

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CESAR AUGUSTO BECHER DOS SANTOS

RASTREAMENTO DE MUTAÇÃO NO GENE *NPM1*, POR PCR-MELTING,
EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

CURITIBA

2023

CESAR AUGUSTO BECHER DOS SANTOS

RASTREAMENTO DE MUTAÇÃO NO GENE *NPM1*, POR PCR-*MELTING*,
EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Artigo de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Co-orientadora: Dra. Carolina Mathias

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Katia Danielle dos Santos (minha mãe e meu maior exemplo) por todo o seu esforço, empregado ao longo dos anos, com o objetivo de me garantir o acesso a uma educação de qualidade. Para você, deixo aqui registrado o que eu sempre digo: “você não merece só Palmas, na verdade merece o Tocantins inteiro!”.

Agradeço também a todos os vários amigos e amigas que conheci no Laboratório de Citogenética e Conservação Animal (LabCECA). Em especial à Julia Tomaz, Vinicius Oliveira e Clayton Voidelo pelos bons momentos compartilhados em nossas incontáveis horas de laboratório analisando lâminas e processando amostras.

Também sou especialmente grato ao meu orientador, Daniel Pacheco Bruschi, por ter me recebido no Departamento de Genética enquanto eu ainda procurava minha primeira Iniciação Científica da graduação. Agradeço muito por ter tido a chance de acompanhar a rotina do serviço de citogenética clínica desde o começo de 2022 e realizar meu TCC voltado para essa área.

E por fim, agradeço profundamente à Universidade Federal do Paraná por proporcionar para todos os alunos um ambiente com oportunidades para se fazer ciência todos os dias.

“Veni, vidi, vici.”

(Gaius Iulius Caesar, 47 a.C.)

RESUMO

Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia que se estabelece na medula óssea a partir da proliferação clonal de células-tronco anormais de linhagem mielóide, sendo a leucemia que mais acomete adultos e também aquela com a menor taxa de sobrevivência para pacientes diagnosticados. Análises genéticas têm papel fundamental no seu diagnóstico, impactando no prognóstico e na escolha de tratamentos mais adequados. Mutações no gene *NPM1* têm sido incluídas para a estratificação de risco, mas não há consenso sobre o melhor teste genético para seu rastreamento. Neste trabalho, nós testamos um ensaio para verificar a aplicação do PCR-*melting* na análise desse marcador. A partir de uma amostra controle positivo encontramos a temperatura de *melting* correspondente à mutação. Avaliando um conjunto de 39 pacientes previamente diagnosticados com LMA e comparando-os com os dados desse controle nossos dados apontam para dois casos suspeitos, mas que até o presente momento ainda aguardam os resultados de sequenciamento de Sanger como forma de validação ao protocolo. A padronização do método de PCR-*melting* pode contribuir de maneira significativa para um rastreio inicial de pacientes, e pode ser uma estratégia a ser adotada para evitar gastos excessivos no sistema de saúde pública, já que apenas aquelas suspeitas podem então ser encaminhadas para métodos mais laboriosos e de alto custo, como o sequenciamento de DNA.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Aguda. NPM1. detecção de mutação. curva de melting. temperatura de melting.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 AMOSTRAGEM.....	11
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	11
2.3 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE <i>NPM1</i>	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4 AGRADECIMENTOS FINAIS	24
5 CONFLITO DE INTERESSES	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é um conjunto heterogêneo de neoplasias hematológicas, com evolução rápida, que derivam da proliferação clonal de células-tronco hematopoéticas da linhagem mielóide na medula óssea (MO). Clinicamente expressa um quadro de insuficiência tecidual, em indivíduos afetados, uma vez que a produção de células anormais das linhagens mielóides suprime a formação de células saudáveis e funcionais no organismo (Khawaja et al., 2016). Mundialmente, dados epidemiológicos sugerem que a LMA é a leucemia mais comum na faixa etária adulta, possuindo maior incidência a partir dos 70 anos de idade (Heuser et al., 2020) e apresentando a menor taxa de sobrevivência em pacientes diagnosticados (Deschler & Lübbert, 2006). No Brasil, a avaliação de dados epidemiológicos específicos para a LMA não é praticável. Visto que o monitoramento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) considera as leucemias como uma categoria geral. Estima-se a incidência de 11.540 novos casos de leucemias no ano de 2023, fazendo-as ser o décimo tipo de câncer mais frequente na população brasileira (INCA, 2022).

