

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DIAGNÓSTICA PARA FUSÕES
CROMOSSOMAIS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE REAÇÃO EM CADEIA
DE POLIMERASE EM TEMPO REAL E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO
PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS PRINCIPAIS FUSÕES NA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA

ANDRESSA FOLHA VIEIRA

Brasília - DF

2024

ANDRESSA FOLHA VIEIRA

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DIAGNÓSTICA PARA FUSÕES
CROMOSSOMAIS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE REAÇÃO EM CADEIA
DE POLIMERASE EM TEMPO REAL E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO
PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS PRINCIPAIS FUSÕES NA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília.

Orientadora: Angélica Amorim Amato
Coorientador: Miguel de Souza Andrade

Brasília - DF

2024

ANDRESSA FOLHA VIEIRA

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DIAGNÓSTICA PARA FUSÕES
CROMOSSOMAIS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE REAÇÃO EM CADEIA
DE POLIMERASE EM TEMPO REAL E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO
PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DAS PRINCIPAIS FUSÕES NA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília.

Aprovado em: 14/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília

Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Universidade de Brasília

Dr. Gustavo Barcelos Barra
Laboratório Sabin Diagnóstico e Saúde

Dra. Dayde Lane Mendonça da Silva
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à Lícia, minha mãe e a Nelson, meu avô.

Obrigada por sempre acreditarem nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela jornada que me proporcionou todos os dias. A minha família, principalmente a André, Anna, Maria Júlia e Otávio, que sempre estiveram ao meu lado e em todos os momentos. As amigas queridas que fiz no Ensino Médio, Brenda, Eloíse, Gabriela e Paula, as amigadas da faculdade Alessandro, Amanda, Juan, Nathália, Ruth e Thamires, aos amigos que fiz na jornada da vida Natalia, Diego e Mateus, que ainda sigo compartilhando felicidades, momentos únicos e sigo aprendendo, diariamente, com seus ensinamentos.

As instituições Universidade de Brasília, Laboratório Sabin Diagnóstico e Saúde, Hospital de Base e Hospital Universitário de Brasília agradeço a oportunidade ímpar em meu futuro e por acreditar em minha capacidade. Agradeço ao CAPES por permanecer fomentando a ciência e o crescimento dos profissionais no Brasil.

Agradeço a mim mesma pelo esforço, por não desistir nos dias difíceis, por acreditar, mesmo que minimamente, na minha capacidade de aprender. Faço agradecimentos especiais a Cláudia, Fabian, Yanara, Aryadne e Gabryelle que me permitiram desenvolver e aprender todos os dias sobre novas etapas deste trabalho. Na jornada emocional tenho imensa gratidão por todo amor e suporte que recebi de Joaquim, meu companheiro de vida.

Finalizo os agradecimentos à minha orientadora e a minha chefe por terem sido uma porta em minha vida e por terem me dado oportunidades de crescimento, obrigada Angélica por estar aqui e fazer a diferença no meu autoconhecimento e agradeço você Lara por ter sido o porto seguro que a vida me presenteou.

RESUMO

A medula óssea é a principal produtora de células hematopoiéticas, e sua disfunção pode levar ao desenvolvimento de leucemia, caracterizada pela proliferação anormal de células-tronco pluripotentes que não amadurecem adequadamente. A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma forma específica dessa doença e seu diagnóstico exige uma abordagem multifacetada que inclui imunofenotipagem, análise citogenética convencional e testes genéticos moleculares. A triagem para rearranjos gênicos é crucial para confirmar o diagnóstico e ajustar a terapia, impactando de modo significativo o prognóstico. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi de desenvolver método de reação de polimerase em cadeia em tempo real com transcrição reversa (RT-PCR) para detectar fusões gênicas observadas na LMA. Para isso, foi extraído RNA de amostras de medula óssea ou sangue periférico de voluntários com LMA, RT-PCR em tempo real e sequenciamento de nova geração (NGS). A RT-PCR foi padronizada com uma etapa inicial de 45°C por 10 minutos, seguida por ativação a 95°C por 5 minutos, e ciclos de extensão e anelamento a 95°C por 5 segundos e 65°C por 30 segundos. O NGS foi utilizado para validar os resultados obtidos pela RT-PCR em tempo real. Comparações entre os métodos foram realizadas para determinar a acurácia da RT-PCR, e foram determinadas ainda sua precisão, sensibilidade e especificidade. Foram incluídos 11 pacientes com diagnósticos de LMA. A RT-PCR em tempo real apresentou acurácia de 100%, quando comparada ao NGS, para a detecção das fusões BCR-ABL P210, CBFβ-MYH11, KMT2A-MLLT1, PMR-RARA, ABL1, KMT2A-MLLT10, BCR-ABL P190, RUNX-RUNX1T1 e KMT2A-MLLT3. Por meio de testes in sílico e da curva de dissociação dos produtos de amplificação, foi observada a especificidade da RT-PCR em tempo real. A sensibilidade da RT-PCR em tempo real variou de 192,4 a 1531,9 cópias por reação, dependendo do alvo (fusão gênica). Dessa forma, observou-se que a RT-PCR em tempo real demonstrou ser uma alternativa ao NGS para a detecção de fusões gênicas observadas na LMA e investigadas rotineiramente em sua abordagem diagnóstica e terapêutica. Considerando o custo e disponibilidade do NGS, o a RT-PCR pode representar uma alternativa de menor custo e maior celeridade no fornecimento de resultados de fusões gênicas investigadas no manejo de pacientes com LMA.

Palavras-chave: leucemia mieloide aguda; fusões gênicas; diagnóstico molecular; RT-PCR em tempo real.

ABSTRACT

The bone marrow is the primary producer of hematopoietic cells, and its dysfunction can lead to the development of leukemia, characterized by the abnormal proliferation of pluripotent stem cells that do not mature properly. Acute Myeloid Leukemia (AML) is a specific form of this disease, and its diagnosis requires a multifaceted approach including immunophenotyping, conventional cytogenetic analysis, and molecular genetic testing. Screening for gene rearrangements is crucial to confirm the diagnosis and tailor therapy, significantly impacting the prognosis. In this context, the aim of this study was to develop a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method to detect gene fusions observed in AML. RNA was extracted from bone marrow or peripheral blood samples of AML patients, followed by real-time RT-PCR and next-generation sequencing (NGS). The RT-PCR was standardized with an initial step at 45°C for 10 minutes, followed by activation at 95°C for 5 minutes, and extension and annealing cycles at 95°C for 5 seconds and 65°C for 30 seconds. NGS was used to validate the results obtained by real-time RT-PCR. Comparisons between the methods were performed to determine the accuracy of RT-PCR. In addition, the precision, sensitivity, and specificity were determined. Eleven patients with AML diagnoses were included. Real-time RT-PCR showed 100% accuracy compared to NGS for the detection of BCR-ABL P210, CBFB-MYH11, KMT2A-MLLT1, PMR-RARA, ABL1, KMT2A-MLLT10, BCR-ABL P190, RUNX-RUNX1T1, and KMT2A-MLLT3 fusions. Specificity of real-time RT-PCR was observed through *in silico* tests and the dissociation curve of amplification products. The sensitivity of real-time RT-PCR ranged from 192.4 to 1531.9 copies per reaction, depending on the target (gene fusion). Thus, real-time RT-PCR proved to be an alternative to NGS for detecting gene fusions observed in AML and routinely investigated in its diagnostic and therapeutic approach. Considering the cost and availability of NGS, RT-PCR may represent a lower-cost, more rapid alternative for providing results on gene fusions investigated in the management of AML patients.

Keywords: acute myeloid leukemia; gene fusions; molecular diagnosis; real-time RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas de amplificação obtidas com as reações de RT-PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas.....	36
Figura 2 - Repetibilidade do teste com 6 amplificações para cada alvo.	38
Figura 3 - Resultados obtidos da sensibilidade para cada alvo.....	41
Figura 4 - Resultado de especificidade por curva de melting.....	42
Figura 5 - Resultado de negativos para especificidade por curva de melting.....	43
Figura 1 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene BCR-ABL1p210p190p230.	68
Figura 2 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene PML-RARAbcr1, PML-RARAbcr2 e PML-RARAbcr3, respectivamente.	69
Figura 3 - Estrutura do gBlock contendo o gene CFBF-MYH11 tipo A.....	70
Figura 4 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene RUNX1-RUNX1T1.....	70
Figura 5 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT1.	71
Figura 6 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT3.	71
Figura 7 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT10.	72
Figura 8 - Estrutura do plasmídeo pMA-T contendo o gene ABL1.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> e sondas para identificação dos rearranjos gênicos por reação de cadeia em polimerase em tempo real.....	20
Tabela 1 - <i>Primers</i> e sondas para identificação dos rearranjos gênicos por reação de cadeia em polimerase em tempo real.....	30
Tabela 2 - Resultado da análise das amostras obtidas.....	34
Tabela 3 - Resultados de Cq dos testes de reprodutibilidade e repetibilidade.....	39
Tabela 1 - Cálculo do número de cópias por reação BCR-ABL P210 e P190.....	56
Tabela 2 - Cálculo do número de cópias por reação PML-RARA.....	57
Tabela 3 - Cálculo do número de cópias por reação CBFβ-MYH11.....	58
Tabela 4 - Cálculo do número de cópias por reação RUNX1-RUNX1T1.....	58
Tabela 5 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT1.....	59
Tabela 6 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT3.....	60
Tabela 7 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT10.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado de temperaturas nas concentrações altas.....	51
Gráfico 2 - Resultado de temperaturas nas concentrações baixas.....	52
Gráfico 3 - Resultado de temperaturas com primers e sondas isolados.....	52
Gráfico 4 - Resultado de temperaturas com primers e sondas no multiplex.....	53
Gráfico 1 - Comparação de fluorescência.. ..	54
Gráfico 1 - Comparação de tempo de extensão da PCR.. ..	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCR – Região do Quebra-Cabeça (ou Região de Quebra de Ponto)
- ABL – Homólogo de Oncogene Murino de Leucemia Abelson
- PML – Leucemia Promielocítica
- RARA – Receptor Alfa do Ácido Retinóico
- CBFB – Fator de Ligação Central Beta
- MYH11 – Cadeia Pesada de Miosina 11
- RUNX1 – Fator de Transcrição Relacionado com *Runt* 1
- RUNX1T1 – Parceiro de Translocação RUNX1 1 (também conhecido como ETO)
- KMT2A – Metiltransferase de Lisina 2A (anteriormente conhecido como MLL – Leucemia de Linhagem Mista)
- MLLT1 – Gene Translocado MLL 1 (também conhecido como AF-1)
- MLLT3 – Gene Translocado MLL 3 (também conhecido como AF-9)
- MLLT10 – Gene Translocado MLL 10 (também conhecido como AF-10)
- LMA – Leucemia Mieloide Aguda
- RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
- NGS – Sequenciamento de Nova Geração
- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- BCR-ABL P210 – Proteína de Fusão BCR-ABL de 210 kDa (associada à leucemia mieloide crônica)
- BCR-ABL P190 – Proteína de Fusão BCR-ABL de 190 kDa (associada à leucemia linfoblástica aguda)
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- Cq – Quantificação de ciclo

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação, intitulada "Padronização de metodologia diagnóstica para fusões cromossomais: Uma análise comparativa entre cadeia de reação de polimerase em tempo real e Sequenciamento de Nova Geração para detecção simultânea das principais fusões na Leucemia Mieloide Aguda", foi elaborada no formato de capítulo, sendo constituída por introdução, métodos, capítulo 1 e considerações finais. No capítulo 1, o trabalho é apresentado no formato de artigo científico. São também apresentados apêndices com detalhes dos protocolos experimentais utilizados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MÉTODOS	17
3.1 PARTICIPANTES	17
3.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS	17
3.3 <i>PRIMERS</i>	18
3.4 RT-PCR	23
3.5 NGS	23
3.6 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, PRECISÃO, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA RT-PCR EM TEMPO REAL	25
4. CAPÍTULO 1	27
4.1 INTRODUÇÃO	27
4.2 MÉTODOS	28
4.3 RESULTADOS	34
4.3.1 ACURÁCIA	34
4.3.2 PRECISÃO	37
4.3.3 SENSIBILIDADE	40
4.3.4 ESPECIFICIDADE	42
4.4 DISCUSSÃO	44
4.5 CONCLUSÃO	46
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6. REFERÊNCIAS	48
7. APÊNDICE A – TESTES DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO	51
8. APÊNDICE B – TESTES DE CONCENTRAÇÃO DE <i>PRIMER</i> E <i>SONDA</i>	54
9. APÊNDICE C - TESTES DE TEMPO DE EXTENSÃO DA RT-PCR	55
10. APÊNDICE D – PREPARO E DILUIÇÃO DE PLASMÍDEOS	56
10.1 BCR-ABL P210/BCR-ABL P190	56
10.2 PML-RARA	57
10.3 CBFβ-MYH11	57
10.4 RUNX1-RUNX1T1	58
10.5 KMT2A-MLLT1	59

10.6 KMT2A-MLLT3.....	60
10.7 KMT2A-MLLT10.....	61
11. APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)...	62
12. APÊNDICE F - ETAPA DE EXTRAÇÃO DE LISE DE HEMÁCIAS	64
13. APÊNDICE G - PROTOCOLO DE PCR E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS).....	65
14. ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	67
15. ANEXO II - DNA PLASMIDIAL.....	68
15.1 BCR-ABL P210, P190 E P230	68
15.2 PML-RARA	68
15.3 CBFβ-MYH11	69
15.4 RUNX1-RUNX1T1	70
15.5 KMT2A-MLLT1	70
15.6 KMT2A-MLLT3.....	71
15.7 KMT2A-MLLT10.....	71
15.8 ABL1	72

1. INTRODUÇÃO

Quando a medula óssea, principal produtora das células hematopoiéticas, passa por uma alteração drástica com proliferação anormal das suas células-tronco pluripotentes, que não amadurecem e não respondem aos reguladores naturais e mecanismos apoptóticos, essa condição é conhecida como leucemia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma forma específica da doença que afeta a via mieloide e se caracteriza por um grupo heterogêneo de distúrbios clonais, levando à insuficiência funcional da medula óssea devido ao acúmulo de células imaturas (BRASIL, 2014).

A complexidade da LMA requer uma abordagem diagnóstica multifacetada em busca de definição diagnóstica precisa e classificação de risco adequada (DÖHNER et al., 2022). Testes diagnósticos abrangentes são cruciais não somente para estabelecer o tratamento inicial, mas também como orientação em estratégias ao longo do monitoramento da doença (DÖHNER et al., 2022). Além da imunofenotipagem por citometria de fluxo, a análise citogenética convencional é componente obrigatório da avaliação de indivíduos com LMA para identificação das anomalias genéticas características (DÖHNER et al., 2022).

Os testes genéticos moleculares desempenham papel vital na triagem, definição e caracterização de risco da LMA, sendo necessários para tratamentos direcionados (DÖHNER et al., 2022). A detecção molecular, seja por meio da metodologia de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real) ou pelo sequenciamento de nova geração (NGS), permite a identificação de concentrações muito baixas de blastos leucêmicos (DÖHNER et al., 2022). Isso ocorre porque as características fenotípicas geralmente são detectadas somente após a expansão clonal, enquanto as alterações genotípicas podem ser observadas mais precocemente (DÖHNER et al., 2022). As técnicas moleculares amplificam os ácidos nucleicos presentes na amostra, oferecendo uma alta precisão e sensibilidade quando comparadas aos ensaios imuno-hematológicos (DÖHNER et al., 2022).

Atualmente, além do exame de diagnóstico para LMA, foram desenvolvidas análises de outras alterações gênicas que influenciam o prognóstico, uma vez que constituem marcadores importantes para a escolha do tratamento. Esse aspecto é crítico, devido à necessidade de instituição rápida do tratamento adequado da LMA (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015). De acordo com Döhner et al. (2022), o protocolo para estabelecer o diagnóstico por meio da análise genética envolve a identificação de alguns rearranjos gênicos principais, como as fusões gênicas PML-RARA (t(15;17)), CBFβ-MYH11 (t(16;16)), RUNX1-RUNX1T1

(t(8;21)), rearranjos de KMT2A (t(9;11) e t(10;11)) e BCR-ABL (t(9;22)) e esses testes geralmente requerem um período de 3 a 5 dias para obtenção dos resultados.

A triagem para rearranjos gênicos deve ser realizada quando for necessário obter resultados rápidos para uma terapia apropriada, quando a morfologia cromossômica estiver comprometida e/ou a morfologia encontrar-se típica com anomalia citogenética suspeita indetectada (DÖHNER et al., 2022).

Essa abordagem é especialmente relevante, uma vez que, apesar da determinação pela Organização Mundial da Saúde de que a presença de pelo menos 20% de blastos leucêmicos no sangue periférico e/ou aspirado de medula óssea é um critério definitivo para o diagnóstico, rearranjos gênicos como CBFβ-MYH11, quando detectados, confirmam diagnóstico sem apresentar necessariamente a quantidade em percentual de blastos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Estudos mais recentes desenvolvidos por Gabert et al mostraram que o RNA mensageiro (mRNA) resultante da fusão gênica CBFβ-MYH11 representa um marcador molecular adequado para estudos de diagnóstico e acompanhamento (GABERT et al., 2003).

A possibilidade de avanço descontrolado da LMA requer avaliação diagnóstica e prognóstica céleres, e atualmente está disponível uma gama de testes baseados em fatores determinantes do desenvolvimento da leucemia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Destaca-se, ainda, que avaliações de risco irão determinar a necessidade de realizar transplantes, assim como orientar a terapia farmacológica a ser adotada, dentre outras medidas cruciais que impactam a sobrevida do paciente (SURAPALLY; TENEN; PULIKKAN, 2021; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

A identificação precoce da LMA e o rápido encaminhamento são cruciais para um melhor resultado terapêutico. Portanto, a implementação de métodos rápidos para a análise dos rearranjos gênicos é indispensável tanto para o diagnóstico quanto para o estabelecimento do prognóstico da doença. Além disso, esses métodos podem reduzir os custos da avaliação dos rearranjos gênicos, ampliando sua acessibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de método de análise das fusões PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, BCR-ABL (P210), BCR-ABL (P190), KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10 em simultâneo por reação de cadeia de polimerase em tempo real por transcrição reversa (RT-PCR), em amostras de medula óssea e/ou sangue periférico de sujeitos com LMA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Desenvolver a metodologia de RT-PCR em um painel diagnóstico para fusões gênicas de LMA;
- Comparar o método de sequenciamento de nova geração (NGS) com a metodologia implementada para comparabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade e acurácia do teste;

3. MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

Foram selecionados 11 sujeitos adultos, com idade igual ou superior a 21 anos, de ambos os sexos e com diagnóstico de leucemia mieloide aguda com base nos critérios diagnósticos da Organização Mundial da Saúde - OMS (SWERDLOW et al., 2017), independentemente da data do diagnóstico, acompanhados na Unidade de Hematologia do Hospital Universitário de Brasília entre dezembro de 2023 a agosto de 2024. Não houve critérios de exclusão. Foram selecionados, ainda, sujeitos sem diagnóstico de LMA, com características semelhantes (sexo e idade) àqueles com LMA, para compor o grupo de controle interno. As amostras fornecidas pelos participantes foram processadas no Laboratório Sabin Diagnóstico e Saúde, sendo assegurada a confidencialidade dos dados por meio da Lei geral de proteção de dados pessoais (LGPD) já disposto pelo próprio laboratório e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice E)

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS (CAAE 69557823.0.0000.0030, Anexo I). Os exames realizados seguiram rigidamente os preceitos éticos da Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes assinaram o TCLE.

