5	10^3 p210	0	-	-	24,7	0,34
17	2	10^3 p210	3	-	-	25,06	0,16
5	5	10^6 p210	0	26,37	0,05	24,29	0,34

Tabela 6: valores dos CT's e erros da reação *multiplex BCR-ABL1* p190 e p210 nas condições em que há presença do *template* do p210.

Para o *BCR-ABL1* p210, nas condições 5, 16 e 21 foi utilizado $5\mu\text{L}$ de cDNA fazendo com que seus CT's sejam similares, enquanto que na condição 17 foi utilizado apenas $2\mu\text{L}$, detectando o CT em um valor mais tardio. Na 16, 17 e 18 não foi detectado o transcrito por ser igual ou abaixo do limite de detecção do teste, como mostrado anteriormente.

4. Discussão

Atualmente no Brasil raramente são realizados testes para detectar as translocações cromossômicas associadas às leucemias, devido ao custo, tempo e necessidade de equipamento e pessoal especializado. A técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) é uma das mais atuais e torna possível ultrapassar dificuldades apresentadas por técnicas mais simples, como hemograma e mielograma, por apresentar alta precisão e alta sensibilidade, mas também técnicas mais avançadas, como FISH (*fluorescent in situ hybridization*), por ter um baixo custo, alta velocidade e maior capacidade de processamento de amostras.

Neste estudo utilizando a qRT-PCR, desenvolveu-se um teste para identificação de algumas translocações associadas à LLA, sendo elas *BCR-ABL1* [t(9;22)], *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] e *TCF3-PBX1* [t(1;19)]. Os resultados mostraram que a presença de diferentes oligonucleotídeos não afetou a efetividade da reação, portanto este teste será realizado em sistema *multiplex*, ou seja, numa mesma reação serão utilizados 2 pares de *primers* e 2 sondas conjugadas com fluoróforos diferentes, para duas translocações distintas, e também 1 par de *primers* e 1 sonda para a RNA polimerase II, que será o controle positivo endógeno. A utilização do sistema em multiplex está de acordo com resultados obtidos por P. Scurto (1999) e N. Pallisgaard (1998).

O sistema *multiplex* foi feito em duas reações, uma para avaliar a presença do *BCR-ABL1* p190 e *BCR-ABL1* p210 e outra para a presença do *ETV6-RUNX1* e o *TCF3-PBX1*. Essa técnica apresentou uma sensibilidade de 10^2 cópias/ μL para o transcrito p190, 10^3 cópias/ μL para o p210, 10^2 cópias/ μL para o *ETV6-RUNX1* e 10^1 cópias/ μL para o *TCF3-PBX1*. E o limite de detecção (LoD) para o *ETV6-RUNX1* e o *TCF3-PBX1* foi de 135,48 cópias e 8,83 cópias, respectivamente, sendo necessário mais testes para determinar os LoD's dos transcritos do *BCR-ABL1*. No estudo realizado por Scurto (1999) a sensibilidade obtida para todas as translocações em estudo foi de 10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo este valor a quantificação absoluta de RNA, o que

indica valores próximos, porém ainda é necessário melhorar a sensibilidade deste teste.

Como meio de validação e controle positivo de cada uma das reações será utilizado o endógeno RNA polimerase II, que deve estar com um CT entre 20 e 25, qualquer valor fora disso pode indicar um falso positivo ou falso negativo, sendo necessário refazer o diagnóstico.

Portanto, este kit representa um avanço na área de teste diagnóstico para LLA, porque além de apresentar as vantagens da técnica de qRT-PCR anteriormente mencionadas, possibilita também análises qualitativas, que auxiliam na estratificação de risco dos pacientes e determinação do tratamento, mas também análises quantitativas, que permitem o acompanhamento da resposta aos medicamentos e exames de doença residual mínima.

As perspectivas futuras para esse teste diagnóstico incluem a utilização dos reagentes da Applied e da IDT, que mostraram ser os mais adequados para essa técnica, além de testar com sondas comerciais para avaliar se melhoram o valor do LoD e amplitude de sinal. Outra etapa essencial e que se encontra em finalização de colaboração com o Instituto Boldrini de Campina é utilizar amostras de LLA com diagnóstico de translocação por PCR convencional para comparação dos resultados. Também precisamos realizar a determinação do LoD no sistema *BCR-ABL1*, além de ampliar a quantidade de doadores saudáveis para determinação mais precisa da linha de corte da RNA Pol II e buscar a especificidade diagnóstica dos ensaios. Como futura perspectiva buscamos realizar ensaios qualitativos para a translocação do *BCR-ABL1* para acompanhar a evolução do paciente ao longo do tratamento de acordo com protocolos internacionais segundo o guia americano (NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*) e europeu (ELN, *European Leucemia Net*), com a aquisição de painel validado para geração de fator de correção.

Referências

ABBASI, S.; MALEHA, F.; SHOBAKI, M. **Acute Lymphoblastic Leukemia Experience: Epidemiology and Outcome of Two Different Regimens.** Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 2013.

BASSAN, R.; HOELZER, D. **Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia.** Journal of Clinical Oncology, n. 5, p. 532-543, 2011.

BHOJWANI, D.; PEI, D.; SANDLUND, J.T. **ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy.** Nature. Leukemia. V. 26, p. 265-270, 2011.

BHOJWANI, D.; YANG, J.J.; PUI, C-H. **Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.** Pediatric clinics of North America. V. 62, p 47-60. 2015.

Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. International Agency for Research on Cancer, 2014.

Causes, Risk Factors and Prevention of Chronic Lymphocytic Leukemia. American Cancer Society, 2018.

CAZÉ, M.O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E. **Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil.** Revista HCPA. Porto Alegre. V. 30, n. 1, p. 5-12, 2010.

CONDUTAS DO INCA/MS. **Leucemias Agudas na Infância e Adolescência.** Revista Brasileira de Cancerologia. V. 47, p. 245-57, 2001.

DONGEN, J.J.; MACINTYRE, E.A.; GABERT, E. et al. **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease.** Leukemia. V. 12, p. 1901-1928, 1999.

Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer, 2018.

FOROOTAN, A., SJÖBACK, R.; BJÖRKMAN, J.; SJÖGREEN, B. **Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR).** Biomolecular detection and quantification. V.12, p.1-6, 2017.

GINSBURG, G.; WILLARD, H. **Genomic and Personalized Medicine.** 2. ed. Elsevier, 2013.

GREAVES, M.F.; WIEMELS, J. **Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia.** Nat Rev Cancer. V. 3, p. 639–649, 2003.

Hematopoiese. Imagem Wikipedia, 2017.

HARRISON, C.J. **Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia.** British Journal of Haematology. V.144, p 147-156, 2009.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em hematologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HYNDMAN, B.D.; LEBRUN D.P. **E2A-PBX1.** Encyclopedia of Cancer. Berlin, 2011.

Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: Informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade. Instituto Nacional do Câncer, 2016.

JIN, Y.; WANG, W.; HU, S. *et al.* **Determination of ETV6-RUNX1 genomic breakpoint by next-generation sequencing.** Cancer Medicine. V. 5, p. 337-351, 2016.

Leucemia Aguda. Instituto Nacional do Câncer, 2007.

Leucemia Mieloide Crônica. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2012.

Leucemia: Subtipos. Instituto Nacional do Câncer, 2017.

LEYTO-CRUZ, F. **Leucemia Mieloide Aguda.** Revista de Hematología del Mexico. V. 19, n.1, p. 24-40, 2018.

LOWENBERG, B.; DOWNING, J.R.; BURNETT, A. **Acute Myeloid Leukemia.** The New England Journal of Medicine. V.341, n.14, p. 1051-1062, 1999.

O'DONNELL, M.R.; ABBOUD, C.N.; ALTMAN, J. **Acute Myeloid Leukemia.** Journal National Comprehensive Cancer Network, n.10, p.984-1021, 2012.

ONCIU, M.; PUI, C. **Diagnosis and classification.** Childhood Leukemias. 2. ed., cap. 2, p. 21-47. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

PALLISGAARD, N.; HOKLAND, P.; RIISHOJ, D.C.; PEDERSEN, B.; JORGENSEN, P. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. Blood. V. 92, p. 574-588, 1998.

PAULSSON, K.; JONSON, T.; ORA, I. **Characterisation of genomic translocation breakpoints and identification of an alternative *TCF3-PBX1* fusion transcript in t(1;19)(q23;p13)-positive acute lymphoblastic leukaemias.** British Journal of Haematology. V. 138, p. 198-201, 2007.

PINKEL, D. **Historical Perspective.** Childhood Leukemias. 2. ed., cap.1, p. 3-8. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

PUI, C.H.; GAYNON, P.S.; BOYETT, J.M.. **Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region.** Lancet. V. 359, p. 1909–1915, 2002.

PUI, C-H.; EVANS, W.E. **Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia.** New England Journal of Medicine. V. 354, p. 166-178, 2006.

RAFIEI, A.; MIAN, A.A.; DÖRING, C. *et al.* **The Functional Interplay Between the t(9;22)-Associated Fusion Proteins BCR/ABL and ABL/BCR in Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphatic Leukemia.** Radich J, ed. *PLoS Genetics*, V.11, 2015.

SCURTO, P.; ROCHA, M.H.; KANE, J.R.; WILLIAMS, W.K.; HANEY, D.M.; **A multiplex RT-PCR assay for the detection of chimeric transcripts encoded by the risk-stratifying translocations of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Nature*. V.12, p. 1994-2005, 1998.

SHTEPER, P.J.; SIEGFRIED, Z.; ASIMAKOPOULOS, F.A.; BEN-YEHUDA, D. **ABL1 methylation in Ph-positive ALL is exclusively associated with the P210 form of BCR-ABL1.** *Leukemia*. V.15, p. 575-582, 2001.

SILVA, F.A. **Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese.** Biblioteca Virtual em Saúde, p.123. Rio de Janeiro, 2009.

Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossoma Philadelphia Positivo de Criança e Adolescente com Mesilato de Imatinibe. Ministério da Saúde, 2012.

What is Chronic Lymphocytic Leukemia? American Cancer Society, 2018.

YE, Y.X; ZHOU, J.; ZHOU, Y.H. *et al.* **Clinical Significance of BCR-ABL1 Fusion Gene Subtypes in Chronic Myelogenous and Acute Lymphoblastic Leukemias.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. V. 15, p. 9961-9966, 2014.

ZELENT, A.; GREAVES, M.; ENVER, T. **Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Oncogene*. V. 23, p. 4275-4285, 2004.

ZERBINI, M.C. **Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfoide, 4ª edição, 2008 - principais modificações introduzidas em relação à 3ª edição, 2001.** *Revista da Associação Médica Brasileira*. V. 57, p. 66-73, 2011.