De acordo com critérios genéticos, a Organização Mundial de Saúde categoriza as LMAs em 13 subtipos baseados na identificação de alterações cromossômicas e mutações em genes, e em oito subtipos cuja definição é dada por marcadores de diferenciação celular (Khoury et al. 2022). A detecção de marcadores genéticos para os tipos de LMA permite a estratificação de risco e a definição de um prognóstico para o paciente. Por isso a European LeukemiaNet (ELN) compilou estudos, realizados com grandes coortes, para gerar diretrizes de estratificação de risco para os diferentes subtipos de LMA utilizando um sistema de classificação dividido em três categorias: favorável, intermediária e adversa (Döhner et al., 2016).

Mutações no gene da Nucleofosmina 1 (*NPM1*) destacam-se na estratificação de risco de pacientes diagnosticados com LMA por serem relatadas nos três grupos prognósticos, dependendo de sua interação com possíveis mutações no gene *FLT3* (Tabela 01). As mutações no gene *NPM1* são as mais prevalentes em pacientes de faixa etária adulta, estando presentes em 25 a 35% de tais casos (Döhner H. et al., 2015; Döhner et al., 2016). E em crianças, trabalhos têm estimado a presença desta mutação em cerca de 8% dos casos (Braoudaki et al., 2010).

TABELA 1 – ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE PACIENTES DIAGNOSTIFICADOS COM LMA, FOCANDO NO GENE *NPM1*

Categorias de risco	Status do gene <i>NPM1</i>
Favorável	Mutação em <i>NPM1</i> sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> de baixa razão alélica
Intermediário	Mutação em <i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i> de alta razão alélica
	<i>NPM1</i> de tipo selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> de baixa razão alélica (sem lesões genéticas de risco adverso)
Adverso	<i>NPM1</i> de tipo selvagem com <i>FLT3-ITD</i> de alta razão alélica

FONTE: Adaptada de Döhner et al. (2016).

O gene *NPM1* contém doze éxons e está localizado na região 5q35 do genoma (Zarka et al., 2020). *NPM1* é responsável pela codificação de uma proteína de 294 aminoácidos, a Nucleofosmina que, quando funcional, concentra-se na região nucleolar e desempenha múltiplas funções devido à sua capacidade de transitar entre o nucléolo, nucleoplasma e citoplasma (Box et al., 2016). A proteína *NPM1* participa da biogênese dos ribossomos no nucléolo, da duplicação dos centrossomos durante a divisão celular, da transcrição da cromatina e organização da heterocromatina, do reparo do DNA e da resposta ao estresse celular (Yu et al., 2006; Box et al., 2016; Zarka et al., 2020).

Em aproximadamente 85% dos casos de LMA com mutações no *NPM1*, o cariótipo do paciente não se encontra alterado, pelo menos em análises citogenéticas convencionais por padrão de bandeamento G (Falini et al., 2005). As LMA com mutação em *NPM1* geralmente apresentam outras mutações associadas, sendo as mais comuns nos genes da DNA-metiltransferase 3 alfa (*DNMT3A*) e no FMS like tirosina-quinase 3 (*FLT3*) (Döhner H. et al., 2015). A associação com a mutação em *DNMT3A* ocorre em cerca de 1/5 dos casos e sua importância prognóstica ainda não é muito clara, enquanto a associação com as mutações em *FLT3* ocorre em cerca de 1/3 dos casos e é incorporada nos critérios de estratificação de risco de pacientes (Döhner et al., 2016). A presença de *FLT3/ITD* sozinha está associada com um prognóstico ruim na LMA, mas trabalhos analisando grandes coortes de adultos têm demonstrado que sua associação com mutações em

NPM1 possui impacto atenuado em questões como sobrevida global e risco de recaída, garantindo um prognóstico intermediário (Gale et al., 2007). Assim estabelece-se que os pacientes com mutação de *NPM1* mas sem mutação de *FLT3* apresentam um bom prognóstico, enquanto pacientes com ou sem ambas as mutações ocorrendo juntas possuem prognóstico intermediário, ao passo que pacientes sem mutação de *NPM1* mas que apresentam mutação de *FLT3* têm um prognóstico adverso.