3.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS

Foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea (10 amostras) e sangue venoso periférico (uma amostra), coletadas em tubos contendo EDTA, que apresentaram pelo menos 10% de blastos detectados anteriormente em imunofenotipagem. As amostras foram submetidas a um protocolo de lise de hemácias, sendo inicialmente homogeneizadas por 15 minutos em agitador orbital e depois transferidas 2,5 mL de material para um tubo cônico de 15 mL. Para a lise celular, foram adicionados 7,5 mL de solução de lise (*Cell Lysis Solution*, Promega). Depois disso, os tubos foram invertidos 5 a 6 vezes e em seguida incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação a $2.500 \times g$ por 10 minutos, a 20 °C, com a formação de *pellet* ao fundo. O sobrenadante foi descartado e realizada nova centrifugação, com os mesmos parâmetros anteriormente citados, por um minuto. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma mistura de 1-Thioglicerol/Solução de Homogeneização (*Homogenization Solution*, Promega) resfriada ao pellet então formado. A mistura resultante foi então homogeneizada em agitador vórtex para garantir a ressuspensão completa do pellet. Foram então adicionados 200 µL do tampão de lise (*Lysis Buffer*, Promega) e 25 µL de proteinase K e a mistura homogeneizada por 20 segundos em agitador vórtex. Ao final, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e realizada extração de RNA com a utilização o kit comercial **Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit** (Promega) em equipamento Maxwell® RSC, sendo ele uma plataforma automatizada e compacta para purificação de ácidos nucleicos, processando até 16 amostras simultaneamente em 25–60 minutos.

O uso de RNA para detecção de fusões na LMA é importante, apesar da abundância de RNA transportador (tRNA) e RNA mensageiro (mRNA) em células normais. Na LMA, a fusão de cromossomos pode gerar genes de fusão que produzem mRNAs híbridos os quais podem codificar proteínas de fusão com funções alteradas, contribuindo para a proliferação descontrolada das células leucêmicas e resistência à apoptose (ALBERTS, 2014). Embora o tRNA não seja diretamente afetado pela fusão cromossômica, alterações na expressão ou função dos tRNAs podem impactar a tradução das proteínas de fusão (ALBERTS, 2014). Portanto, na LMA, as alterações causadas pelas fusões cromossômicas afetam principalmente o mRNA e, conseqüentemente, a produção de proteínas, enquanto o tRNA desempenha um papel indiretamente influenciado na tradução dessas proteínas.

3.3 PRIMERS

A detecção das fusões gênicas propostas no estudo foi idealizada de maneira que apresentasse menor custo, menor tempo para execução, maior sensibilidade de detecção e sem prejuízos à rotina laboratorial. As fusões selecionadas para compor o multiplex simultâneo idealizado foram extraídas dos estudos de DÖHNER et al. (2022) e Meyer et al. (2023), que estabeleceram os translocados t(15;17), t(9;22), t(8;21), inv16 e/ou t(16;16) e os rearranjos de KMT2A t(9;11), t(10;11) e t(11;19) como de maior relevância e frequência clínica em adultos com LMA.

Definidas as fusões gênicas, foram selecionados os iniciadores (*primers*) para a PCR em tempo real. Alguns foram extraídos de estudos publicados previamente (GABERT et al., 2003; BURMEISTER et al., 2014) e outros reformulados e remodelados em BLAST (*Basic Local*

Alignment Search Tool) e pelo software *Geneious* (GENEIOUS, 2023). As sequências dos *primers* utilizados no estudo estão descritas na Tabela 1. É importante ressaltar que as fusões gênicas podem sofrer quebras em éxons diferentes e que para o modelo desenvolvido no presente estudo foram selecionados *primers* que apresentassem cobertura de pelo menos 90% das fusões observadas na LMA.

Para melhor desenvolvimento do preparo da reação de polimerase em cadeia, foram agrupadas 3 fusões por poço na placa de 96 poços, sendo os grupos:

- (1) BCR-ABL P210 - CFBF-MYH11 – KMT2A-MLLT1;
- (2) PML-RARA – ABL1 – KMT2A-MLLT10;
- (3) BCR-ABL P190 – RUNX1-RUNX1T1 – KMT2A-MLLT3.

Os grupos foram testados *in silico*, análise esta realizada com o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), tanto às suas temperaturas de anelamento, quanto auto-anelamento e anelamento entre *primers* para evitar falsos positivos na reação. As sondas de hidrólise para detecção do produto de amplificação foram preparadas em três filtros distintos com compensação colorimétrica para evitar a sobreposição de fluorescência. Os filtros utilizados foram: (1) 6-FAM, (2) HEX e (3) CY 5. Os fluoróforos foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e produzidos pela plataforma *Integrated DNA Technologies* (IDT, 2024). As sondas foram preparadas com dois tipos de *quencher*s: 6-FAM e HEX foram utilizados com ZEN e Iowa Black™ FQ, enquanto CY 5 foi combinado com TAO e Iowa Black™ RQ.

Tabela 1 - Primers e sondas para identificação dos rearranjos gênicos por reação de cadeia em polimerase em tempo real.

FUSÃO GÊNICA	NOME	SEQUÊNCIA	SENTIDO	REFERÊNCIA
CBFB-MYH11	CBFB_F45	CATTAGCACAAACAGGCCTTTGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	CBFB_PB	TCGCGTGTCTTCTCCGAGCCT	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R7	CTCTTTCTCCAGCGTCTGCTTAT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R8	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R12	AGGGCCCGCTTGGACTT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
BCR-ABL	BCR_F13	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	BCR_F1	CTGGCCCAACGATGGCGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL_PB	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL_R	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
KMT2A-MLLT	KMT2A_F9	TCCAGAGCAGAGCAAACAGA	FOWARD	(BURMEISTER et al., 2014)
	KMT2A_F11	TGTGGGAGATGGGAGGCTTA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho
	KMT2A_PB9	CTCCCCGCCCAAGTATCCCT	FOWARD	(BURMEISTER et al., 2014)
	KMT2A_PB11	TCTCTGTGCCAGTAGTGGGCA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho

	MLLT1_R2	AGCTCTAACCTCACCTGGACG	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT1_R6	GTGCTCCTTGGTCACCTTGT	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT1_R7	CTGAGCTGGAGTCTGAGCTG	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT3_R5	GCTGCTGGTATGAATACTCCTATTAG	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT3_R6	TCTGGGATGGTGTGAAGCTG	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT3_R10	CTGTGAAGCTCTACCAGTTCATCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R6	ACCAGTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R9	ACCAATGCAGGTGATGGTTCTGGCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R11	TGCTGATGACTGTTGGGAGTGAGAGT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R16	TGGTGCCTGACTGAGAGAAGATCCA	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
RUNX1-RUNX1T1	RUNX1_F5	CACCTACCACAGAGCCATCAAA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RUNX1_PB	AACCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RUNX1T1_R2	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
PML-RARA	PML_F4	TCTTCCTGCCCAACAGCAA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)

	PML_F4	CCCCAGGAAGGTCATCAAGA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho
	PML_F3	CCGATGGCTTCGACGAGTT	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RARA_PB	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RARA_R3	AGTGCCCAGCCCTCCCTCGC	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
ABL1	ABL1_F	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGG T	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL1_PB	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL1_R	CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)

Foram desenvolvidos *primers* que detectassem as quebras mais recorrentes nos éxons, enumerados no nome de cada *primer*/sonda, de cada fusão escolhida, com uma cobertura mínima acima de 90% dos casos de quebra de cromossomo em cada rearranjo. Todos foram submetidos a testes *in silico* e técnica de *SYBR green* para confirmação de especificidade de cada.

3.4 RT-PCR

A fácil degradação de amostras de RNA incentiva a busca de reagentes que ofereçam melhorias em especificidade, sensibilidade, velocidade e segurança do processo. O reagente QuantiNova Probe RT-PCR Kit (Qiagen) foi selecionado para este método por possuir um mecanismo de *hot-start* em duas fases que permite não somente a rotina em *one step*, mas também elimina variáveis e previne artefatos, garantindo confiabilidade da amplificação do material genético. Não obstante, esse mesmo reagente possui DNase em sua composição, tornando a possibilidade de contaminação por DNA seja reduzido.

A temperatura de anelamento, concentração dos diferentes *primers* e sondas e tempo de extensão foram padronizados e os testes de padronização encontram-se descritos nos Apêndices A, B e C, respectivamente. Os testes da PCR em tempo real para detecção das diferentes fusões foram realizados com DNA plasmidial (ThermoFisher) e estão descritos no Anexo II e Apêndice D. Para esta reação foram definidos 10 μL de QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix 2X, 0,2 μL de enzima QuantiNova Probe RT Mix, 1,8 μL de água RNase-Free e 1 μL de cada *primer*-time (3 ao total por preparo), com concentrações finais de 0,5 μM de *primer* e 0,25 μM de sonda. Para a quantidade de DNA plasmidial e RNA utilizada por amostra foi definido em 5 μL e o volume final de reação 20 μL . As reações foram realizadas em duplicata.

A PCR foi conduzida no equipamento LightCycler-® 480 Instrument II com uma etapa de 10 minutos a 45°C para transcrição reversa, 5 minutos a 95°C para iniciação de etapa de ativação da PCR, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 65°C por 30 segundos.

3.5 NGS

Na etapa de sequenciamento de nova geração (NGS), após a extração de RNA descrita no item 4.2, as etapas subsequentes seguem o protocolo do kit *AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel* (Illumina). Foi necessário realizar uma limpeza do material com DNase, passo fundamental para maximizar a qualidade das amostras para o sequenciamento. Nessa etapa, foram utilizados 2 μL de 10X DNase Buffer com MgCl_2 , 2 μL de DNase I, RNase Free (Illumina) e 16 μL do eluído de RNA a uma concentração de 15 ng/ μL , totalizando um volume final de 20 μL . O preparo foi incubado por 30 minutos a 37°C. Após a conclusão desta etapa, foram adicionados 2 μL de EDTA a uma concentração de 50 mM ou 4 μL em concentração de

25 mM, seguido por uma etapa de inativação a 65°C por 10 minutos no termociclador VeritiPro (ThermoFisher).

Após a limpeza, a síntese de cDNA utilizando o RNA extraído e livre de DNA como molde a próxima etapa, essencial para a amplificação adequada do material, utilizando o kit comercial (Illumina). Nesta etapa, utilizou-se 1 µL de 5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix, 0,5 µL de 10X AmpliSeq RT Enzyme Mix e 3,5 µL do eluído de RNA purificado, totalizando volume de reação de 5 µL. O material foi incubado a 42°C por 30 minutos, e seguiu-se inativação a 85°C por 5 minutos, e incubação a 10°C por 16 horas em termociclador VeritiPro (ThermoFisher) ou foi congelamento para uso posterior.

Com a obtenção do cDNA, foi realizado painel genético para a detecção de fusões gênicas associadas à LMA. Para isso, foi utilizado o kit comercial AmpliSeq Mieloide RNA Panel (Illumina), que permite analisar a presença ou ausência de mais de 500 fusões. As reações realizadas seguiram os protocolos estabelecidos pelo kit mencionado. Após a obtenção do amplificado, foram adicionados 2 µL de reagente FUPA (*Full-Length Ultra Pure Assay*) e, após adição, o material amplificado foi incubado a 55°C por 10 minutos e, posteriormente, a 62°C por 20 minutos em equipamento VeritiPro (ThermoFisher).

Para a separação das amostras por bioinformática, realizou-se uma etapa de indexação após retirar as amostras da etapa anterior. Adicionaram-se ao amplificado 4 µL de *Switch Solution*, 2 µL de AmpliSeq CD Indexes ou UD Indexes for Illumina e 2 µL de DNA Ligase. A mistura resultante foi submetida à incubação a 22°C por 30 minutos, seguida de 68°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos. Foram necessárias duas limpezas com *beads* magnéticas após a obtenção final do eluído, pois o tamanho de material exato deve ser selecionado antes do sequenciamento.

A primeira limpeza iniciou-se com a adição de 30 µL de Kapa *pure beads*, em temperatura ambiente, em cada biblioteca. Após vortexar e centrifugar, as amostras foram incubadas por 5 minutos. As amostras foram colocadas em estantes magnéticas e aguardou-se 2 minutos para a separação de fase. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol (ETOH 80%), incubando-se por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado novamente e foi adicionado 150 µL de etanol a 80%, incubando-se por mais 30 segundos. Esta etapa foi realizada com os tubos em estante magnética. Após remover o sobrenadante, aguardou-se a secagem por 10 minutos com o tubo aberto. Após isso, realizou-se uma etapa de amplificação para garantir sequências suficientes, utilizando 45 µL de 1X Lib Amp Mix e 5 µL de 10X Library Amp *Primers*, incubados a 98°C por 2 minutos, seguidos de 7 ciclos de anelamento e extensão a 98°C por 15 segundos e 64°C por 1 minuto.

A segunda limpeza foi realizada com a adição de 25 μ L de Kapa *pure beads*, que foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, depois vortexada por 5 segundos e, posteriormente, centrifugada por 5 segundos. A fase de separação nesta limpeza durou 5 minutos em estante magnética e o sobrenadante foi transferido para uma placa de PCR de 96 poços. Adicionaram-se 60 μ L de Kapa *pure beads* e repetiu-se o processo de agitação em vórtex, centrifugação, incubação e separação em estante magnética. Realizou-se a mesma lavagem com etanol citada na limpeza anterior e aguardou-se a secagem por 5 minutos. Depois disso, adicionaram-se 30 μ L de low-TE Buffer, agitou-se a amostra em vórtex e ela foi centrifugada por 5 segundos.

As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza determinadas em *Qubit Fluorometric Quantification* (ThermoFisher) e diluídas para uma concentração de 2 nM. Preparou-se um *pool* de amostras contendo 10 μ L de cada biblioteca em um único poço de strip 8 poços, conforme o protocolo desenvolvido pela Illumina para utilizar o MiSeq (ILLUMINA, 2019). Após 26 horas de sequenciamento, os resultados foram processados no Basespace (Illumina) e os arquivos brutos utilizados na plataforma *Franklin Genoox* (FRANKLIN GENOOX, 2024), sistema de inteligência artificial e análise de dados para a genômica e a medicina personalizada. Todas as etapas descritas foram protocoladas e desenvolvidas pela Illumina e aplicadas neste estudo.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, PRECISÃO, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA RT-PCR EM TEMPO REAL

Para o desenvolvimento do método de RT-PCR, alguns parâmetros são essenciais e confirmatórios do seu desempenho. Nas reações desenvolvidas, foram utilizados controles positivos de plasmídeos sintetizados de forma artificial em diluição 1:1000, um controle negativo padrão de diluição 1:1000 do plasmídeo do controle endógeno ABL1 e o "*no template control*" (controle sem template), utilizado para identificar possíveis contaminações na reação.

Os resultados do método desenvolvido de RT-PCR em tempo real foram comparados com os resultados do NGS para determinação da acurácia do primeiro. A acurácia avalia a proximidade dos resultados obtidos de um teste em relação aos valores verdadeiros ou à referência padrão, e foi calculada como a proporção de resultados da RT-PCR em tempo real compatíveis com os resultados do NGS, incluindo verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, em relação ao total de testes realizados.

A precisão, que se refere à capacidade de um teste fornecer resultados consistentes e

reprodutíveis quando realizados sob as mesmas condições, foi avaliada por meio da condução da RT-PCR em tempo real em dias alternados e com operadores diferentes para verificar a reprodutibilidade e múltiplas repetições no mesmo dia para avaliar a repetibilidade. As amostras obtidas não contemplavam todos os alvos avaliados, portanto foram utilizadas amostras reais e DNA plasmidial dos alvos faltantes (fusões que não foram detectadas nos pacientes incluídos).

O limite de detecção das fusões investigadas, para determinar a sensibilidade do método, foi estabelecido através de diluições de 1:1000, 1:100, 1:10 e 1:2 de plasmídeos sintéticos, descritos no apêndice D, contendo a sequência das fusões alvo, a partir de concentração inicial de 50 ng/μL. Os plasmídeos utilizados foram construídos de forma comercial como consta em Anexo II. O uso de plasmídeos sintéticos, em conformação circular, pode interferir no limite de detecção, uma vez que seu formato demanda, em alguns momentos, mais energia para desnaturação para possível anelamento dos primers.

A especificidade dos *primers* para detecção das fusões gênicas investigadas foi avaliada por meio de uma abordagem integrada de análise *in silico*, utilizando BLAST, e validação experimental por meio da temperatura de dissociação (*melting*) em SYBR Green (Roche) do produto de amplificação, etapas cruciais para confirmar a especificidade dos *primers* e sondas utilizados. Um teste complementar foi realizado com eluidos de extração de DNA para confirmação da especificidade dos primers seguindo os mesmos padrões determinados na RT-PCR.

Para os testes de SYBR Green foi utilizado o kit *LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master LSR* (Roche) com 10 μL Master Mix 2X, 2 μL do conjunto de *primers forward* e *reverse* a 10 μM e 3 μL de água RNase-Free. A PCR foi composta de uma etapa de pré-incubação a 95°C por 5 minutos, amplificação de 40 ciclos por 95°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, curva de *melting* por 95°C por 5 segundos, 65°C por 1 minuto e 97°C contínuo com aquisição de 5°C por grau.