Aproximadamente 50 tipos de mutações já foram relatados em *NPM1*, sendo mutações de tipo A, B e D as de maior relevância para a estratificação de risco de pacientes com LMA (Hindley et al., 2021). Essas mutações ocorrem no éxon 12 e resultam na produção de proteínas aberrantes, cuja localização é citoplasmática ao invés de nucleolar, devido a uma maior expressão de sinais de exportação nuclear (Falini et al., 2009; Kunchala et al., 2018). Cerca de 75 a 80% das mutações de *NPM1* nas LMAs correspondem à do tipo A, da qual resulta de uma duplicação de tetranucleotídeos TCTG de posição 956-959. A mutação do tipo B ocorre em cerca de 10% dos casos de LMA e é caracterizada pela inserção de quatro pares de bases CATG também na posição 956-959. Já a mutação do tipo D está presente em 5% dos pacientes com LMA e é resultante de uma inserção CCTG também na posição 956-959 (Falini et al., 2005).

Atualmente a detecção de mutações A, B e D no gene *NPM1* é realizada por testes moleculares como a PCR convencional, PCR quantitativa ou sequenciamento de DNA genômico na região específica. No entanto, não existe um consenso sobre o melhor teste genético para ser aplicado na rotina de rastreio clínico destas mutações levando em conta as limitações importantes de cada um deles. O sequenciamento de nova geração, apesar de ser o método mais sensível, possui a restrição de ser um processo demorado e com custo financeiro elevado (Hindley et al., 2021). Alternativas diagnósticas também podem ser via a utilização de exames de Western Blotting no reconhecimento de proteínas *NPM1* alteradas (Martelli et al., 2008), ou da imunohistoquímica aplicada para a busca de células detentoras de nucleofosmina cuja localização seja citoplasmática (Falini et al., 2006). Porém a incorporação de tais técnicas no diagnóstico é prejudicada pelos custos e pela exigência de testagens complementares.

Com base no cenário do diagnóstico clínico das LMA com mutação em *NPM1*, a padronização e validação de protocolos baseados em PCR-*melting* poderia

ser uma alternativa a ser testada para promoção desse rastreamento. O PCR-*melting* é uma análise fundamentada na diferença entre a Temperatura de Desnaturação (TM) apresentada por diferentes fragmentos de DNA, sendo um princípio que pode ser explorado na distinção entre amostras de DNA que contenham, ou não, uma mutação em sua sequência. A Temperatura de Desnaturação, também conhecida como Temperatura de *Melting*, trata-se do conceito correspondente à faixa de temperatura na qual exatamente 50% do DNA estaria em formato de fita simples. Podendo ser utilizada como um parâmetro de análise para discriminar pequenas variações em sequências, visto que cada fragmento de DNA possui uma TM específica de acordo com a sequência de nucleotídeos e o conteúdo GC que o compõe (Reed et al. 2007). A análise da curva de *melting* é uma etapa pós-Real-Time PCR, realizada na presença do agente SYBR Green e com uma desnaturação progressiva dos *amplicons* gerados, resultando em gráfico de intensidade de fluorescência medida de acordo com a temperatura. Em virtude das qualidades da técnica, que traz simplicidade unida com alta sensibilidade e especificidade, poderia ser propício empregar tal metodologia para o diagnóstico mais assertivo dos subtipos de LMA. De modo a contribuir tanto para o direcionamento de condutas terapêuticas, quanto para a estratificação de risco de pacientes. Por isso, em nosso trabalho, nós testamos um ensaio para verificar o potencial da aplicação e de eficiência do PCR-*melting* no rastreamento da incidência de mutações no gene *NPM1* em pacientes diagnosticados com LMA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Utilizamos um conjunto de amostras de DNA genômico de 40 pacientes do Hospital Erasto Gaertner diagnosticados com LMA entre 2021 e 2023. Todos foram imunofenotipados por citometria de fluxo no momento do diagnóstico. E tais amostras foram cedidas via parceria com o Laboratório para Ciências Aplicadas e Tecnologias em Saúde do Instituto Carlos Chagas (ICC), Fiocruz do Paraná, que foi responsável por realizar o rastreamento molecular das seguintes alterações cromossômicas: $t(1;19)(q23;p13)$, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(8;21)(q22;q22)$, $t(12;21)(p13;q22)$, $t(15;17)(q24;q21)$ Bcr1 e $t(15;17)(q24;q21)$ Bcr3. Adicionalmente, lá também foi realizada uma rodada prévia de testes para a presença de mutação no gene NPM1 utilizando um Kit comercial, IPSOGEN NPM1 Mutascreeen, da Qiagen para qPCR. E no Laboratório de Citogenética Evolutiva e Conservação Animal da Universidade Federal do Paraná, todas essas amostras foram genotipadas por meio da técnica de PCR para o rastreamento da mutação FLT3/ITD.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de amostras de aspirados de MO empregando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemanha) segundo as especificações do fabricante para o uso da camada leucocitária isolada por centrifugação. Em seguida, as amostras de DNA tiveram concentração e pureza aferidas por um espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) configurado em 260 nm e foram armazenadas em ultrafreezer à temperatura de -80°C. As amostras de DNA foram aliquotadas a partir da diluição do material genético em água ultrapura com uma concentração final de 20 ng/μL, também aferida pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) configurado em 260 nm.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *NPM1*

A amplificação da região genômica associada à presença da mutação em *NPM1* foi obtida por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Nela foram utilizados os *primers* previamente descritos por Huang et al. (2008) e apresentados na Tabela 2. De modo que para cada reação foram utilizados 1x Master Mix GoTaq® qPCR (Promega, Estados Unidos da América), 10 µM para os *primers forward* e *reverso*, e 20 ng/µL para o DNA de cada amostra. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de paciente, previamente caracterizada molecularmente como portadora da mutação *NPM1* do tipo D. Cada reação foi realizada em um sistema de duplicatas inserido no aparelho QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Estados Unidos da América). Amostras que apresentaram temperatura de melting semelhante à do controle positivo para a mutação foram sequenciadas pelo método de Sanger (1979) utilizando kit Big Dye Terminator, segundo especificações do fabricante. Os produtos sequenciados serão analisados em comparação com sequências disponíveis em bancos de dados públicos. Também comparamos nossos dados sobre a presença ou ausência de *NPM1* mutado, com os obtidos na testagem molecular realizada no ICC, utilizando o kit IPSOGEN *NPM1* Mutascreen (Quiagen).

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *NPM1*

Primer Senso	5' - GTT TCT TTT TTT TTT TTT CCA GGC TAT TCA AG – 3'
Primer Antisenso	5' - CAC GGT AGG GAA AGT TCT CAC TCT GC – 3'

FONTE: Huang et al. (2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossa amostragem inicial incluía um grupo formado por 40 pacientes diagnosticados com LMA, no entanto, um dos pacientes foi excluído devido à falta de informações sobre o rastreamento das principais translocações recorrentes em LMA. O grupo amostral final foi constituído por cinco pacientes infantis (com idades de um a 15 anos), 26 adultos (de 23 a 87 anos) e oito pacientes de idade não informada. Sendo no final 26 indivíduos do sexo masculino e 13 do sexo feminino. A mediana de idade no grupo amostral final é de 44 anos.

Em nosso grupo amostral, a caracterização molecular detectou um indivíduo portador de t(6;9)(q23;p13) (DEK/CAN) e oito portadores do rearranjo t(15;17)(q24;q21) (PML-RARA) (Tabela 3), sendo o restante dos pacientes todos negativos para as alterações testadas. De fato, estima-se que 45% dos portadores de LMA apresentam cariótipo normal em uma análise citogenética convencional (Nimer, 2008), o que corrobora com a ausência de detecção das alterações genômicas rastreadas por biologia molecular. Infelizmente não contamos com dados sobre o cariótipo destes pacientes obtidos por meio da citogenética convencional, o que forneceria um panorama mais completo sobre a etiologia genética da LMA em cada paciente avaliado.

Nossos experimentos com a curva de *melting* revelaram uma T_M de 76,452°C para a amostra de controle positivo de mutação em *NPM1* (Figura 1A). O controle positivo de nosso experimento trata-se de uma amostra de paciente portador de mutação em *FLT3* e no gene *NPM1*, previamente caracterizadas e validadas como controle por um laboratório colaborador. Nós comparamos a curva de T_M para as demais amostras em relação à amostra controle (Tabela 4). Dentre as 39 amostras analisadas, foi possível identificar duas com a mesma temperatura de *melting* apresentada para o controle positivo (Figura 1C e 1D). O restante das amostras analisadas apresentou T_M variável, com uma variação média de 0,2°C (Tabela 4). Conforme o esperado, o gel de agarose 3% recuperou bandas de aproximadamente 170 pb (Figura 2) para o produto de amplificação dos *primers* de *NPM1* (167 pb)

(Huang et al., 2009), sendo as bandas da amostra de controle positivo ligeiramente mais pesadas em relação às demais. No entanto, para as duas demais amostras que suspeitamos se tratar de positivas para mutação *NPM1*, essa variação não foi evidente por este método. Por se tratar de uma mutação de inserção tetranucleotídica, é esperado que devido ao limite de resolução de um gel de agarose convencional, não seja possível avaliar com exatidão variações desta natureza, sendo a genotipagem em eletroforese capilar ou o sequenciamento por Sanger os métodos mais adequados para esse tipo de avaliação (Lu et al., 2014). Duas amostras suspeitas de serem positivas para a mutação em *NPM1* (Figura 1C e 1D) e uma suspeita de ser negativa (Figura 1B) foram enviadas para o Sequenciamento de Sanger como forma de validar os resultados interpretados a partir das curvas de *melting*, mas ainda não retornaram seus resultados.