4. CAPÍTULO 1

4.1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma condição grave caracterizada pela proliferação descontrolada de células-tronco pluripotentes na medula óssea, que não amadurecem adequadamente. Esta forma específica de leucemia afeta a via mieloide, resultando no acúmulo de células imaturas que comprometem a função normal da medula óssea (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; BRASIL, 2014). O diagnóstico e classificação de risco da LMA são complexos e requerem uma abordagem multifacetada, utilizando técnicas como imunofenotipagem por citometria de fluxo e análise citogenética convencional (DÖHNER et al., 2022). Além disso, os testes genéticos moleculares desempenham um papel crucial na identificação de alterações genéticas específicas, como fusões gênicas e rearranjos, que são essenciais para orientar o tratamento e prognóstico da doença (DÖHNER et al., 2022).

A análise genética é fundamental não apenas para confirmar o diagnóstico de LMA, mas também para determinar a presença de rearranjos gênicos específicos, como PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, entre outros, que têm implicações diretas no plano terapêutico (DÖHNER et al., 2022; Gabert et al., 2003). Estes testes, que incluem reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real e sequenciamento de nova geração, são altamente sensíveis e permitem a detecção precoce de blastos leucêmicos, antes mesmo de manifestações fenotípicas evidentes (DÖHNER et al., 2022). A rapidez na obtenção dos resultados desses exames é crucial para orientar decisões terapêuticas urgentes, como transplantes de células-tronco hematopoiéticas, influenciando diretamente a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; SURAPALLY; TENEN; PULIKKAN, 2021).

Dessa forma, a análise detalhada dos rearranjos gênicos na LMA não apenas confirma o diagnóstico da doença, mas também define o prognóstico inicial do paciente, orientando escolhas terapêuticas críticas desde os estágios iniciais da doença. Essa abordagem não só contribui para a eficácia do tratamento, mas também representa um avanço significativo na medicina personalizada voltada para o câncer hematológico (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi de desenvolver métodos de detecção simultânea de fusões gênicas observadas na LMA, que influenciam seu prognóstico, como forma de propor método célere de sua identificação na prática clínica.

4.2 MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (CAAE 69557823.0.0000.0030, Anexo I), e o recrutamento e a participação dos sujeitos do estudo seguiram rigorosos protocolos éticos descritos na Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Foi assegurada a confidencialidade dos dados conforme a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD) e mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram incluídos sujeitos com idade igual ou superior a 21 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de LMA com base nos critérios diagnósticos segundo OMS (SWERDLOW et al., 2017), que concordaram em participar do estudo. Não houve critérios de exclusão. Os sujeitos foram recrutados na Unidade de Hematologia do Hospital Universitário de Brasília.

Foram coletados 3 mL de aspirado de medula óssea de 10 amostras e 4 mL de sangue periférico de uma amostra, com os materiais biológicos em tubos contendo EDTA. As amostras foram submetidas a procedimento para lise de hemácias, descrito em (Apêndice F), seguido de extração de RNA leucocitário com a utilização de kit comercial (Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit, Promega). A concentração e pureza do RNA foram determinadas por *Qubit Fluorometric Quantification* (ThermoFisher).

Para detecção das fusões gênicas relevantes para o diagnóstico/prognóstico de LMA por PCR em tempo real, foram utilizados *primers* cujas sequências foram obtidas a partir de estudos previamente publicados, ajustados para cobrir as principais translocações e rearranjos genéticos descritos na literatura. Alguns *primers* foram reformulados utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e o software Geneious (GENEIOUS, 2023), conforme descrito na Tabela 1. A escolha e desenvolvimento dos *primers* visaram cobrir, pelo menos, 90% das fusões gênicas encontradas na Leucemia Mieloide Aguda (LMA), considerando que fusões gênicas podem ocorrer em éxons diferentes.

Os *primers* foram organizados em três grupos para que cada grupo compusesse uma reação de PCR na placa de 96 poços: (1) BCR-ABL P210, CBFβ-MYH11 e KMT2A-MLLT1; (2) PML-RARA, ABL1 e KMT2A-MLLT10; e (3) BCR-ABL P190, RUNX1-RUNX1T1 e KMT2A-MLLT3. Testaram-se *in silico* as temperaturas de anelamento, auto-anelamento e anelamento entre *primers*, utilizando o software IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES – IDT, 2024) e ThermoFisher (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2024) para evitar falsos positivos. Para detecção do produto de amplificação, prepararam-se sondas de hidrólise com filtros colorimétricos distintos para evitar a sobreposição de fluorescência, utilizando: (1) 6-

FAM, (2) HEX e (3) CY 5. Os fluoróforos foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e produzidos pela *Integrated DNA Technologies* (IDT, 2024). As sondas foram preparadas com dois tipos de *quencher*s: 6-FAM e HEX com ZEN e Iowa Black™ FQ, e CY 5 com TAO e Iowa Black™ RQ. As reações foram conduzidas em duplicatas.

Tabela 1 - Primers e sondas para identificação dos rearranjos gênicos por reação de cadeia em polimerase em tempo real.

FUSÃO GÊNICA	NOME	SEQUÊNCIA	SENTIDO	REFERÊNCIA
CBFB-MYH11	CBFB_F45	CATTAGCACAAACAGGCCTTTGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	CBFB_PB	TCGCGTGTCTTCTCCGAGCCT	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R7	CTCTTTCTCCAGCGTCTGCTTAT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R8	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
	MYH11_R12	AGGGCCCGCTTGGACTT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
BCR-ABL	BCR_F13	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	BCR_F1	CTGGCCCAACGATGGCGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL_PB	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL_R	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
KMT2A-MLLT	KMT2A_F9	TCCAGAGCAGAGCAAACAGA	FOWARD	(BURMEISTER et al., 2014)
	KMT2A_F11	TGTGGGAGATGGGAGGCTTA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho
	KMT2A_PB9	CTCCCCGCCCAAGTATCCCT	FOWARD	(BURMEISTER et al., 2014)
	KMT2A_PB11	TCTCTGTGCCAGTAGTGGGCA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho

	MLLT1_R2	AGCTCTAACCTCACCTGGACG	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT1_R6	GTGCTCCTTGGTCACCTTGT	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT1_R7	CTGAGCTGGAGTCTGAGCTG	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT3_R5	GCTGCTGGTATGAATACTCCTATTAG	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT3_R6	TCTGGGATGGTGTGAAGCTG	REVERSE	Desenvolvido neste trabalho
	MLLT3_R10	CTGTGAAGCTCTACCAGTTCATCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R6	ACCAGTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R9	ACCAATGCAGGTGATGGTTCTGGCT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R11	TGCTGATGACTGTTGGGAGTGAGAGT	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
	MLLT10_R16	TGGTGCCTGACTGAGAGAAGATCCA	REVERSE	(BURMEISTER et al., 2014)
RUNX1-RUNX1T1	RUNX1_F5	CACCTACCACAGAGCCATCAAA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RUNX1_PB	AACCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RUNX1T1_R2	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
PML-RARA	PML_F4	TCTTCCTGCCCAACAGCAA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)

	PML_F4	CCCCAGGAAGGTCATCAAGA	FOWARD	Desenvolvido neste trabalho
	PML_F3	CCGATGGCTTCGACGAGTT	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RARA_PB	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	RARA_R3	AGTGCCAGCCCTCCCTCGC	REVERSE	(GABERT et al., 2003)
ABL1	ABL1_F	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGG T	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL1_PB	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	FOWARD	(GABERT et al., 2003)
	ABL1_R	CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT	REVERSE	(GABERT et al., 2003)

Foram desenvolvidos *primers* que detectassem as quebras mais recorrentes nos éxons, enumerados no nome de cada *primer*/sonda, de cada fusão escolhida, com uma cobertura mínima acima de 90% dos casos de quebra de cromossomo em cada rearranjo. Todos foram submetidos a testes *in silico* e técnica de *SYBR green* para confirmação de especificidade de cada.

Para a PCR, foram utilizados 10 μL de QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix 2X (Qiagen), 0,2 μL de enzima QuantiNova Probe RT Mix, 1,8 μL de água RNase-Free e 1 μL de cada *PrimeTime*, estes preparados sempre com 10 μM de cada *primer* e com 5 μM de sonda (todos descritos na tabela 1), de acordo com seu translocado, para um volume final de 100 μL completados com água RNase-Free, atingindo assim concentrações finais de 0,5 μM para *primers* e 0,25 μM para sondas na reação em questão. Cada conjunto de reação levou 3 *PrimeTime*, sendo os grupos: sendo os grupos:

- (1) BCR-ABL P210 - CFBF-MYH11 – KMT2A-MLLT1;
- (2) PML-RARA – ABL1 – KMT2A-MLLT10;
- (3) BCR-ABL P190 – RUNX1-RUNX1T1 – KMT2A-MLLT3.

A quantidade de RNA utilizada por amostra foi de 5 μL , uma média de 150ng/ μL , resultando em um volume final de reação de 20 μL .

Após testes com diferentes temperaturas de extensão (60°C, 62,5°C e 65°C), concentrações de sonda (0,25 μM e 0,5 μM) e *primers* (0,25 μM , 0,5 μM e 0,8 μM), além de tempos de anelamento variados (30 segundos, 60 segundos e 1 minuto e 30 segundos), todas as PCR foram reproduzidas no equipamento *LightCycler® 480 Instrument II* (Roche Diagnostics). A reação foi padronizada com uma etapa inicial de 10 minutos a 45°C para transcrição reversa, seguida por 5 minutos a 95°C para ativação da PCR, desnaturação a 95°C por 5 segundos e anelamento e extensão a 65°C por 30 segundos durante 40 ciclos.

O protocolo utilizado para a confirmação de resultado por meio de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) encontra-se descrito no Apêndice G. A etapa de extração foi a mesma para ambas as técnicas utilizadas.

Os resultados do método de RT-PCR em tempo real foram comparados com NGS, para detectar a acurácia da PCR. Foram determinadas também a precisão, sensibilidade e especificidade da RT-PCR em tempo real para detectar as fusões investigadas. A acurácia foi calculada como a proporção de resultados de RT-PCR em tempo real compatíveis com os resultados do NGS, incluindo verdadeiros positivos e negativos, em relação ao total de testes realizados com o método de RT-PCR em tempo real. A precisão foi avaliada pela consistência e reprodutibilidade dos resultados, com testes realizados em dias alternados e com diferentes operadores para verificar a reprodutibilidade, além de múltiplas repetições no mesmo dia para testar a repetibilidade, utilizando amostras de voluntários para as fusões PML-RARA, CFBF-MYH11 e RUNX1-RUNX1T1 e de DNA plasmidial contendo a sequência das fusões BCR-ABL P210, BCR-ABL P190, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10 para cobrir todos os alvos avaliados.

O limite de detecção foi estabelecido com diluições de plasmídeos sintéticos (1:1000, 1:100, 1:10 e 1:2) para cada um dos alvos BCR-ABL P210, BCR-ABL P190, PML-RARA, CBFβ-MYH11 e RUNX1-RUNX1T1, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10, começando com uma concentração inicial de 50 ng/μL, para avaliar a sensibilidade do método. Os plasmídeos utilizados foram construídos de forma comercial como consta em Anexo II.

A especificidade dos *primers* se fez por validação experimental por meio da temperatura de *melting* em SYBR Green (Roche), de acordo com o protocolo do kit *LightCycler® 480 SYBR Green I Master LSR* (Roche) com 10 μL Master Mix 2X, 2 μL do conjunto de *primers forward* e *reverse* a 10 μM e 3 μL de água RNase-Free. A PCR foi composta de uma etapa de pré-incubação a 95°C por 5 minutos, amplificação de 40 ciclos por 95°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, curva de *melting* por 95°C por 5 segundos, 65°C por 1 minuto e 97°C contínuo com aquisição de 5°C por grau. Por complementaridade do teste de especificidade foi cuidadosamente avaliada por análise *in silico* utilizando BLAST. Testes complementares com eluído de material genético de DNA para confirmação de especificidade dos conjuntos de primers e a ausência de interferências de DNAses.

4.3 RESULTADOS

Entre dezembro de 2023 e agosto de 2024, onze voluntários elegíveis, todos adultos com idade igual ou superior a 21 anos e com diagnóstico de LMA, concordaram em participar do estudo e foram incluídos.

4.3.1 ACURÁCIA

A análise de fusões gênicas por PCR em tempo real no presente estudo apresentou acurácia de 100% (11/11) nas amostras estudadas, quando seus resultados foram contrastados com os obtidos por sequenciamento de nova geração (NGS), conforme descrito na Tabela 2 e representado na Figura 1. Esse nível de acurácia atesta a eficácia e a confiabilidade do teste desenvolvido na identificação precisa das fusões gênicas, indicando sua robustez.

Tabela 2 - Resultado da análise das amostras obtidas.

AMOSTRAS	IDADE		SEXO	RESULTADO	RESULTADO	CONCORDÂNCIA
				OBTIDO RT-PCR	ESPERADO NGS	
PMO_001	30/01/1991	33 anos	F	(+)PML-RARA	(+)PML-RARA	POSITIVA
PMO_002	02/11/1993	30 anos	M	(+)CBFB-MYH11	(+)CBFB-MYH11	POSITIVA
PMO_003	01/03/1972	52 anos	F	(+)CBFB-MYH11	(+)CBFB-MYH11	POSITIVA
PMO_004	13/05/1980	44 anos	F	(+)CBFB-MYH11	(+)CBFB-MYH11	POSITIVA
PMO_005	03/11/1977	46 anos	F	(+)RUNX1-RUNX1T1	(+)RUNX1-RUNX1T1	POSITIVA
PMO_006	17/09/1973	50 anos	M	(+)RUNX1-RUNX1T1	(+)RUNX1-RUNX1T1	POSITIVA
PMO_007	30/11/1973	50 anos	M	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA
PMO_008	09/10/1995	28 anos	F	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA
PMO_009	23/12/1980	43 anos	F	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA
PMO_010	13/04/1967	57 anos	F	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA
PSP_011	09/10/1969	54 anos	M	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA

Resultado da análise das fusões gênicas por PCR em tempo real e sequenciamento de nova geração, em amostras de medula óssea de sujeitos com leucemia mieloide aguda. Nota: PMO - Paciente de medula óssea; PSP - paciente de sangue periférico; F – feminino; M – masculino.

As amostras analisadas não revelaram resultados positivos para as fusões BCR-ABL (P210), BCR-ABL (P190), KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10. Pacientes positivos não apresentaram resultados positivos para outras fusões. A maior frequência foi o sexo feminino com 63,6% (7/11) e as idades foram distribuídas de acordo com as décadas, sendo mais frequente aos 50 anos com 45,4% (5/11).

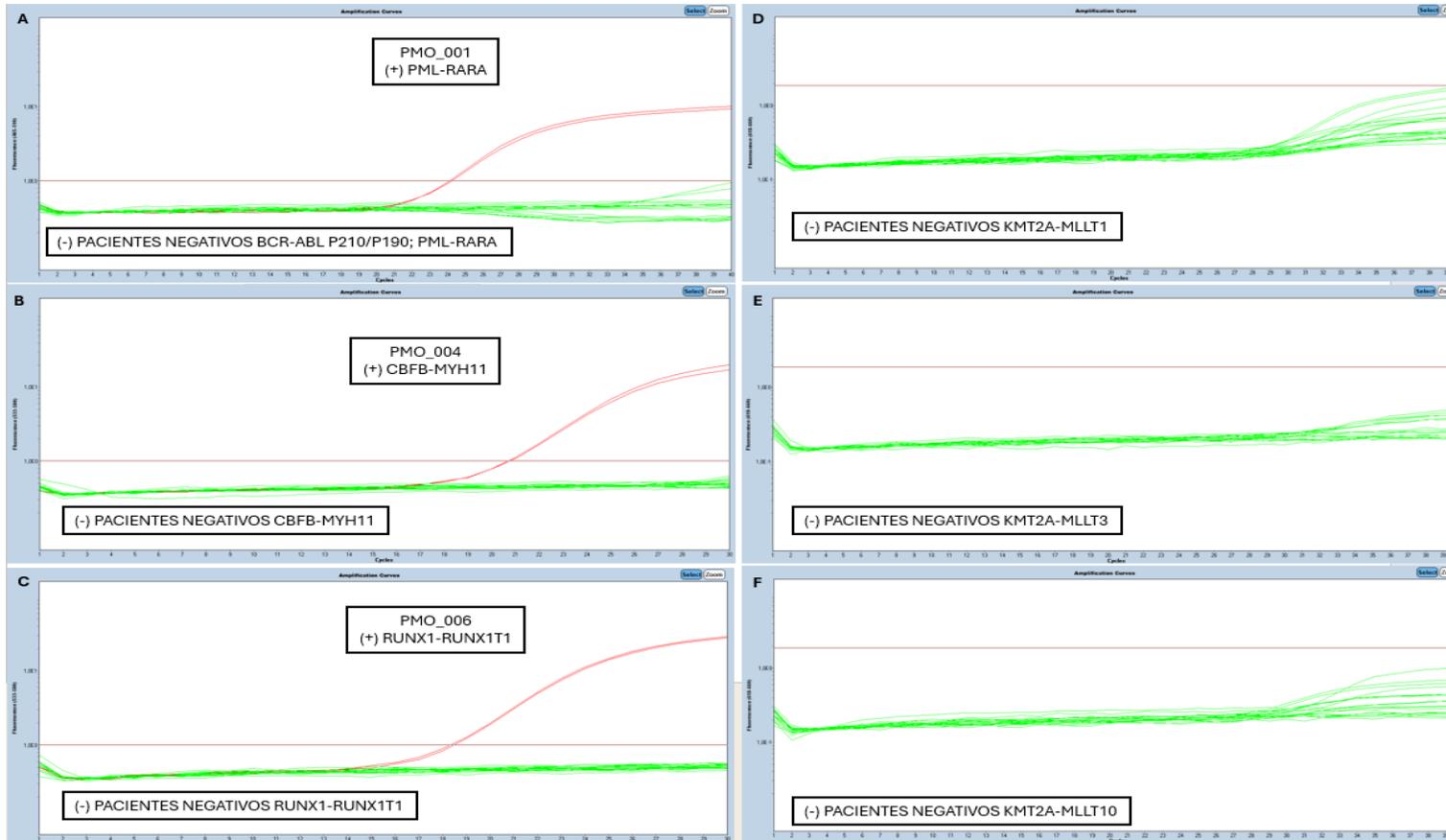


Figura 1 – Curvas de amplificação obtidas com as reações de RT-PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas. (A) Curva de amplificação de amostra positiva para a fusão PML-RARA (PMO_001, em vermelho), com Cq médio de 24,2 para a fusão PML-RARA; as curvas verdes representam amostras negativas, que não apresentaram amplificação; (B) Curva de amplificação de amostra positiva para a fusão CBFβ-MYH11 (PMO_004, em vermelho), com Cq médio de 20,8; as curvas verdes representam amostras negativas, que não apresentaram amplificação; (C) Curva de amplificação de amostra positiva para a fusão RUNX1-RUNX1T1 (PMO_006, em vermelho) com Cq médio foi 18,5; as amostras verdes representam amostras negativas, que não apresentaram amplificação; (D) Resultados negativos para os rearranjos de KMT2A-MLLT1 (curvas em verde indicam que não houve amplificação); (E) Resultados negativos para os rearranjos de KMT2A-MLLT3; (D) Resultados negativos para os rearranjos de KMT2A-MLLT10. Para as análises foram utilizados *color compensation* entre FAM e HEX devido ao risco de transferência de fluorescência por possuírem comprimento de onda sobrepostos. A PCR foi determinada em ciclagem de 40, no entanto as fusões cromossômicas CBFβ-MYH11 e KMT2A-MLLT1 são analisadas com um cut-off de 30 ciclos, devido a atividade do primer de se tornar inespecífico após essa ciclagem. Em vermelho estão os amplificados positivos e em verde as amplificações negativas.