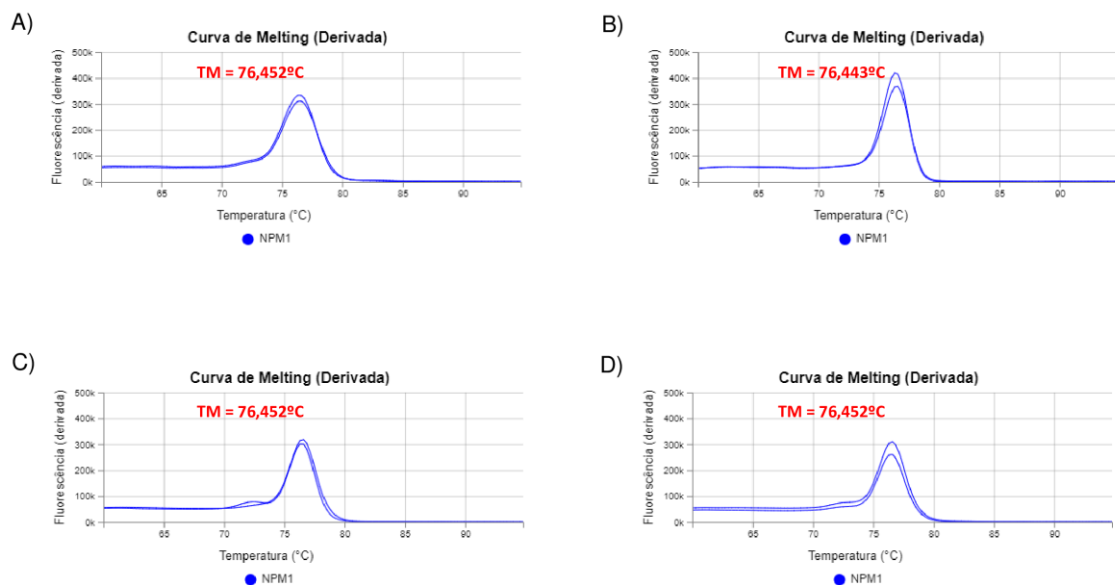


Figura 1: Gráficos da curva de *melting* obtidos para uma amostra de controle positivo de mutação no gene *NPM1* (A); amostra apresentando alelo normal para o gene (B); duas amostras potencialmente positivas para a presença da mutação (C) e (D). Note que o gráfico demonstra a mesma temperatura de *melting* para o controle positivo e as amostras 178-22 (C) e 276-21 (D).

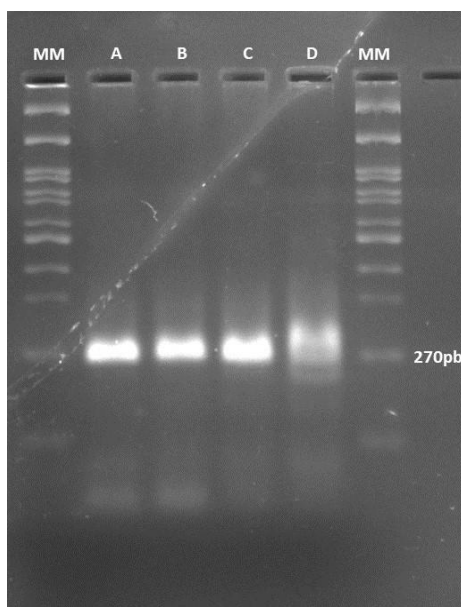


Figura 2: Gel de 3% agarose contendo poços para marcadores de peso molecular (MM), amostra 276.21 (A); amostra 292.21 (B); amostra 178.22 (C) e controle positivo (D). Revelando bandas de aproximadamente 170 pb para os produtos de amplificação. Nota-se que a banda da amostra de controle-positivo revelou-se ligeiramente mais pesada em relação às demais.