4.3.2 PRECISÃO

Para avaliação da reprodutibilidade, foram utilizadas as amostras PMO_001, PMO_003, PMO_005, provenientes de pacientes em que foram detectadas fusões gênicas PML-RARA, CBFβ-MYH11 E RUNX1-RUNX1T1 respectivamente. Para avaliar a precisão da RT-PCR em tempo real das fusões que não foram observadas nos pacientes incluídos, BCR-ABL e rearranjos de KMT2A, foram utilizadas diluições de DNA plasmidial contendo as sequências das fusões nas seguintes concentrações: 3.959.237,2 cópias/reação BCR-ABL P210 e P190; 15.389.727.265,6 cópias/reação KMT2A-MLLT1; 1.988.1148,9 cópias/reação KMT2A-MLLT3; 12.254.782,3 cópias/reação KMT2A-MLLT10.

Um segundo teste de repetibilidade foi realizado para valores de concentrações mais próximas ao limite de detecção do método, ponto de decisão clínico. Para este teste utilizou-se somente as diluições de DNA plasmidial para as fusões PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL e rearranjos de KMT2A nas seguintes concentrações: 494,9 cópias/reação BCR-ABL P210 e P190; 579,1 cópias/reação PML-RARA; 304,8 cópias/reação CBFβ-MYH11; 541,2 cópias/reação RUNX1-RUNX1T1; 192,4 cópias/reação KMT2A-MLLT1; 248,5 cópias/reação KMT2A-MLLT3; 1531,9 cópias/reação KMT2A-MLLT10.

O teste de reprodutibilidade foi realizado em três dias alternados, com operadores diferentes. Foi observada consistência no resultado obtido, amplificando os alvos testados. O teste de repetibilidade foi realizado também no mesmo dia, por três vezes. Os resultados estão apresentados na Figura 2. Os valores de C_q estão comparados na tabela 3.

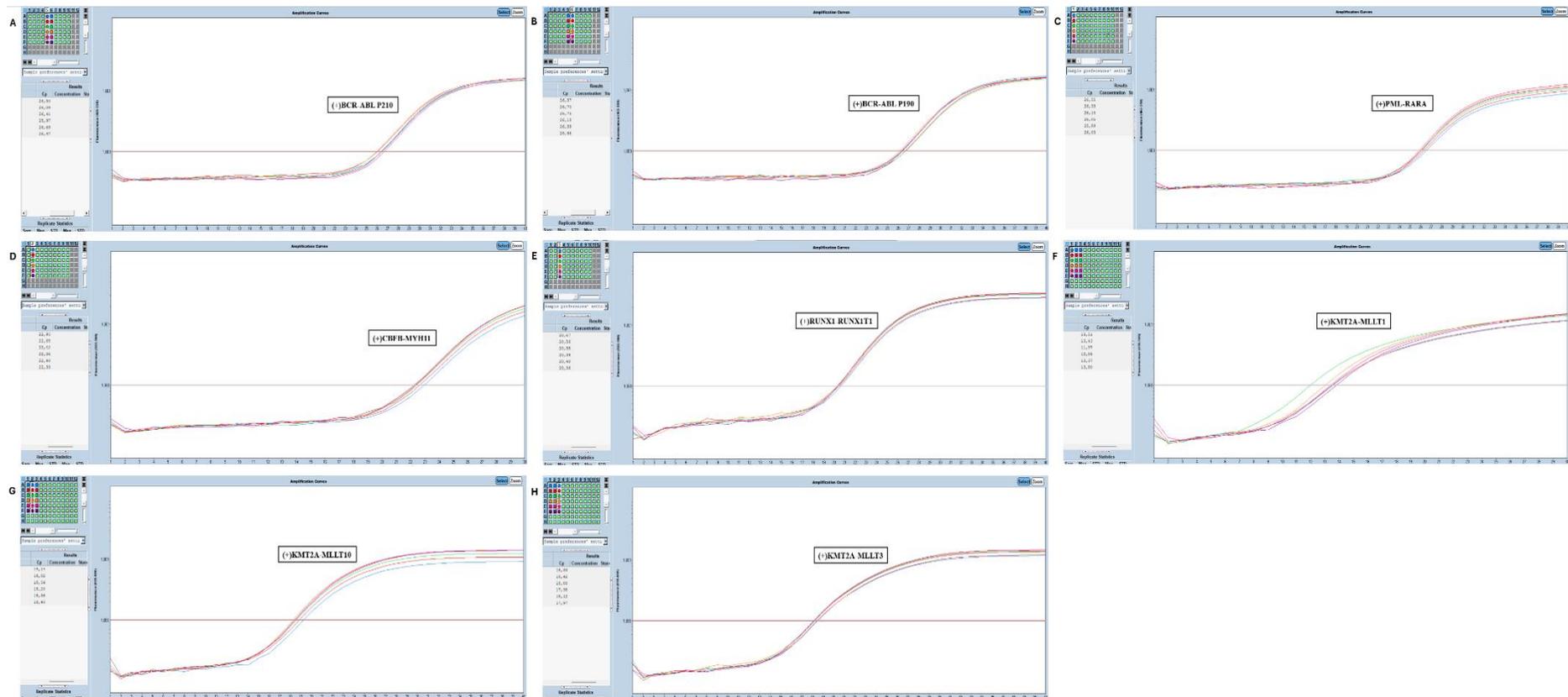


Figura 2 - Repetibilidade do teste com 6 ampliações para cada alvo. Em figura é possível ver a repetibilidade de 6 ampliações, 3 repetições das duplicatas, em cada uma das fusões testadas. Para as fusões (A)BCR-ABL P210, (B)BCR-ABL P190, (F)KMT2A-MLLT1, (G)KMT2A-MLLT3 e (H)KMT2A-MLLT10 utilizou DNA plasmidial para confirmar a confiabilidade do teste. Para as fusões (C)PML-RARA, (D)CBFB-MYH11 e (E)RUNX1-RUNX1T1 utilizou as amostras PMO_001, PMO_003, PMO_005, respectivamente. Para a análise foram utilizados *color compensation* entre FAM e HEX e as fusões cromossômicas CBFB-MYH11 e KMT2A-MLLT1 foram analisadas com um *cut-off* de 30 ciclos. O painel à esquerda representa a configuração da placa de PCR (96) poços, em que as amostras coloridas indicam cada replicata que tiveram as curvas representadas. Abaixo estão os Cq's de cada uma das curvas amplificadas.

Tabela 3 - Resultados de Cq dos testes de reprodutibilidade e repetibilidade.

TESTE	AMOSTRA	ALVOS			MÉDIA	DESVIO PADRÃO
INTRA-ENSAIO	PLASMÍDEO	BCR-ABL P210			26,355	0,271274768
		REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3		
		26,5 26,09	26,41 25,97	26,69 26,47		
	PLASMÍDEO	BCR-ABL P190			26,475	0,215290501
		REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3		
		26,37 26,7	26,75 26,18	26,39 26,46		
	PMO_001	PML-RARA			26,165	0,237970586
		REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3		
		26,55 26,33	26,14 26,05	25,89 26,03		
	PMO_003	CBFB-MYH11			22,51833333	0,239951384
		REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3		
		22,95 22,65	22,42 22,36	22,4 22,33		
PMO_005	RUNX1-RUNX1T1			20,465	0,130499042	
	REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3			
	20,67 20,56	20,38 20,34	20,48 20,36			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT1			13,155	0,657442013	
	REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3			
	13,51 13,43	11,97 12,85	13,37 13,8			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT3			18,15	0,18568791	
	REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3			
	18,33 18,42	18,08 17,98	18,12 17,97			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT10			18,57666667	0,345813052	
	REPLICATA 1	REPLICATA 2	REPLICATA 3			
	19,14 18,82	18,54 18,2	18,36 18,4			
INTER-ENSAIO	PLASMÍDEO	BCR-ABL P210			24,82833333	3,47035685
		DIA 1	DIA 2	DIA 3		
		27,35 28,13	26,5 26,09	20,11 20,79		
	PLASMÍDEO	BCR-ABL P190			24,83333333	3,238732262
		DIA 1	DIA 2	DIA 3		
		26,73 27,8	26,37 26,7	20,57 20,83		
	PMO_001	PML-RARA			25,44	1,022506724
		DIA 1	DIA 2	DIA 3		
		24,27 24,13	26,55 26,33	25,72 25,64		
	PMO_003	CBFB-MYH11			22,04666667	0,988466826
		DIA 1	DIA 2	DIA 3		
		20,82 20,75	22,95 22,65	22,59 22,52		
PMO_005	RUNX1-RUNX1T1			19,71666667	0,997911152	
	DIA 1	DIA 2	DIA 3			
	18,53 18,42	20,67 20,56	20,19 19,93			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT1			20,49	3,883441772	
	DIA 1	DIA 2	DIA 3			
	18,27 18,02	25,25 25,74	17,78 17,88			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT3			19,41166667	2,343223563	
	DIA 1	DIA 2	DIA 3			
	17,93 18,04	22,18 22,67	17,65 18			
PLASMÍDEO	KMT2A-MLLT10			21,165	2,99753065	
	DIA 1	DIA 2	DIA 3			
	19,2 19,7	25,14 24,9	19,09 18,96			

Resultado dos Cq's com valores médios e desvio padrão calculado. Apesar da variação de valores dentro do desvio padrão calculado, o objetivo do teste está em resultados qualitativos, o qual apresentou reprodução e precisão necessárias ao desejado.

4.3.3 SENSIBILIDADE

Os testes de sensibilidade seguiram os passos descritos nos Apêndice D. Os plasmídeos foram preparados sem amostra negativa, apenas diluídos em água livre de RNAs. As diluições iniciais, presentes na Figura 3, não permitiram determinar a sensibilidade, de modo que foram conduzidas reações com diluições adicionais para determinar o limite de detecção do método, especificadas no Apêndice D. Foram determinados os limites de detecção para cada alvo, a partir da reação de amplificação conduzida em concentrações decrescentes, até a diluição de $1,25E-09$ vez, equivalente a um valor médio de cópias por reação (cp/rxn) de acordo com cada fusão:

- (1) BCR-ABL P210 e BCR-ABL P190: 494,9 cp/rxn;
- (2) PML-RARA: 579,1 cp/rxn;
- (3) CBFβ-MYH11: 304,8 cp/rxn;
- (4) RUNX1-RUNX1T1: 541,2 cp/rxn;
- (5) KMT2A-MLLT1: 192,4 cp/rxn;
- (6) KMT2A-MLLT3: 248,5 cp/rxn;
- (7) KMT2A-MLLT10: 562,75 cp/rxn.

O cálculo para o valor médio de cópias por reação utilizou a ferramenta *DNA Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* (Thermo Fisher Scientific, [s.d.]). O resultado mais destoante das fusões para o número de cópias foi para a fusão KMT2A-MLLT10 e PML-RARA.

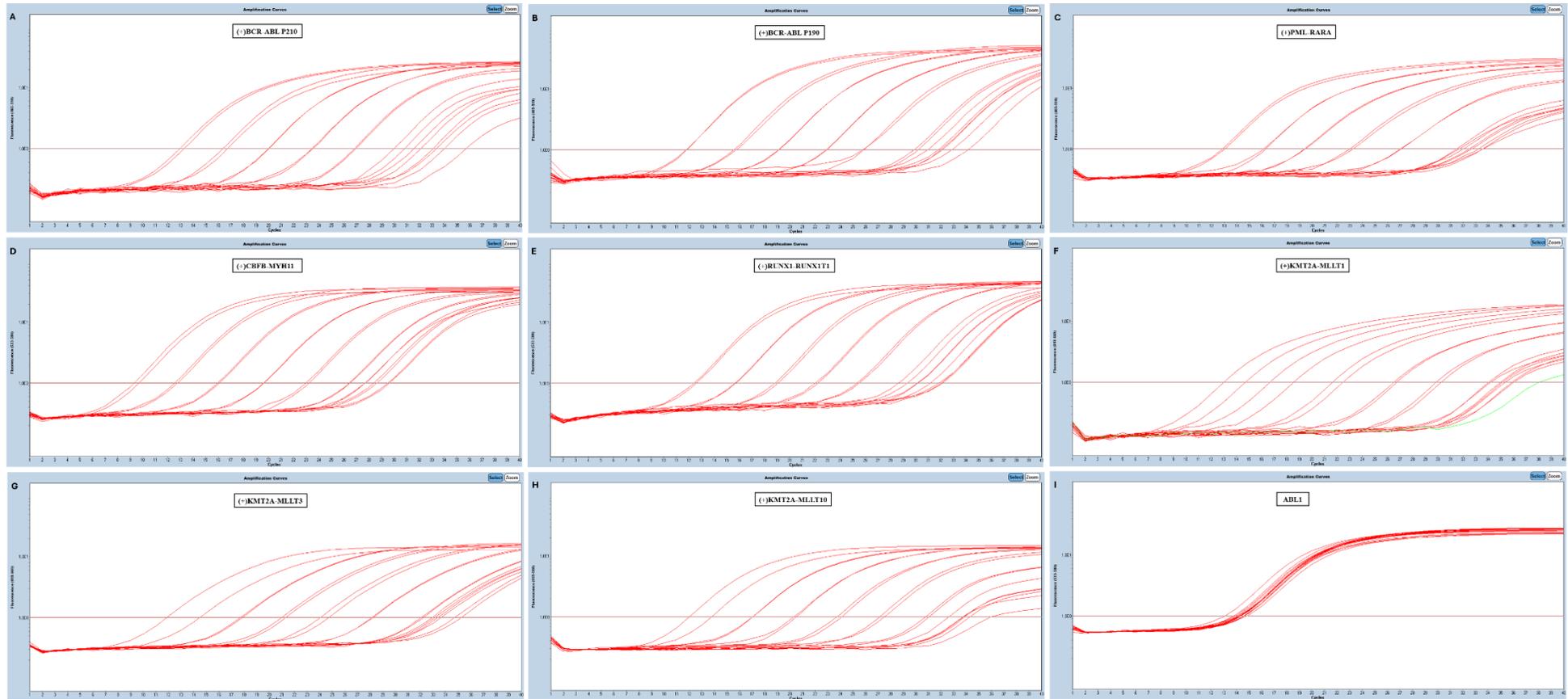


Figura 3 - Resultados obtidos da sensibilidade para cada alvo. As imagens foram dispostas de acordo com cada fusão detectada até o fator de diluição de $1,25E-09$: (A)BCR-ABL P210; (B)BCR-ABL P190; (C)PML-RARA; (D)CBFβ-MYH11; (E)RUNX1-RUNX1T1; (F)KMT2A-MLLT1; (G)KMT2A-MLLT3; (H)KMT2A-MLLT10; (I)controle interno ABL1. Assim como na figura 1 e 2, para a análise foram utilizados *color compensation* entre FAM e HEX. Os fatores de diluição se encontram no Apêndice D.

4.3.4 ESPECIFICIDADE

Foi observada especificidade dos *primers* pelos testes *in silico* no *software* BLAST e foi determinada pela curva de *melting* visível na Figura 4. Plasmídeos de DNA sintéticos diluídos em 1:1000 foram utilizados para este teste de especificidade. Na figura 5 estão os resultados dos negativos e do “*no template control*” (NTC).