Frente a esses dados, dois cenários, mutuamente exclusivos, dependem da resposta deste sequenciamento para que possamos validar ou rejeitar o uso da análise de curvas de *melting* na presente avaliação. No primeiro cenário, caso as amostras sejam positivas para a mutação na análise por sequenciamento, haverá a indicação de que a metodologia aplicada é capaz de discriminar dentre amostras positivas e amostras negativas através da simples análise das curvas de *melting* das amostras. De fato, estudos utilizando high-resolution *melting* (HRM) para detecção de *NPM1* chegaram a apresentar até 100% de sensibilidade na distinção entre alelos selvagens em relação a alelos mutantes (Liu et al., 2014), sendo todos os dados validados por sequenciamento Sanger. Similar resultado foi obtido por Tan et al. (2008) que também encontraram total concordância na identificação de alelos mutados para *NPM1*. Caso a distinção entre amostras positivas e negativas encontradas neste estudo se confirmem como positivos para a mutação, nós demonstraremos a aplicação de PCR-*melting* convencional, sem a aplicação de HRM como uma alternativa metodológica para centros diagnósticos que não possuem o equipamento aplicável para execução do HRM. Apesar do HRM ser reconhecidamente um método com maior sensibilidade em relação às abordagens

convencionais de análise de curvas de *melting* utilizadas em nosso trabalho, esforços amostrais incluindo um maior número de amostras avaliadas, e da aplicação de curvas de diluição das amostras poderão nortear a verificação dos limites de resolução desta metodologia. Um dos fatores que podem justificar esta diferença pode ser o fato de que abordagens de HRM os dados são representados em formato de gráfico de diferenças em vez de um gráfico normalizado, o que pode favorecer a distinção entre alelos (Erali et al., 2009).

No cenário alternativo, no qual o resultado do sequenciamento demonstre que as amostras suspeitas sejam negativas para a mutação, nossos resultados obtidos neste estudo apontariam que a PCR-*melting* convencional com nosso conjunto de *primers* não poderia ser aplicada para o rastreamento final deste gene, sendo a adoção de estratégias de HRM uma alternativa já validada para contornar estas questões. Corroborando com este cenário, tem o fato de que, algumas das amostras testadas neste trabalho também haviam sido avaliadas por meio do kit comercial IPSOGEN NPM1 Mutascreen (Quiagen) por colaboradores deste projeto (ver tabela 3), no entanto, esse kit não foi capaz de detectar nenhum indício de mutação nas avaliadas, incluindo as duas amostras que tiveram a temperatura de *melting* de 76,452°C.

Independente dos cenários avaliados, nossos dados suportam a ideia de que o PCR-*melting* deva ser aplicado sempre como um método de rastreamento inicial dos pacientes devido a sua facilidade quando comparado aos outros métodos, porém, requer sempre a necessidade de uma validação por métodos mais precisos de análise, sendo o sequenciamento de DNA o método ainda mais recomendado neste tipo de avaliação (Liu et al., 2014)

As amostras de nosso estudo também foram previamente avaliadas quanto a mutação em *FLT3/ITD* em um projeto piloto de nosso grupo de pesquisa, cuja testagem retornou com um caso positivo (validado por genotipagem e sequenciamento Sanger) e dois suspeitos que ainda aguardam resultados de genotipagem (Tabela 3). No entanto, nenhum dos casos de pacientes *FLT3/ITD* positivos foram também positivos (ou suspeitos) de apresentarem a mutação em *NPM1*. Por outro lado, uma das amostras suspeitas de serem positivas para a mutação em *NPM1* (178.22) também é positiva para a alteração t(15;17), o que

implica a ela um prognóstico considerado intermediário segundo as diretrizes ELN (Dohner et al., 2016).

Por fim, nossos dados apesar de ainda não finalizados são capazes de levantar suspeitas com relação à eficiência da testagem molecular para a detecção de *NPM1* mutado. Pois o teste com o kit comercial não foi capaz de detectar nenhum indício de mutação nas duas amostras que tiveram a temperatura de *melting* de 76,452°C e que, no momento, aguardam a confirmação dos resultados pelo sequenciamento de DNA genômico. Para um aprofundamento nos estudos baseados na temperatura de *melting*, uma boa alternativa seria a realização de testes em equipamento calibrado para testes de alta resolução permitindo resultados mais sólidos. O uso de HRM em abordagens clínicas têm crescido nos últimos anos, principalmente como uma alternativa para o rastreamento inicial dos pacientes, evitando um excesso de encaminhamentos de amostras para o sequenciamento por Sanger.