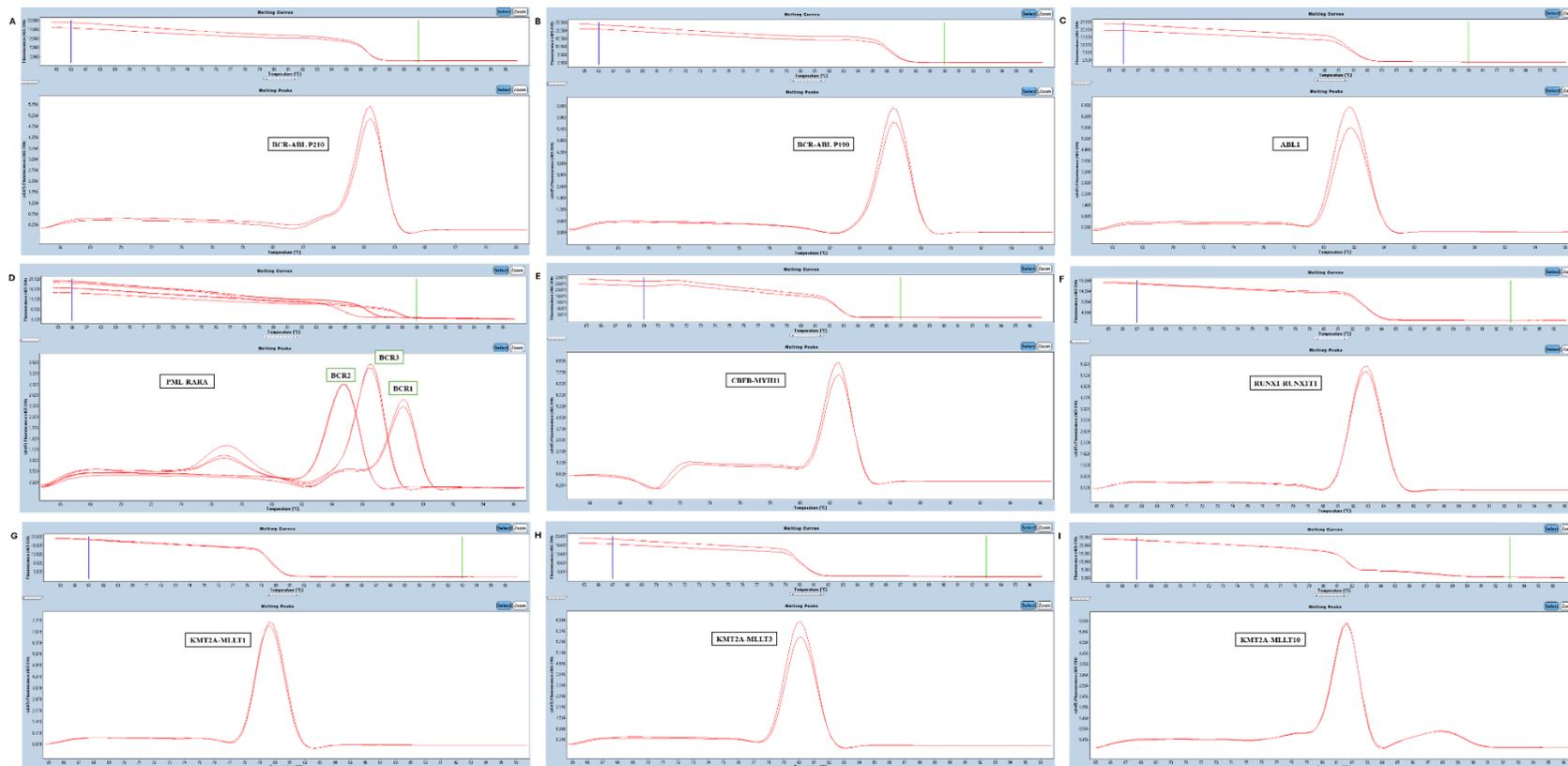


Figura 4 - Resultado de especificidade por curva de *melting*. Os resultados encontrados para cada uma das fusões e para o controle interno confirmam a especificidade dos

primers com o pico de amplificação na temperatura de *melting* adequado. As imagens estão na ordem: (A)BCR-ABL P210; (B)BCR-ABL P190; (C) controle interno ABL1; (D) PML-RARA; (E)CBFB-MYH11; (F)RUNX1-RUNX1T1; (G)KMT2A-MLLT1; (H)KMT2A-MLLT3; (I)KMT2A-MLLT10. O teste de *SYBR Green* utilizou os plasmídeos descritos no Apêndice D para testar os *primers* distintos;

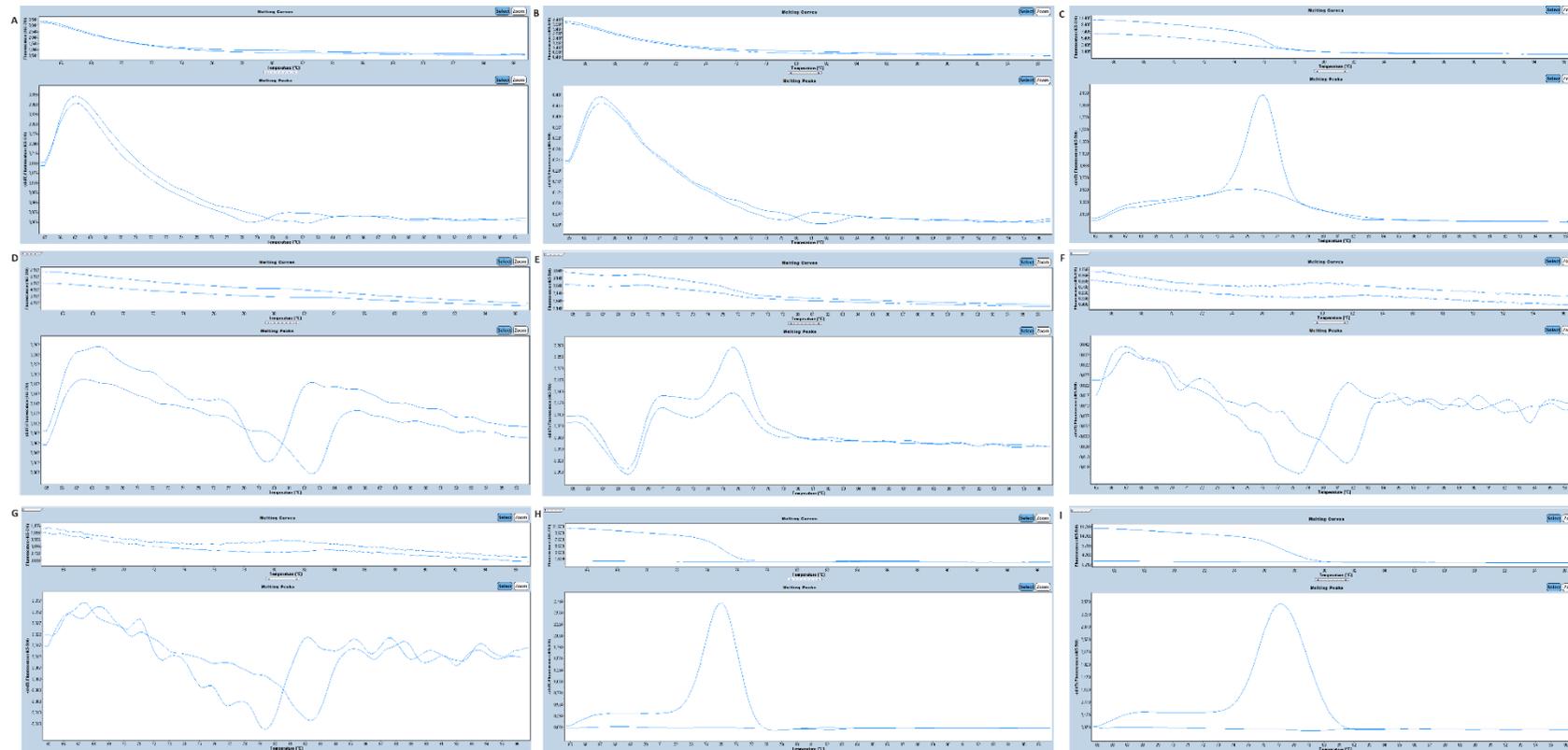


Figura 5 - Resultado de negativos para especificidade por curva de *melting*. Os resultados encontrados para cada uma das fusões e para o controle interno confirmam a especificidade dos primers com a ausência do pico de amplificação na temperatura de *melting* adequado. As imagens estão na ordem: (A)BCR-ABL P210; (B)BCR-ABL P190; (C) controle interno ABL1; (D) PML-RARA; (E)CBFB-MYH11; (F)RUNX1-RUNX1T1; (G)KMT2A-MLLT1; (H)KMT2A-MLLT3; (I)KMT2A-MLLT10. O teste de *SYBR Green* utilizou os 3 plasmídeos descritos no Apêndice D para testar os primers distintos.

4.4 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise das fusões PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, BCR-ABL (P210), BCR-ABL (P190), KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10 em simultâneo RT-PCR em tempo real, para sua detecção em amostras de medula óssea e sangue periférico de sujeitos com LMA. O método desenvolvido demonstrou um desempenho satisfatório ao identificar aproximadamente 17% das principais fusões gênicas associadas ao diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). A detecção dessas fusões apresentou uma acurácia de 100% (11/11) quando comparada com os resultados obtidos por sequenciamento de nova geração (NGS), indicando alta precisão na identificação das fusões. Adicionalmente, o método confirmou a ausência de reações cruzadas entre as fusões analisadas, o que garante a especificidade da técnica. O teste também foi promissor em termos de precisão, sensibilidade e especificidade, evidenciando a robustez e confiabilidade do método na análise das fusões gênicas.

Os resultados obtidos em acurácia foi um reflexo fidedigno da frequência dos translocados específicos em casos de LMA em pacientes com mais de 21 anos. Em um estudo de coorte com 1.540 pacientes com LMA, PAPAEMMANUIL et al. (2016) identificaram os subgrupos genômicos de classificação da doença e observaram a frequência das translocações. Os resultados mostraram que as translocações mais frequentes eram CBFβ-MYH11 (5%), PML-RARA (4%), e RUNX1-RUNX1T1 (4%), seguidas por rearranjos de KMT2A/MLL (3%). Esses dados corroboram os resultados obtidos neste estudo, reforçando o achado de que as fusões presentes e ausentes em nossas amostras é consistente com a frequência observada nas populações estudadas por PAPAEMMANUIL et al. (2016).

As técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) são amplamente empregadas na pesquisa molecular, cada uma com suas particularidades e benefícios. O NGS permite a análise simultânea de múltiplos segmentos de RNA, proporcionando uma visão detalhada do genoma ou transcriptoma e identificando variações genéticas em larga escala, as quais exige equipamentos sofisticados e análise bioinformática avançada (MARDIS, 2008). Em contraste, o RT-PCR é uma técnica sensível e específica para quantificar a expressão gênica em tempo real, sendo ideal para resultados em menos tempo, com uma análise mais rápida e simples em comparação com o NGS (WITTEWER et al., 2001).

O diagnóstico rápido na LMA permite a implementação de terapias agressivas e

específicas, que são essenciais para o controle da doença e a obtenção de remissão (WANG et al., 2020). A ausência de diagnóstico precoce pode levar a um atraso no tratamento, o que frequentemente resulta em um quadro clínico mais avançado e uma resposta menos eficaz às terapias (WANG et al., 2020). As tecnologias modernas, como RT-PCR, têm melhorado a capacidade de diagnóstico rápido e preciso, permitindo a personalização do tratamento com base nas características genéticas específicas da LMA.

O método desenvolvido neste estudo não só reduz significativamente o tempo necessário para o preparo das amostras, como também proporciona resultados mais rapidamente em comparação com o sequenciamento de nova geração (NGS), sem comprometer a qualidade na detecção das fusões gênicas investigadas. Além de sua eficiência, o método apresenta um custo reduzido, tornando-o mais acessível tanto para pacientes de baixa renda quanto para aqueles que optam por serviços privados com maior custo. Esta característica evidencia uma oportunidade para uma implementação mais econômica e acessível no sistema de saúde pública brasileiro, permitindo que mais pacientes tenham acesso a diagnósticos rápidos e eficazes.

Contudo, apesar das vantagens significativas em termos de custo e tempo, o método de RT-PCR desenvolvido ainda possui limitações em comparação com o NGS. Enquanto o NGS oferece uma ampla capacidade de detecção de fusões gênicas, o método de RT-PCR pode enfrentar desafios em termos de abrangência, o que pode limitar a sua eficácia em alguns casos. Essa limitação destaca a necessidade de considerar as abordagens disponíveis, especialmente em contextos em que a detecção abrangente é crucial para o diagnóstico e tratamento eficaz de doenças com alto risco de mortalidade.

Outro ponto a ser considerado é a facilidade de implementação e utilização do método desenvolvido em comparação com os métodos existentes. A simplicidade no processo de execução com menos etapas e procedimentos complexos facilita a adoção do método por diferentes laboratórios. Além disso, ao exigir menos equipamentos sofisticados e complexos, o método não só reduz os custos associados à compra e manutenção de equipamentos, mas também simplifica o treinamento dos profissionais que o utilizarão. Essa facilidade operacional pode resultar em uma maior eficiência no fluxo de trabalho e na integração do método em rotinas laboratoriais, tornando-o uma opção atraente para diversas aplicações.

Um dos limitantes do trabalho foi a ausência de pacientes verdadeiramente positivos para as fusões gênicas BCR-ABL P210, BCR-ABL P190, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3 e KMT2A-MLLT10 tanto para serem testados em RT-PCR quanto confirmados na técnica de NGS. Para futuros desenvolvimentos um número amostral que capacite a releitura dessas fusões

fosse viável para robustez do teste. Outro fator considerável foi o uso de plasmídeos para o limite de detecção e sua variação de cópias, podendo ser explicado pela competição que ocorre na reação devido à quantidade de *primers* usados para garantir uma detecção mais completa dos alvos. Segundo ALBERTS et al. (2014) ao usar vários *primers* em uma reação, eles competem entre si para se ligar aos segmentos de DNA alvo, podendo afetar a eficiência da reação, pois pode haver menos ligação eficiente aos alvos desejados, resultando em uma amplificação menos eficaz. Realizar uma reação com menos primers poderia melhorar a sensibilidade do método. Porém em contrapartida limitar a detecção das diversas quebras.

4.5 CONCLUSÃO

A investigação das fusões gênicas CFBF-MYH11, BCR-ABL, KMT2A-MLLT, RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA e ABL1 por PCR em tempo real apresentou desempenho satisfatório em comparação com o NGS, com respeito à acurácia, precisão, sensibilidade e especificidade.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto o NGS quanto a RT-PCR em Tempo Real oferecem valiosas contribuições para a pesquisa molecular e diagnóstico clínico, cada uma com suas vantagens e limitações. Enquanto o NGS proporciona uma análise abrangente e detalhada do genoma ou transcriptoma, exigindo equipamentos avançados e análise bioinformática complexa, a RT-PCR se destaca pela sua sensibilidade, rapidez e custo reduzido. No contexto da Leucemia Mieloide Aguda (LMA), um diagnóstico rápido e preciso é crucial para a implementação eficaz de terapias específicas e para melhorar os resultados clínicos e aumentar o tempo de sobrevivência dos pacientes. O método de detecção de fusão desenvolvido, que combina um tempo de preparo reduzido com menor custo, maior acessibilidade a população de baixa renda e facilidade de implementação, representa uma alternativa promissora aos métodos baseados em NGS, facilitando a adoção em diversos laboratórios privados e no sistema público de saúde e contribuindo para a acessibilidade financeira do diagnóstico. Apesar da limitação em detectar menos fusões comparado ao NGS, sua simplicidade e eficiência operacional fazem dele uma opção atraente para a prática clínica e a pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6. ed. New York: Garland Science, 2014.

BURMEISTER, Thomas; MEYER, Claus; GRÖGER, Daniela; HOFMANN, Julia; MARSCHALEK, Rolf. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. **Journal of Hematology Research**, Berlin, v. 10, n. 4, p. 567-578, nov. 2014.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 01 maio 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 705, de 12 de agosto de 2014**. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 17 set. 2015.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Hematology**, v. 27, n. 1, p. 1-34, 2022.

FRANKLIN GENOOX. **Plataforma de análise e interpretação de dados genômicos**. [S.l.]: Franklin, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.franklingenoox.com>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

GABERT, J. et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2318-2357, 1 dez. 2003.

GENEIOUS. **Geneious**. Versão 2023. Auckland: Biomatters Ltd., 2023. Disponível em: <<https://www.geneious.com>>. Acesso em: 16 jul. 2024.

ILLUMINA. *AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel: Reference Guide*. San Diego: Illumina, 2019. Disponível em: <<https://support.illumina.com/downloads/ampliseq-for-illumina-myeloid-panel-reference-guide-1000000056148.html>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES – IDT. Custom DNA Oligos. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/products/oligos>>. Acesso em: 18 jul. 2024.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, p. 387-402, 2008.

MEYER, C. et al. The KMT2A recombinoome of acute leukemias in 2023. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, v. X, n. Y, p. Z-Z, 2023.

PAPAEMMANUIL, Elias; GERSTUNG, Markus; BULLINGER, Lars; et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 23, p. 2209-2221, 2016.

SURAPALLY, S.; TENEN, D. G.; PULIKKAN, J. A. Emerging therapies for inv(16) AML. *Blood*, v. 137, n. 19, p. 2579-2584, 13 maio 2021.

SWERDLOW, Steven H. et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. DNA Copy Number Calculator. [S.l.]: Thermo Fisher Scientific, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>>. Acesso em: 25 jul. 2024.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Multiple *Primer* Analyzer*. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

WANG, Y.; LIU, Q.; CHEN, L. Timely diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, v. 38, n. 9, p. 102-110, 2020.

WITTWER, C. T.; RIEDER, M. J.; SCHWABER, J. S.; SENSING, R. S. R. Real-time PCR. *BioTechniques*, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.

ZAGO, Maria Aparecida; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Tratado de Hematologia*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 343-350.

7. APÊNDICE A – TESTES DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO

O teste de temperatura realizado levou em consideração os *primers* e sondas isolados e em conjunto na reação para confirmar se sofreu alguma alteração maior de resultados. O padrão de PCR utilizada seguiu as temperaturas determinadas no reagente QuantiNova Probe RT-PCR, sendo um ciclo de ativação da transcriptase reversa de 45°C a 10 minutos, um ciclo de ativação a 95°C por 5 minutos e 40 ciclos de 95°C a 5 segundos e 60° a 30 segundos. A variação ocorreu na etapa de anelamento/extensão na intenção de encontrar a melhor temperatura a ser utilizada com os *primers* utilizados e desenvolvidos.

Os testes foram realizados com plasmídeos que foram diluídos para concentrações mais altas (concentração em 10^{-5} ng/ μ L) e concentrações mais baixas (concentração em 10^{-7} ng/ μ L), de acordo com o Apêndice D, e testados em duplicata na reação. Realizou-se 3 reações em temperaturas de 60°C, 62°C e 65°C durante 30 segundos de amplificação. No gráfico 1 podemos avaliar a diferença de Cq obtido nas 3 temperaturas testadas e para cada uma das fusões analisadas nas concentrações altas (concentração em 10^{-5} ng/ μ L). Para as concentrações mais baixas (concentração em 10^{-7} ng/ μ L) estão no gráfico 2. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença entre as temperaturas testadas.

Nos testes isolados e em conjunto não apresentou diferença entre a amplificação no multiplex e separadamente como mostra o gráfico 3 e 4. Os três testes das amplificações foram semelhantes nas três temperaturas de anelamento testadas.

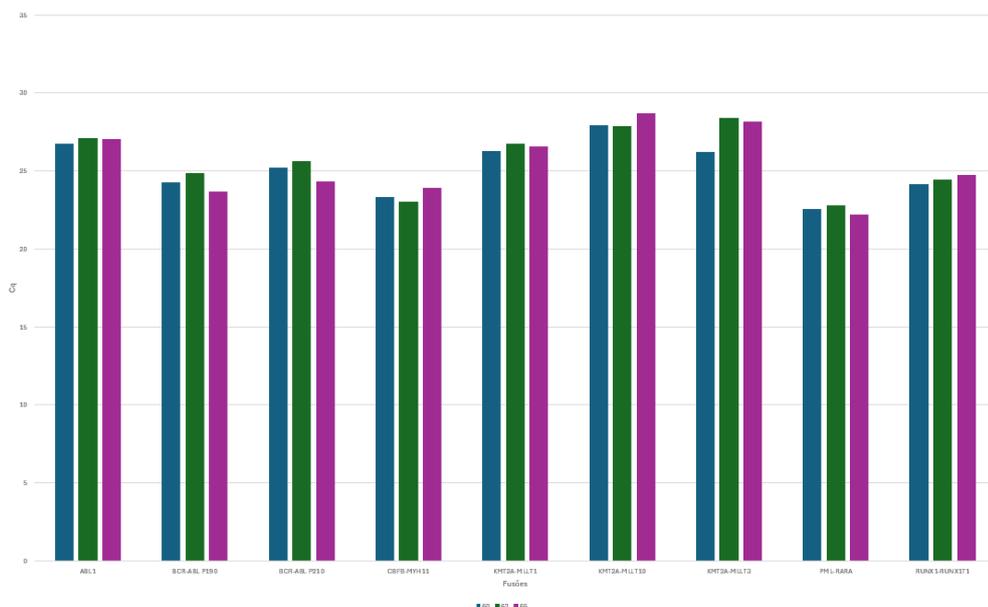


Gráfico 1 - Resultado de temperaturas nas concentrações altas. Ciclo quantitativo (Cq) de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas nas concentrações altas (concentração em 10^{-5} ng/ μ L). Os resultados indicam que não houve variação do Cq de acordo

com a temperatura de anelamento dos primers na reação. A reação em que houve maior variação do Cq foi aquela para investigação da fusão KMT2-MLLT3.

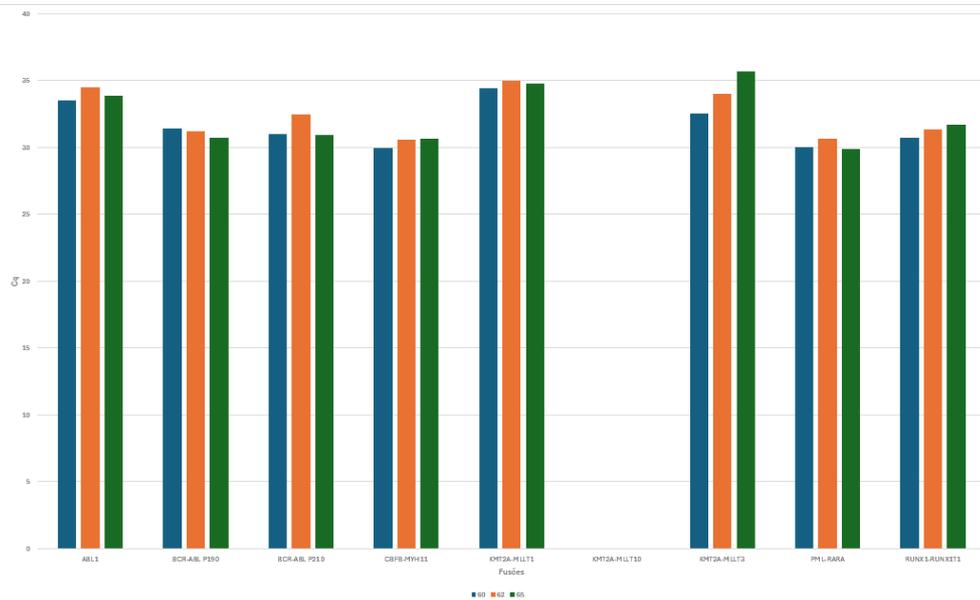


Gráfico 2 - Resultado de temperaturas nas concentrações baixas. Ciclo quantitativo (Cq) de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas nas concentrações mais baixas (concentração em 10^{-7} ng/ μ L). Os resultados indicam que não houve variação do Cq de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na reação. A reação em que houve maior variação do Cq foi aquela para investigação da fusão KMT2-MLLT3. A fusão KMT2A-MLLT10 não apresentou amplificação nesta reação e os pontos de concentração mais altos foram considerados.

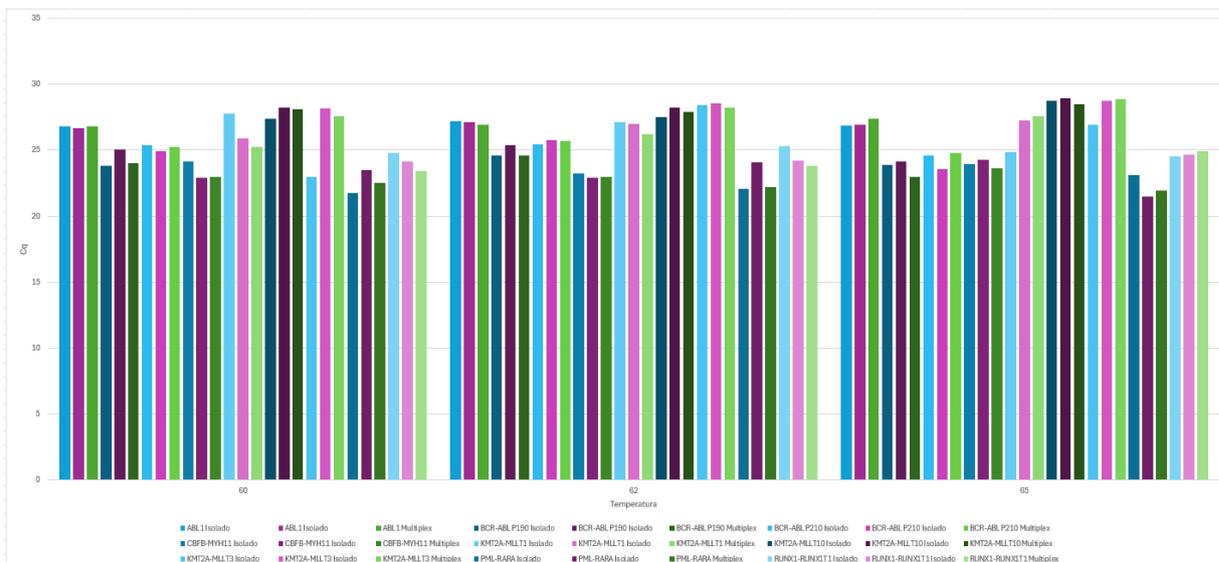


Gráfico 3 - Resultado de temperaturas com primers e sondas isolados. Ciclo quantitativo (Cq) de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas testadas isolados em conjunto no multiplex nas concentrações altas (concentração em 10^{-5} ng/ μ L). Os resultados indicam que não houve variação do Cq de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na reação.

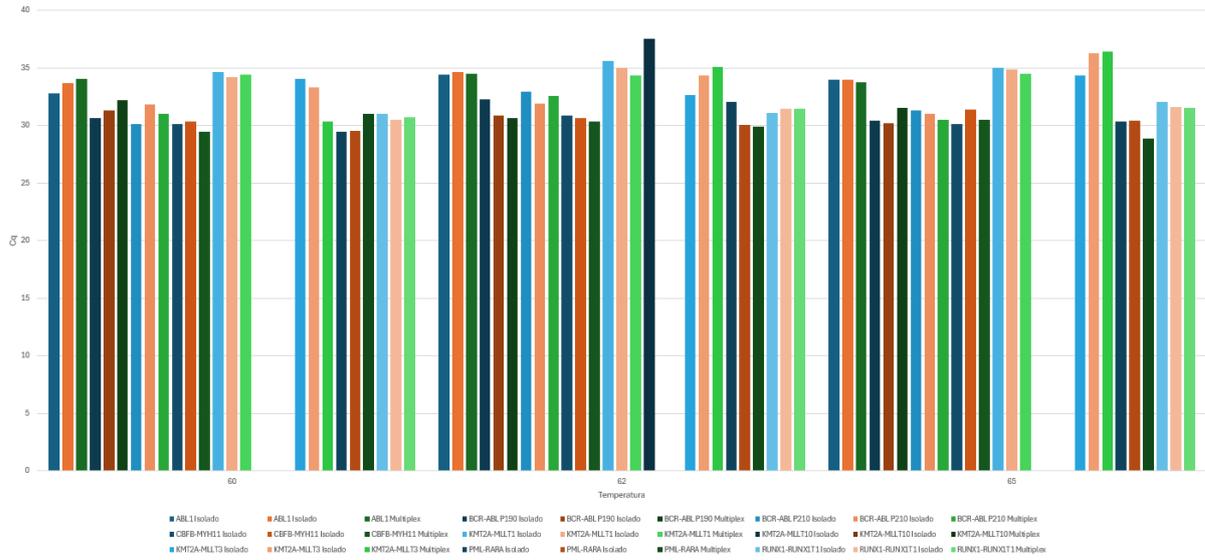


Gráfico 4 - Resultado de temperaturas com primers e sondas no multiplex. Ciclo quantitativo (Cq) de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na PCR em tempo real, para as diferentes fusões gênicas investigadas testadas isolados em em conjunto no multiplex nas concentrações mais baixas (concentração em 10^{-7} ng/ μ L). Os resultados indicam que não houve variação do Cq de acordo com a temperatura de anelamento dos primers na reação.

Após resultados a temperatura escolhida foi 65°C devido à maior proximidade com a temperatura dos primers e sondas utilizados no método.

8. APÊNDICE B – TESTES DE CONCENTRAÇÃO DE PRIMER E SONDA

O teste de concentração de *primer* e sonda levou em consideração o recomendado pelo manual do reagente utilizado, respeitando os limites estabelecidos. Para isso foram testadas duas concentrações: (1) 0,25 μM para a sonda e 0,5 μM para cada um dos *primers* em um volume final de 100 μL , partindo de uma concentração inicial de 100 μM ; (2) 0,5 μM para a sonda e 0,8 μM para cada um dos *primers* em um volume final de 100 μL , partindo de uma concentração inicial de 100 μM .

Os testes foram realizados com plasmídeos os quais foram diluídos para uma concentração mais alta (concentração em 10^{-3} ng/ μL) e testados em duplicata na reação. Realizaram-se 2 reações na temperatura estabelecida de 65°C durante 30 segundos de amplificação. No gráfico 1 podemos avaliar a diferença de Cq obtido nas 2 concentrações testadas e para cada uma das fusões analisadas.

Nos dois testes as amplificações se apresentaram de forma variada, mas partindo do pressuposto de que a reação deve conter uma concentração menor de sonda e *primer* evitando interferências maiores na amplificação do resultado esperado, as concentrações de 0,25 μM para a sonda e 0,5 μM foram consideradas as mais adequadas.

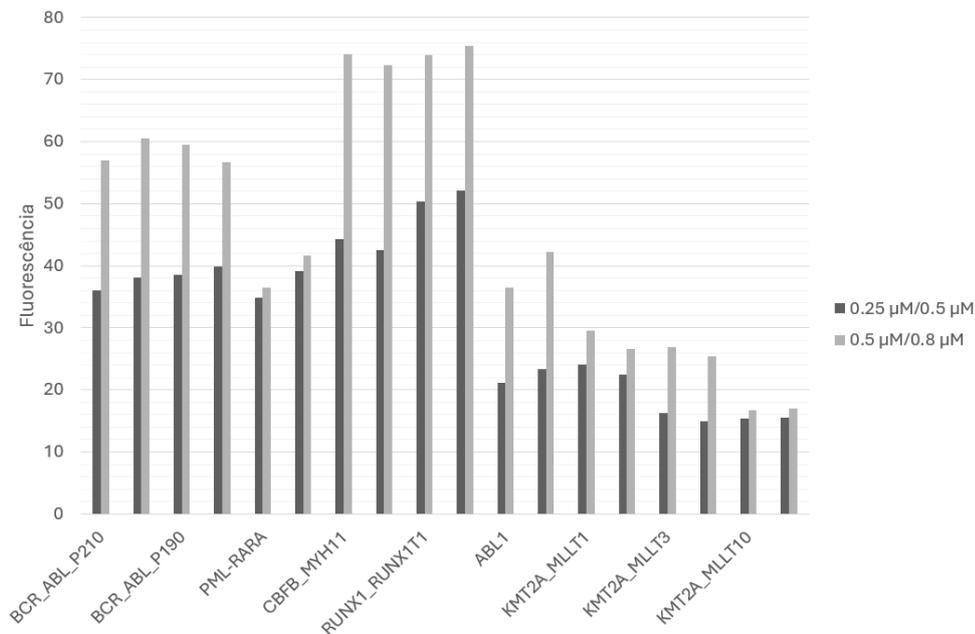


Gráfico 1 - Comparação de fluorescência. Intensidade de fluorescência emitida pela sonda de detecção de acordo com a concentração de primers e sondas, para cada uma das fusões gênicas investigadas. As reações de amplificação das fusões PML-RARA, KMT2A-MLLT1 e KMT2-MLLT10 não apresentaram diferença de fluorescência com concentrações mais elevadas, diferentemente daquelas para amplificação das fusões CBFβ-MYH11 e RUNX1-RUNX1T1.

9. APÊNDICE C - TESTES DE TEMPO DE EXTENSÃO DA RT-PCR

Para os tempos de extensão da RT-PCR em tempo real padronizado foram testados em protocolo do reagente QuantiNova Probe RT-PCR, ambos em temperatura de 65°C. Os testes foram realizados com plasmídeos que foram diluídos para concentrações mais altas (concentração em 10⁻⁵ ng/μL) e concentrações mais baixas (concentração em 10⁻⁷ ng/μL), de acordo com o Apêndice D, e testados em duplicata na reação. Realizaram-se 2 reações em duração de 30 segundos de amplificação e 60 segundos, com temperatura definida de 65°C. No gráfico 1 podemos avaliar a diferença de ciclo quantitativo (Cq) obtido nas 2 reações testadas e para cada uma das fusões analisadas.

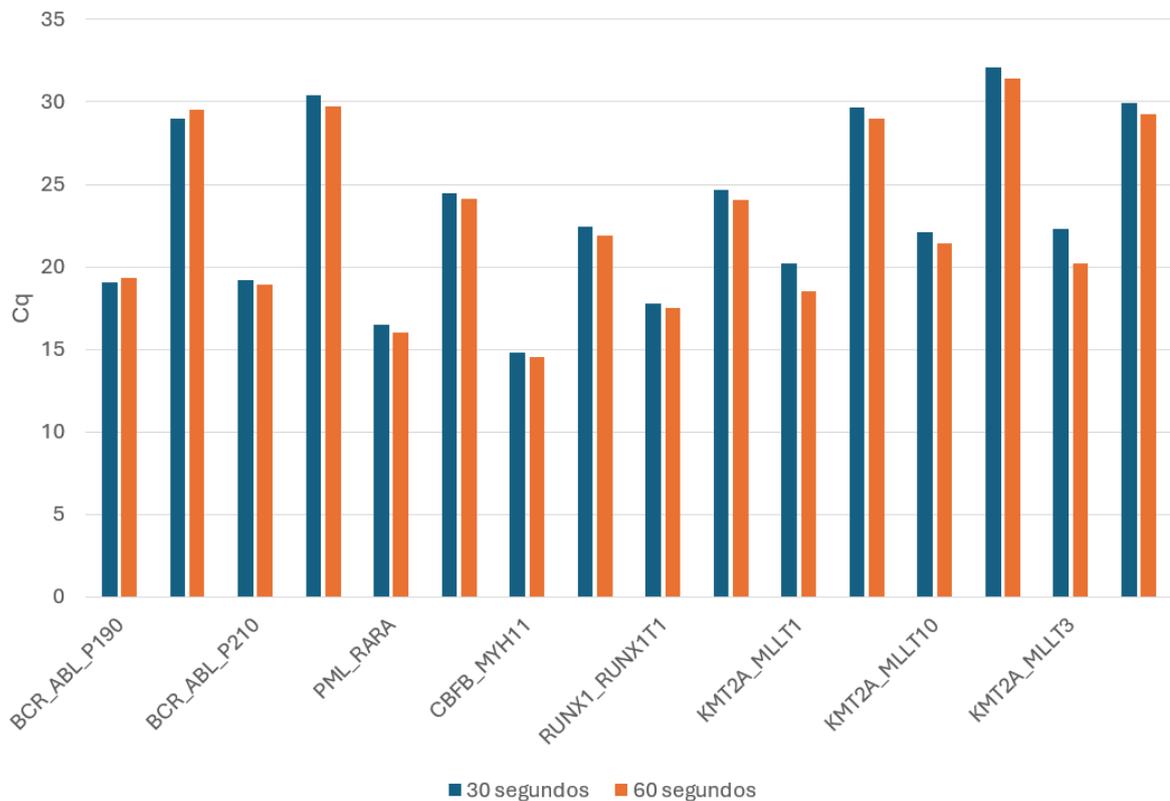


Gráfico 1 - Comparação de tempo de extensão da PCR. Ciclo quantitativo (Cq) de acordo com o tempo da etapa de extensão na PCR, para cada uma das fusões gênicas investigadas. É possível observar que os valores de Cq obtidos no tempo de 60 segundos e 30 segundos foram semelhantes. Para a reação final foi selecionado o tempo de 30 segundos para economizar tempo de reação, considerando que o tempo de extensão não sofreu mudança significativa na reação.

10. APÊNDICE D – PREPARO E DILUIÇÃO DE PLASMÍDEOS

Para o desenvolvimento da reação padronizada, os plasmídeos foram preparados em concentrações variadas para otimizar o teste antes de utilizar as amostras obtidas na pesquisa. Os plasmídeos foram adquiridos em uma quantidade de 5 µg e diluídos em 100 µL de solução de Tris-EDTA (TE), resultando em uma concentração final de 50 ng/µL. O cálculo para determinar um valor médio de cópias por reação foi realizado usando a ferramenta DNA Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, [s.d.]). O cálculo foi realizado individualmente para cada alvo.

10.1 BCR-ABL P210/BCR-ABL P190

O plasmídeo para o translocado t(9;22) foi desenvolvido com as 3 mutações mais recorrentes para o cromossomo Filadélfia, facilitando no desenvolvimento do fragmento 5'TCCGCTGACCATCAATAAGGACTGGCCCAACGATGGCGAACGGACATCCAGGC ACTGAAGGCAGCCAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGG GTCTGAGTG'3. O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/µL foi de 395.923.734.400 cp/rxn. Na tabela 1 está descrito as diluições obtidas e suas cópias. Vale lembrar que as cópias são dadas a cada 1 µL, mas em reação é preparada com 5 µL finais de plasmídeo.