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DAS AMOSTRAS ANTES DA EXECUÇÃO DOS TESTES DE PCR-MELTING PARA O *NPM1*

(Continua)

Código da amostra	Sexo biológico	Idade	t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3/PBX1</i>	t(6;9)(p23;q34) <i>DEK/CAN</i>	t(8;21)(q22;q22) <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6/RUNX1</i>	t(15;17)(q24;q21) <i>PML/RARA bcr1</i>	t(15;17)(q24;q21) <i>PML/RARA bcr3</i>	<i>NPM1</i> mutado *	<i>FLT3/ITD</i>
340.22	M	33	-	-	ND	-	ND	Detectado	ND	ND
389.21	M	04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
380.21	M	38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
293.22	F	23	ND	Detectado	ND	ND	-	-	ND	ND
330.21	F	77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
332.21	F	44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
361.21	M	42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
478.21	F	03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
346.21	M	59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
342.21	M	61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
343.21	M	53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
363.21	F	60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
276.21	F	80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
56.21	M	51	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
323.21	F	44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
362.21	M	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
144.21	M	56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
325.21	M	54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
176.22	M	-	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado	ND	?
333.21	F	87	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
307.21	F	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado
288.21	M	06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
267.21	M	23	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado	ND	ND
86.22	F	01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
163.22	F	-	ND	ND	ND	ND	Detectado	Detectado	ND	ND
324.21	M	39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
91.23	F	26	-	-	-	-	ND	ND	-	ND
133.23	M	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
292.21	F	54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
169.22	M	-	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado	ND	ND

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DAS AMOSTRAS ANTES DA EXECUÇÃO DOS TESTES DE PCR-MELTING PARA O *NPM1*

(Conclusão)

Código da amostra	Sexo biológico	Idade	t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3/PBX1</i>	t(6;9)(p23;q34) <i>DEK/CAN</i>	t(8;21)(q22;q22) <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6/RUNX1</i>	t(15;17)(q24;q21) <i>PML/RARA bcr1</i>	t(15;17)(q24;q21) <i>PML/RARA bcr3</i>	<i>NPM1</i> mutado *	<i>FLT3/ITD</i>
134.23	M	58	-	-	-	-	ND	ND	-	ND
81.23	M	64	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado	-	ND
293.21	M	45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40.23	M	42	-	ND	ND	-	-	-	-	ND
135.23	M	48	-	-	-	-	-	-	-	?
44.23	M	31	-	-	-	-	ND	Detectado	-	ND
274.21	F	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado
141.23	M	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
51.22	M	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
178.22	M	-	ND	ND	ND	ND	ND	Detectado	ND	ND

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Amostras não testadas para determinado marcador foram representadas com um traço (-); resultados negativos foram descritos como “Não Detectados” (ND); resultados positivos foram descritos como “Detectado”; casos suspeitos, mas que ainda aguardam resultados finais de testagem foram representados com um ponto de interrogação (?). A coluna com resultados das testagens em *NPM1* está marcada com um asterisco (*) pois foi realizada utilizando um kit comercial e servirá como medida comparativa para a eficiência da análise de curva de *melting*.

TABELA 4 – DADOS OBTIDOS COM OS EXPERIMENTOS DE PCR-MELTING NO CONJUNTO DE AMOSTRAS COM LMA

Código da amostra	Valor de Tm (°C) detectado na curva de Melting	Diferença em °C para a Tm do controle positivo para a mutação em <i>NPM1</i>
340.22	76,488	0,036
389.21	76,488	0,036
380.21	76,420	-0,032
293.22	76,352	-0,099
330.21	76,420	-0,032
332.21	76,488	0,036
361.21	76,488	0,036
478.21	76,624	0,172
346.21	76,992	0,540
342.21	76,924	0,472
343.21	76,856	0,404
363.21	76,856	0,404
276.21	76,452	0,000
56.21	76,158	-0,294
323.21	72,764*	-3,688
362.21	-	-
144.21	76,022	-0,430
325.21	76,022*	-0,430
176.22	76,090	-0,362
333.21	76,022*	-0,430
307.21	76,158	-0,294
288.21	76,246	-0,206
267.21	76,314	-0,138
86.22	76,382	-0,070
163.22	76,314	-0,138
324.21	73,460*	-2,992
91.23	76,382	-0,070
133.23	76,314	-0,138
292.21	76,443	-0,009
169.22	76,307	-0,145
134.23	76,036	-0,416
81.23	76,307	-0,145
293.21	76,307	-0,144
40.23	76,511	0,059
135.23	76,171	-0,280
44.23	76,579	0,127
274.21	76,655	0,203
141.23	76,723	0,271
51.22	76,655	0,203
178.22	76,452	0,000

FONTE: O autor (2023)

LEGENDA: A TM para cada amostra está representada de acordo com a média dos valores obtidos no sistema de duplicatas. As TMs de amostras cuja amplificação não ocorreu em uma das duplicatas foram marcadas com um asterisco (*). A amostra 362.21 não pode ser avaliada pois não houve amplificação em ambas as suas duplicatas. Algarismos negativos ou positivos na coluna com a diferença de TM indicam, respectivamente, que a amostra tem a TM menor ou maior do que a registrada em nosso controle para a mutação em *NPM1*.