Tabela 1 - Cálculo do número de cópias por reação BCR-ABL P210 e P190.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	395923734,4
D2	1,00E-04	39592373,4
D3	1,00E-05	3959237,3
D4	1,00E-06	395923,7
D5	1,00E-07	39592,4
D6	1,00E-08	3959,2
D7	5,00E-09	1979,6
D8	2,50E-09	989,8
D9	1,25E-09	494,9
D10	1,25E-10	49,5
D11	6,25E-11	24,8
D12	3,12E-11	12,4
D13	1,56E-11	6,2
D14	7,80E-12	3,1

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de

detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.2 PML-RARA

O plasmídeo para o translocado t(15;17) foi desenvolvido separadamente para 3 principais fusões mais recorrentes para a fusão PML-RARA, sendo elas: (1)5'TCTTCCTGCCCAACAGCAACCACGTGGCCAGTGGCGCCGGGGAGGCAGGAG ATAGTGCCCAGCCCTCCCTCGCCACCCCCTTACCCCGCATCTACAAGC'3;(2)5'CC CCAGGAAGGTCATCAAGATGGAGTCTGAGGAGGGGAAGGAGGCAAGGAGATAG TGCCCAGCCCTCCCTCGCCACCCCCTTACCCCGCATCTACAAGC'3;(3)5'CCGATG GCTTCGACGAGTTCAAGGTGCGCCTGCAGGACCTCAGCTCTTGAGATAGTGCCCA GCCCTCCCTCGCCACCCCCTTACCCCGCATCTACAAGC'3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 463.230.769.250 cp/rxn. Na tabela 2 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 2 - Cálculo do número de cópias por reação PML-RARA.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	463230769,25
D2	1,00E-04	46323076,9
D3	1,00E-05	4632307,7
D4	1,00E-06	463230,8
D5	1,00E-07	46323,0
D6	1,00E-08	4632,3
D7	5,00E-09	2316,2
D8	2,50E-09	1158,1
D9	1,25E-09	579,1
D10	1,25E-10	57,9
D11	6,25E-11	28,9
D12	3,12E-11	14,4
D13	1,56E-11	7,2
D14	7,80E-12	3,6

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.3 CFBF-MYH11

O plasmídeo para o translocado t(16;16) foi desenvolvido para a fusão mais recorrente para CFBF-MYH11, sendo ela a tipologia A e que possui o menor fragmento:

5'TGTCTGGAGTTTGGATGAGGAGCGAGCCCAGCAGGAGGATGCATTAGCACAACA
GGCCTTTGAAGAGGCTCGGAGAAGGACACGCGAATTTGAAGATAGAGACAGGTC
TCATCGGGAGGAAATGGAGGTCCATGAGCTGGAGAAGTCCAAGCGGGCCCTGGA
GACCCAGATGGAGGAGATGAAGACGCAGC'3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 243.805.668.000 cp/rxn. Na tabela 3 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 3 - Cálculo do número de cópias por reação CFBF-MYH11.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	243805668
D2	1,00E-04	24380566,8
D3	1,00E-05	2438056,7
D4	1,00E-06	243805,7
D5	1,00E-07	24380,6
D6	1,00E-08	2438,1
D7	5,00E-09	1219,1
D8	2,50E-09	609,6
D9	1,25E-09	304,8
D10	1,25E-10	30,5
D11	6,25E-11	15,2
D12	3,12E-11	14,4
D13	1,56E-11	7,6
D14	7,80E-12	3,8

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.4 RUNX1-RUNX1T1

O plasmídeo para o translocado t(8;21) foi desenvolvido na seguinte estrutura:
5'GTCGCCACCTACCACAGAGCCATCAAAATCACAGTGGATGGGCCCCGAGAACC
TCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCACAATGCCAGACTCACCTGTGGATGTGAA'
3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 432.925.952.550 cp/rxn. Na tabela 4 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 4 - Cálculo do número de cópias por reação RUNX1-RUNX1T1.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	432925952,6
D2	1,00E-04	43292595,3

D3	1,00E-05	4329259,5
D4	1,00E-06	432926,0
D5	1,00E-07	43292,6
D6	1,00E-08	4329,2
D7	5,00E-09	2164,6
D8	2,50E-09	1082,3
D9	1,25E-09	541,2
D10	1,25E-10	54,1
D11	6,25E-11	27,1
D12	3,12E-11	13,6
D13	1,56E-11	6,8
D14	7,80E-12	3,4

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.5 KMT2A-MLLT1

O plasmídeo para o translocado t(11;19) foi desenvolvido com todas as regiões de éxons detectadas pelos *primers* na reação, ficando da seguinte estrutura: 5'GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAACC AAAAGAAAAGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTTCTGTTCTATAA CACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAGTGCACCGT CCAGGTGAGGTTAGAGCTGACGCCAACAAGGAGAGCAGCAAGACCTCCAAGCCA CACAAGGTGACCAAGGAGCACTCTGCCAGTCAAGCCCGTCCA ACTCCAGCTCCA GCTCAGACTCCAGCTCA'3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 153.897.265.550 cp/rxn. Na tabela 5 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 5 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT1.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	153897265,6
D2	1,00E-04	15389726,6
D3	1,00E-05	1538972,7
D4	1,00E-06	153897,3
D5	1,00E-07	15389,7
D6	1,00E-08	1539
D7	5,00E-09	769,5
D8	2,50E-09	384,6
D9	1,25E-09	192,4
D10	1,25E-10	96,19
D11	6,25E-11	48,00
D12	3,12E-11	24,00

D13	1,56E-11	1,2
D14	7,80E-12	0,6

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.6 KMT2A-MLLT3

O plasmídeo para o translocado t(9;11) foi desenvolvido com todas as regiões de éxons detectadas pelos *primers* na reação, ficando da seguinte estrutura: 5'GGTGGTCGCAATATAAAGAAGCAGTGCTGCAAGATGAGAAAATGTCAGAATCTACAATGGATGCCTTCCAAAGCCTACCTGCAGAAGCAAGCTAAAGGTCCAGAGCAGCAAACAGAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAACC AAAAGAAAAGGACCCTAATAGGAGTATTCATACCAGCAGCGCATACCTAGATGA ACTGGTAGAGCTTCACAG'3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 198.811.488.950 cp/rxn. Na tabela 6 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 6 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT3.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	198811489
D2	1,00E-04	19881148,9
D3	1,00E-05	1988114,9
D4	1,00E-06	198811,5
D5	1,00E-07	19881,2
D6	1,00E-08	1988,1
D7	5,00E-09	994,1
D8	2,50E-09	497,0
D9	1,25E-09	248,5
D10	1,25E-10	24,9
D11	6,25E-11	12,4
D12	3,12E-11	6,2
D13	1,56E-11	3,1
D14	7,80E-12	1,6

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

10.7 KMT2A-MLLT10

O plasmídeo para o translocado t(10;11) foi desenvolvido com todas as regiões de éxons detectadas pelos *primers* na reação, ficando da seguinte estrutura: 5'GGTGGTCGCAATATAAAGAAGCAGTGCTGCAAGATGAGAAAATGTCAGAATCTACAATGGATGCCTTCCAAAGCCTACCTGCAGAAGCAAGCTAAAGGTCCAGAGCAGAGCAAGCAAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAACC AAAAGAAAAGACTTGCTACATTTGTGATGAACAAGGAAGAGAAAGCAAAGCAGC CACTGGTAAATATAAAGAGAAGGACAAACACAAACAGAAACACAAGAAGCAGC CAGAACCATCACCTGCATTGGTCTCAGATCTGCGTAATGACAGTTACTCTCACTCC CAACAGTCATCAGCAGCAAATACTCTATCTGGATCTTCTCTCAGTCAGGCACCA'3.

O número de cópias médio para a concentração inicial de 50 ng/μL foi de 122.547.822.550 cp/rxn. Na tabela 7 está descrito as diluições obtidas e suas cópias.

Tabela 7 - Cálculo do número de cópias por reação KMT2A-MLLT10.

PONTO DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	CÓPIAS POR REAÇÃO
D1	1,00E-03	122547822,6
D2	1,00E-04	12254782,3
D3	1,00E-05	1225478,2
D4	1,00E-06	122547,8
D5	1,00E-07	12254,8
D6	1,00E-08	1225,5
D7	5,00E-09	562,75
D8	2,50E-09	281,38
D9	1,25E-09	28,14
D10	1,25E-10	14,1
D11	6,25E-11	7,0
D12	3,12E-11	3,5
D13	1,56E-11	1,76
D14	7,80E-12	0,88

Foi utilizada a ferramenta DNA *Copy Number Calculator da Thermo Fisher Scientific* para determinar o equivalente de número de cópias a partir do valor de diluição utilizado. A tabela representa os pontos D1 a D9 obtidos na figura 3. Com os resultados inconclusivos sobre o ponto de falha, foram desenvolvidos mais 5 pontos a partir do último ponto (D9) para finalizar a análise do ponto de falha das diluições e do limite de detecção, descrita no tópico 5.3.3.

11. APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Universidade de Brasília Faculdade
de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa: Metodologia diagnóstica da inversão do cromossomo 16: Uma análise comparativa entre Real Time PCR e PCR convencional seguida de eletroforese capilar para a detecção da fusão CBFβ-MYH11, sob responsabilidade da pesquisadora Andressa Folha Vieira e a coordenação da professora Angélica Amato Amorim. O projeto tem como objetivo principal desenvolver a análise da fusão dos genes CBFβ e MYH11 (CBFβ-MYH11) pelo método de reação em cadeia da polimerase seguido de eletroforese capilar. A fusão desses genes tem papel na determinação da evolução ou prognóstico de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e é importante para o acompanhamento dos pacientes com a condição. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a necessidade de implementação da análise dessa fusão de genes, CBFβ-MYH11, pois ela é indispensável ao acompanhamento dos pacientes por permitir estabelecer um bom prognóstico (ou prever uma boa evolução) da LMA no momento do diagnóstico. Isso acontece porque essa fusão está associada a maior taxa de remissão completa da LMA com o tratamento, dentre os perfis de alterações genéticas analisados na LMA, e a avaliação de custo e benefício de um novo método pode ajudar a tornar disponível essa avaliação em maior escala e com maior facilidade para os serviços privados e públicos no Distrito Federal.

A participação do senhor(a) é voluntária, de acordo com sua vontade, e a recusa em participar não terá qualquer consequência, podendo também ocorrer em qualquer momento do projeto de pesquisa. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a). A sua participação se dará por meio do fornecimento de amostra de sangue, que será coletada por profissionais habilitados em unidade Sabin – laboratório de análises clínicas credenciado a qual o senhor já se encontra realizando exames rotineiros de acompanhamento de seu diagnóstico, ou seja, a participação do(a) senhor(a) no trabalho não envolverá uma visita exclusiva ao laboratório com a finalidade de participação no trabalho. O convite para a participação será realizado nesta atual visita que se faz e nesta mesma ocasião.

Os riscos e desconfortos envolvidos na pesquisa incluem a punção venosa periférica, que pode apresentar como principal complicação o aparecimento de manchas roxas na pele (as equimoses), que não trazem riscos à saúde. Complicações mais graves, embora raras, incluem lesão de nervos, hematomas (manchas roxas mais profundas), punção de artéria de forma errônea, infecção e dor. A diminuição dos riscos está relacionada de forma direta ao treinamento dos profissionais que coletarão a amostra (que são profissionais capacitados, que realizam as coletas rotineiramente no laboratório), manuseio de materiais e equipamentos, materiais de proteção, descarte e assepsias corretas desenvolvidos ao longo do procedimento.

Os resultados desse estudo não contribuirão com benefícios imediatos para o senhor(a). Entretanto, se o senhor(a) aceitar participar, estará contribuindo para a potencial elaboração e desenvolvimento de estratégias de estudo e detecção de fusão do gene CBFβ-MYH11, que podem tornar mais fácil e acessível esse exame no futuro. A participação é voluntária, isto é, está condicionada à sua concordância em participar e não há pagamento pela colaboração. Não haverá nenhum custo com procedimentos ou exames que são necessários à pesquisa. Caso você sofra algum dano decorrente dessa pesquisa, os pesquisadores garantem indenizá-lo por todo e qualquer gasto ou prejuízo. Os resultados do exame realizado (fusão gênica CBFβ-MYH11) serão informados ao senhor(a) apenas se assim o desejar. Quando o senhor(a) quiser ter conhecimento dos resultados, serão fornecidas todas as informações que os pesquisadores tiverem disponíveis, desde a literatura científica, até os resultados encontrados. Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para Andressa Folha (61)991464775, disponível inclusive para ligação a cobrar a qualquer horário, ou se preferir envie e-mail para andressafolhav@gmail.com. Os resultados da pesquisa serão divulgados em relatórios e publicações científicas, sem a identificação do senhor(a). Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. Um CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou aos direitos do participante da pesquisa podem ser tiradas entrando em contato com o CEP/FS através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail: cepfs@umb.br ou cepfsumb@gmail.com. Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o senhor (a).

Nome e Assinatura _____

Data ____/____/____



Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) senhor(a) a participar voluntariamente de uma nova etapa do do projeto intitulado: Metodologia diagnóstica da inversão do cromossomo 16: Uma análise comparativa entre Real Time PCR e PCR convencional seguida de eletroforese capilar para a detecção da fusão CBFβ-MYH11, sob responsabilidade da pesquisadora Andressa Folha Vieira e a coordenação da professora Angélica Amato Amorim.

O objetivo desta nova etapa busca desenvolver a análise das fusões gênicas BCR-ABL, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3, KMT2A-MLLT10 além de CBFβ-MYH11 pelo método de reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). Estas fusões gênicas possuem um papel determinante no diagnóstico, evolução e prognóstico de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e são importantes para o acompanhamento dos pacientes com a condição. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a necessidade de implementação da análise dessas fusões de genes, pois são indispensáveis ao acompanhamento dos pacientes por permitir estabelecer prognóstico (ou prever uma boa evolução) da LMA no momento do diagnóstico. Avaliar essas fusões em conjunto permite não somente ter um retorno de um resultado mais completo para pacientes com LMA, mas também de avaliar custo e benefício de um novo método o qual pode ajudar a tornar disponível essa avaliação em maior escala e com maior facilidade para os serviços privados e públicos no Distrito Federal.

A participação do senhor(a) é voluntária, de acordo com sua vontade, e a recusa em participar não terá qualquer consequência, podendo também ocorrer em qualquer momento do projeto de pesquisa. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a). A sua participação se dará por meio de assinatura deste termo autorizando o uso de amostra de sangue já fornecida anteriormente, a qual foi coletada por profissionais habilitados em unidade Sabin – laboratório de análises clínicas credenciado a qual o senhor já se encontra realizando exames rotineiros de acompanhamento de seu diagnóstico, ou seja, a participação do(a) senhor(a) no trabalho não envolverá uma visita exclusiva ao laboratório com a finalidade de participação no trabalho. O convite para a participação será realizado nesta atual visita que se faz e nesta mesma ocasião.

O aproveitamento de amostra já anteriormente coletada não trará riscos e desconfortos que envolvam esta nova etapa de pesquisa e informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a fornecer a o uso da amostra se lhe trouxer constrangimento ou qualquer outro inconveniente.

Os resultados desse estudo não contribuirão com benefícios imediatos para o senhor(a). Entretanto, se o senhor(a) aceitar participar, estará contribuindo para a potencial elaboração e desenvolvimento de estratégias de estudo e detecção de fusões gênicas, que podem tornar mais fácil e acessível esse exame no futuro. A participação é voluntária, isto é, está condicionada à sua concordância em participar e não há pagamento pela colaboração. Não haverá nenhum custo com procedimentos ou exames que são necessários à pesquisa. Caso você sofra algum dano decorrente dessa pesquisa, os pesquisadores garantem indenizá-lo por todo e qualquer gasto ou prejuízo. Os resultados do exame realizado (fusão gênica BCR-ABL, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT3, KMT2A-MLLT10 e CBFβ- MYH11) serão informados ao senhor(a) apenas se assim o desejar. Quando o senhor(a) quiser ter conhecimento dos resultados, serão fornecidas todas as informações que os pesquisadores tiverem disponíveis, desde a literatura científica, até os resultados encontrados. Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para Andressa Folha (61)991464775, disponível inclusive para ligação a cobrar a qualquer horário, ou se preferir envie e-mail para andressafolhav@gmail.com. Os resultados da pesquisa serão divulgados em relatórios e publicações científicas, sem a identificação do senhor(a). Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. Um CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou aos direitos do participante da pesquisa podem ser tiradas entrando em contato com o CEP/FS através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail: cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com. Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o senhor (a).

Nome e Assinatura _____

Data _____ / _____ / _____

12. APÊNDICE F - ETAPA DE EXTRAÇÃO DE LISE DE HEMÁCIAS COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Tipo de Material Coletado: Aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico.

Critério de Coleta: Mínimo de 10% de blastos estabelecidos anteriormente em imunofenotipagem.

Material Utilizado: Tubo EDTA.

Procedimento Inicial:

- Homogeneização das amostras por 15 minutos em agitador orbital.
- Transferência para tubo Falcon de 15 mL contendo 2,5 mL de sangue total fresco.

LISE DE HEMÁCIAS

Adição de Solução Lítica:

- Adição de 7,5 mL de *Cell Lysis Solution* ao tubo Falcon.
- Inversões do tubo 5-6 vezes.
- Incubação em temperatura ambiente por 10 minutos.

CENTRIFUGAÇÃO

- Centrifugação a 2.500 ×g por 10 minutos.
- Formação do pellet ao fundo do tubo.
- Descarte do sobrenadante sem ressuspender as células.
- Centrifugação adicional por 1 minuto para remover o líquido residual.
- Remoção do líquido residual com auxílio de pipeta.

PREPARAÇÃO DO PELLET

Adição de Reagentes:

- Adição de 200 µL de 1-Thioglycerol/Solução de Homogeneização (*Homogenization Solution*) resfriada ao pellet.
- Mistura completa no vórtex para ressuspensão do pellet.
- Adição de 200 µL de *Lysis Buffer* e 25 µL de proteinase K ao pellet de leucócitos brancos.

Mistura e Incubação:

- Mistura dos reagentes por 20 segundos em vórtex.
- Incubação à temperatura ambiente por 10 minutos.

EXTRAÇÃO DE RNA

Kit Utilizado: Protocolo de extração utilizando o kit Maxwell® RSC *simplyRNA Blood Kit* (Promega).

Equipamento Utilizado: Extração realizada no equipamento Maxwell.

13. APÊNDICE G - PROTOCOLO DE PCR E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

PREPARAÇÃO E LIMPEZA DO MATERIAL

Material Inicial: eluído obtido após extração do Anexo II.

Reagentes Utilizados (Illumina):

- 2 µL de 10X DNase Buffer com MgCl₂.
- 2 µL de DNase I, RNase Free.
- 16 µL do eluído de RNA com concentração de 15 ng/µL.

Procedimento:

- Totalizou-se um volume final de 20 µL.
- Incubação a 37°C por 30 minutos.
- Adição de 2 µL de EDTA (50 mM) ou 4 µL (25 mM).
- Etapa de inativação a 65°C por 10 minutos.