4 AGRADECIMENTOS FINAIS

Os autores agradecem ao Hospital Erasto Gaertner e ao Instituto Carlos Chagas pelas amostras cedidas. Agradecemos à aluna Julia Tomaz pela condução dos experimentos envolvendo o gene *FLT3*. Agradecemos à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo recurso financeiro concedido para a execução deste trabalho.

5 CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

REFERÊNCIAS

Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. et al. 2016. Acute myeloid leukaemia. Nature Reviews Disease Primers 2, 16010.

DOI: 10.1038/nrdp.2016.10

Heuser, M., Ofran, Y., Boissel, N. et al. 2020. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. Jun. 31(6):697-712

DOI: 10.1016/j.annonc.2020.02.018.

Deschler B., Lübbert M. 2006. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer. American Cancer Society. Nov 1;107(9):2099-107

DOI: 10.1002/cncr.22233

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). 2022. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro

Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>

Döhner H., Estey E. et al. 2016. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. Blood Rev. Nov 28; 129(4):424-447

DOI 10.1182/blood-2016-08-733196

Döhner H.; Weisdorf D.J.; Bloomfield C.D. 2015. Acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. Sep 17; 373(12):1136-52

DOI: 10.1056/NEJMra1406184.

Braoudaki M.; Papathanassiou C. et al. 2010. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol. Oct 27;3:41

DOI: 10.1186/1756-8722-3-41

Zarka J.; Short N.J. et al. 2020. Nucleophosmin 1 mutations in acute myeloid leukemia. *Genes (Basel)*. Jun 12; 11(6):649

DOI: 10.3390/genes11060649

Box J.K.; Paquet N. et al. 2016. Nucleophosmin: From structure and function to disease development. *BMC Mol. Biol.* Aug 24; 17(1):19.

DOI: 10.1186/s12867-016-0073-9

Yu Y.; Maggi L.B. et al. 2006. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* May 26;(10):3798-809

DOI: 10.1128/MCB.26.10.3798-3809.2006

Gale R.E.; Green C. et al. 2007. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. Mar 1;111(5):2776-84

DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090

Hindley A.; Catherwood M.A. et al. 2021. Significance of NPM1 Gene Mutations in AML. *Int J Mol Sci.* Sep 17; 22(18):10040

DOI: 10.3390/ijms221810040

Falini B.; Mecucci C. et al. 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* Jan 20;352(3):254-66

DOI: 10.1056/NEJMoA041974. Erratum in: *N Engl J Med.* 2005 Feb 17;352(7):740

Falini B.; Bolli N. et al. 2009. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia*. Oct 23;(10):1731-43

DOI: 10.1038/leu.2009.124

Kunchala P.; Kuravi S. et al. 2018. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 32(3):167-183

DOI: 10.1016/j.blre.2017.11.001

Martelli M.P.; Manes N. et al. 2008. A western blot assay for detecting mutant nucleophosmin (NPM1) proteins in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. Dec;22(12):2285-8

DOI: 10.1038/leu.2008.149

Falini B.; Martelli M.P. et al. 2006. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. Sep 15;108(6):1999-2005

DOI: 10.1182/blood-2006-03-007013

Reed G.H.; Kent J. et al. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. Jun;8(6):597-608

DOI: 10.2217/14622416.8.6.597

Tan A.Y.; Westerman D. et al. 2008. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. Jul 29;1:10

DOI:10.1186/1756-8722-1-10

Huang Q.; Chen W. et al. 2008. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol*. Jul;142(3):489-92

DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07205.x

Nimer S.D. 2008. Is it important to decipher the heterogeneity of "normal karyotype AML"? *Best Pract Res Clin Haematol*. Mar;21(1):43-52

DOI: 10.1016/j.beha.2007.11.010

Liu Y.; Tang J. et al. 2014. High-resolution melting curve analysis, a rapid and affordable method for mutation analysis in childhood acute myeloid leukemia. *Front Pediatr*. Sep 9;2:96

DOI: 10.3389/fped.2014.00096

Erali M.; Voelkerding K.V.; Wittwer C.T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*. Aug;85(1):50-8. DOI:

10.1016/j.yexmp.2008.03.012