TRANSFORMAÇÃO DO RNA EM cDNA

Reagentes Utilizados (Illumina):

- 1 µL de 5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix.
- 0,5 µL de 10X AmpliSeq RT Enzyme Mix.
- 3,5 µL do eluído de RNA purificado.

Procedimento:

- Totalizou-se uma reação de 5 µL.
- Ciclagem: Incubação a 42°C por 30 minutos, inativação a 85°C por 5 minutos.
- Manutenção a 10°C por 16 horas ou congelamento para a próxima etapa.

PAINEL DE LEUCEMIA MIELOIDE

Kit Utilizado: AmpliSeq Mieloide RNA Panel (Illumina).

Procedimento:

- Análise da presença ou ausência de mais de 500 fusões.
- Reações realizadas conforme os protocolos do kit.
- Adição de 2 µL de reagente FUPA.
- Ciclagem: Incubação a 55°C por 10 minutos e a 62°C por 20 minutos.

INDEXAÇÃO E SEPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Reagentes Utilizados (Illumina):

- 4 µL de *Switch Solution*.
- 2 µL de AmpliSeq CD Indexes ou UD Indexes for Illumina.
- 2 µL de DNA Ligase.

Procedimento:

- Incubação a 22°C por 30 minutos.
- Sequência de incubação: 68°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos.

Limpeza com *Beads* Magnéticas:**Primeira Limpeza:**

- Adição de 30 µL de Kapa *pure beads* a cada biblioteca.
- Vórtex e centrifugação por 5 minutos.
- Incubação em estantes magnéticas por 2 minutos.
- Remoção do sobrenadante.
- Adição de 150 µL de etanol (ETOH 80%), incubação por 30 segundos.
- Repetição do processo de lavagem com etanol.
- Secagem por 10 minutos com tubo aberto.
- Amplificação com 45 µL de 1X Lib Amp Mix e 5 µL de 10X Library Amp *Primers*.
- Ciclagem: Incubação a 98°C por 2 minutos, seguida de 7 ciclos de 98°C por 15 segundos e 64°C por 1 minuto.

Segunda Limpeza:

- Adição de 25 µL de Kapa *pure beads* e incubação por 5 minutos.
- Vórtex e centrifugação, seguido por separação em estantes magnéticas por 5 minutos.
- Transferência do sobrenadante para uma placa de PCR.
- Adição de 60 µL de Kapa *pure beads*, repetição do processo de vórtex, centrifugação e separação.
- Realização da mesma lavagem com etanol e secagem por 5 minutos.
- Adição de 30 µL de *low-TE Buffer*, vórtex e centrifugação breve.

QUANTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO**Preparação das Amostras:**

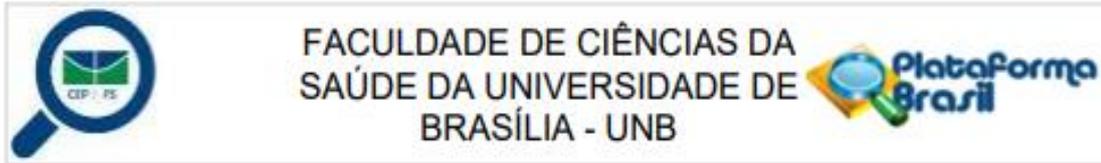
- Quantificação e diluição para uma concentração de 2 nM.
- Preparação de um pool com 10 µL de cada biblioteca em um único poço.

Sequenciamento:

Preparação conforme protocolo Illumina para utilização do MiSeq.

Sequenciamento realizado por 26 horas.

14. ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Metodologia diagnóstica da inversão do cromossomo 16: Uma análise comparativa entre Real Time PCR e PCR convencional seguida de eletroforese capilar para a detecção da fusão CBF-B-MYH11

Pesquisador: ANDRESSA FOLHA VIEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69557823.0.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.176.749

Apresentação do Projeto:

Conforme documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2042938.pdf", postado em 23/06/2023:

"Desenho:

Serão coletadas informações clínicas e laboratoriais de sujeitos com LMA, desenvolvido um método de PCR convencional seguida de eletroforese capilar para análise da fusão gênica CBF-MYH11, comparado o método desenvolvido com o método padrão-ouro (reação em cadeia da polimerase em tempo real; Realltime PCR) para definição de sua sensibilidade, reprodutibilidade e acurácia do teste e a presença da inv(16)(p13q22) será associada com a progressão da LMA;"

"Resumo:

A célula, detentora da informação hereditária, por meio de mecanismos de replicação, possibilita sua multiplicação e expansão em um determinado organismo pluricelular por meio do DNA, que, pela transcrição, expressa suas informações e, conseqüentemente, permite a síntese de outras moléculas na célula. Os fatores de transcrição necessitam de uma região promotora do gene e da atividade da RNA polimerase para que a produção do RNA mensageiro seja concluída e,

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

15. ANEXO II - DNA PLASMIDIAL

15.1 BCR-ABL P210, P190 E P230

O plasmídeo contém o gene BCR-ABL1p210p190p230, com um tamanho de 117 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 OmniMAX™ 2 T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial.

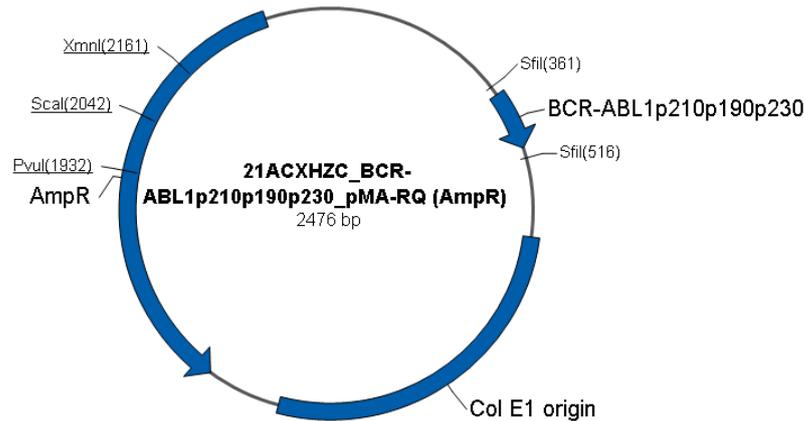
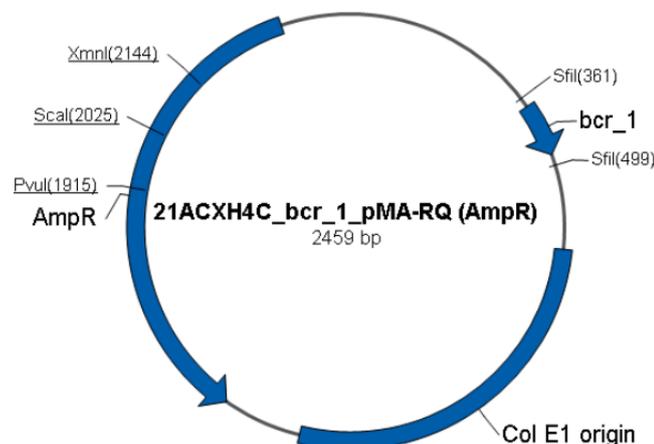


Figura 1 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene BCR-ABL1p210p190p230.

15.2 PML-RARA

Os três plasmídeos que contêm, individualmente, os genes PML-RARAbcr1, PML-RARAbcr2 e PML-RARAbcr3, foram desenvolvidos com um tamanho de 100 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 OmniMAX™ 2 T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial.



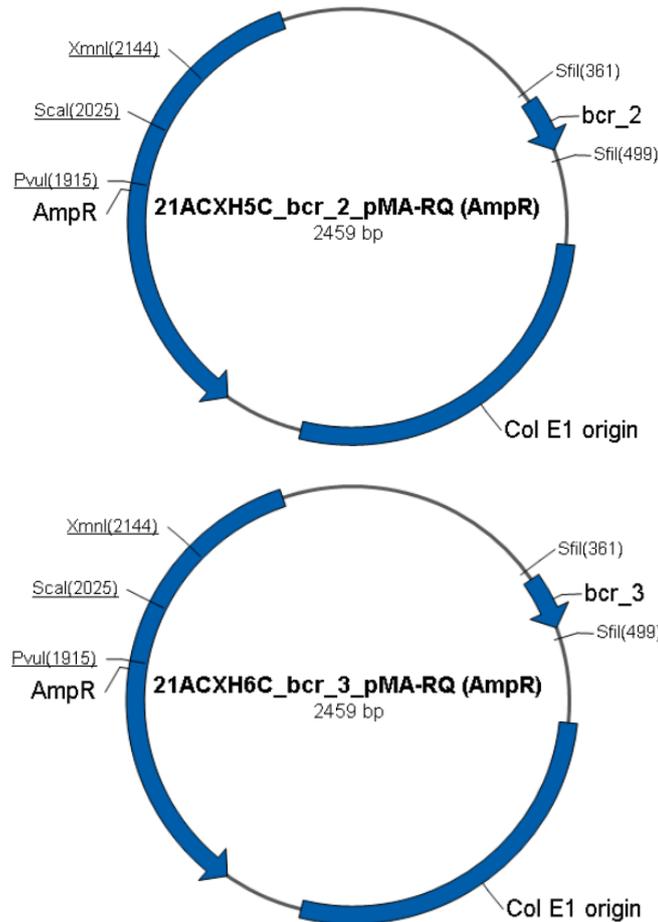


Figura 2 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene PML-RARAbcr1, PML-RARAbcr2 e PML-RARAbcr3, respectivamente.

15.3 CFBF-MYH11

O fragmento de DNA que contém o gene CFBF-MYH11, com um tamanho de 190 pares de base. Este *gBlock* foi produzido pela empresa IDT e são oligonucleotídeos de DNA de alta qualidade que podem ser usados em uma variedade de aplicações. A quantidade disponível é aproximadamente 250 ng que foram reconstituídos, segundo os padrões da empresa, para uma concentração final de 10 ng/ μ L de fragmento de DNA.



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

06-Jan-2023

Sales Order Number

Customer Name

Reference Number

Name - Controle_Type_A

gBlocks® Gene Fragments 190 base pairs

5'- TGT CTG GAG TTT GAT GAG GAG CGA GCC CAG CAG GAG GAT GCA TTA GCA CAA CAG GCC TTT GAA GAG GCT
CGG AGA AGG ACA CGC GAA TTT GAA GAT AGA GAC AGG TCT CAT CGG GAG GAA ATG GAG GTC CAT GAG CTG GAG
AAG TCC AAG CGG GCC CTG GAG ACC CAG ATG GAG GAG ATG AAG ACG CAG C -3'

Figura 3 - Estrutura do *gBlock* contendo o gene CFBF-MYH11 tipo A.

15.4 RUNX1-RUNX1T1

O plasmídeo contém o gene RUNX1_RUNX1T1, com um tamanho de 107 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 OmniMAX™ 2 T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial.

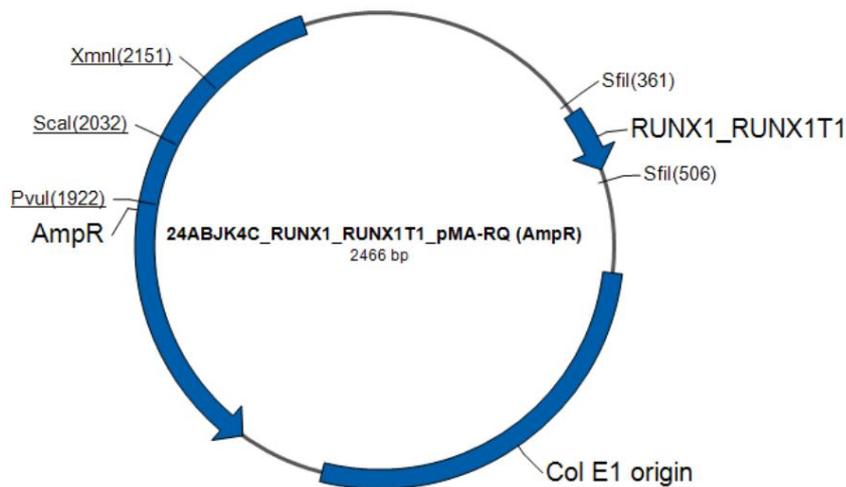


Figura 4 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene RUNX1-RUNX1T1.

15.5 KMT2A-MLLT1

O plasmídeo contém o gene KMT2A_MLLT1, com um tamanho de 301 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 DH10B™ T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial.

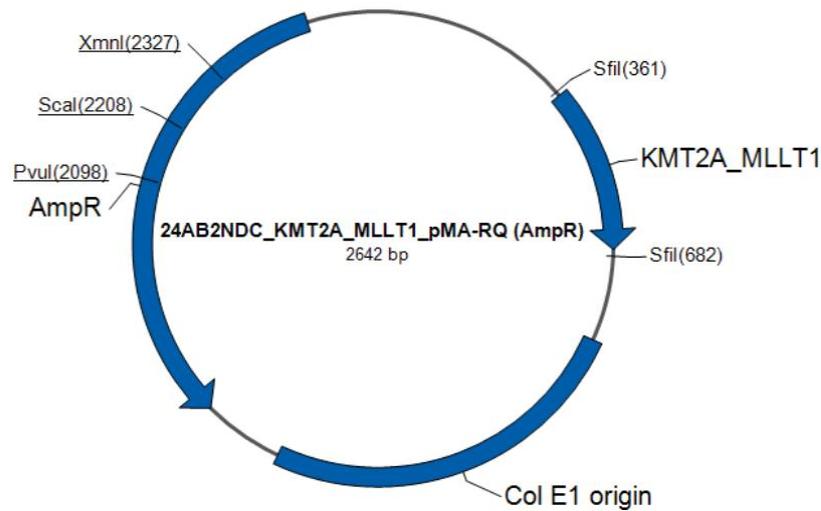


Figura 5 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT1.

15.6 KMT2A-MLLT3

O plasmídeo contém o gene KMT2A_MLLT1, com um tamanho de 233 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 DH10B™ T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial.

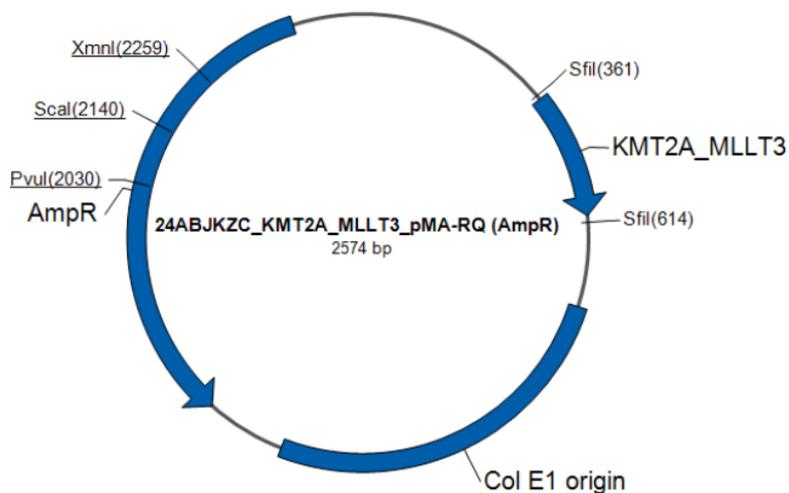


Figura 6 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT3.

15.7 KMT2A-MLLT10

O plasmídeo contém o gene KMT2A_MLLT1, com um tamanho de 378 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-RQ (AmpR) e foi desenvolvido em *E. coli* K12 DH10B™ T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5

μg de DNA plasmidial.

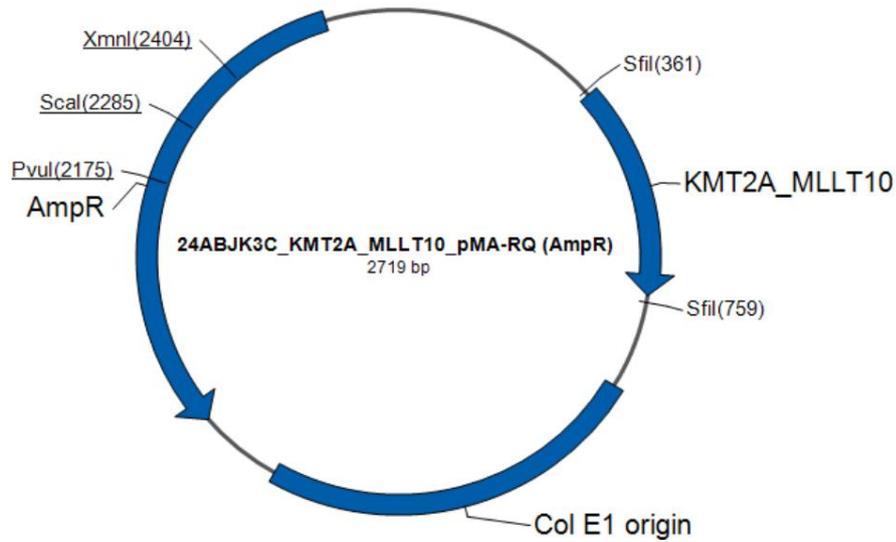


Figura 7 - Estrutura do plasmídeo pMA-RQ (AmpR) contendo o gene KMT2A-MLLT10.

15.8 ABL1

O plasmídeo contém o gene ABL1, com um tamanho de 120 pares de base. Este plasmídeo foi produzido a partir do vetor de *backbone* pMA-T e foi desenvolvido em *E. coli* K12 OmniMAX™ 2 T1R. A quantidade disponível é aproximadamente 5 μg de DNA plasmidial.

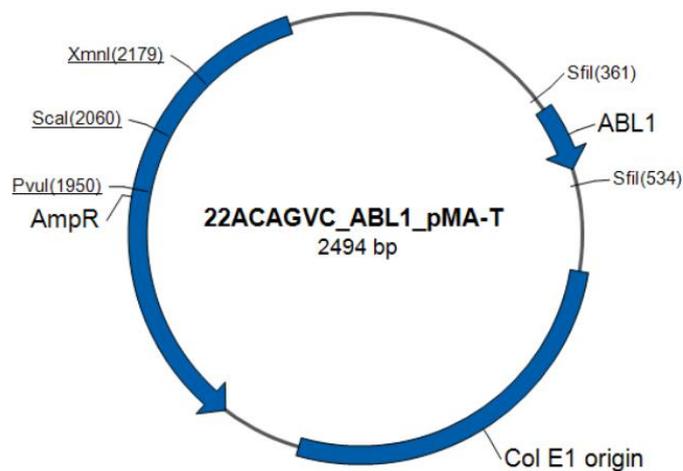


Figura 8 - Estrutura do plasmídeo pMA-T contendo o gene ABL1.