



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

REGISTRO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL DO PROTOCOLO DE
EXPRESSÃO DO GENE *BCR-ABL* PARA DIAGNÓSTICO E MANEJO
DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

IAGO BARROSO RAMOS

BELÉM
2016

REGISTRO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL DO PROTOCOLO DE
EXPRESSÃO DO GENE *BCR-ABL* PARA DIAGNÓSTICO E MANEJO
DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

IAGO BARROSO RAMOS

Solicitação de registro de propriedade intelectual submetido ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da UFPA para obtenção do grau de Mestre em análises clínicas.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos

BELÉM
2016

IAGO BARROSO RAMOS

Banca examinadora:

Dr^o José Alexandre Lemos (orientador) – UFPA-ICB

Dr^a Renata Hermes (membro) – Fundação HEMOPA

Dr^o Carlos Eduardo Amaral (membro) – Fundação HEMOPA

Dr^a Caroline Moreira Nunes (membro) – Universidade Federal do Ceará

Dr^a Letícia Lamarão (Suplente) - Fundação HEMOPA

Belém, 03 de Junho de 2016.

Dedicado à minha amada família.

AGRADECIMENTOS

Nas etapas de nosso crescimento pessoal e profissional enfrentamos toda sorte de desafios. Alguns pequenos, do tipo que surgem diariamente a partir do momento em que acordamos, outros maiores, com os quais vamos nos acostumando à medida que evoluímos.

Existem, contudo, aqueles que parecem simplesmente impossíveis, pelo menos assim pensamos se estamos em uma jornada solitária. Por isso, sou eternamente grato por estar rodeado de pessoas que me fazem ver que para cada problema existe uma solução, que cada desafio é, na verdade, uma oportunidade.

Como não poderia ser diferente, agradeço primeiramente à minha família: minha mãe Socorro, meu pai Adimilson e minha irmã Yara; vocês são a família que todos sonham ter, sempre unida e amorosa.

Agradeço aos amigos do trabalho e de profissão, especialmente a Andreza, Angela, Camila, Carlos, Jairo, Renata, Rodrigo e Thais, com os quais cada dia é uma experiência nova e enriquecedora, não só para crescimento profissional como para evolução como pessoa.

Agradeço a meu orientador o Dr^o José Alexandre Lemos pelas oportunidades e pelos valiosos ensinamentos acerca das ciências da saúde, das pessoas e do mundo.

A Jessica, minha amada, companheira de todas as horas, a luz que tem me guiado nos momentos mais difíceis, com a qual compartilho tudo, com a qual quero dividir uma vida, agradeço por todo o amor, por me fazer uma pessoa melhor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS.....	v
RESUMO.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.....	1
1.1.1 Patogênese.....	1
1.1.2 Histórico e epidemiologia.....	2
1.1.3 Fases da doença.....	3
1.1.4 Tratamento e Respostas.....	4
1.1.5 Diagnóstico e Monitoramento.....	6
2 OBJETIVO.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 PROTOCOLO OTIMIZADO PARA MONITORAMENTO DA LMC.....	9
3.2 PEDIDO DE PATENTE.....	9
4 PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO.....	11
4.1 EXTRAÇÃO DE mRNA.....	11
4.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	12
4.3 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA RQ-PCR PARA DETECÇÃO DOS TRANSCRITOS <i>B2A2</i> E/OU <i>B3A2</i>	13
5 REFERÊNCIAS.....	15
APÊNDICE A: Resumo.....	1
APÊNDICE B: Relatório descritivo.....	1
APÊNDICE C: Reivindicações.....	1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: translocação recíproca t(9:22)(q34;q11) e origem do cromossomo Ph. Adaptado de Terese Winslow: Medical and Scientific Illustration. Washington, DC, 2007 (WINSLOW, 2007).....	1
Figura 2: pontos de quebra dos genes ABL e BCR e seus possíveis transcritos. Adaptado de DEININGER et al., 2000.....	2
Figura 3: leucocitose acentuada observado no sangue periférico; aumento de 400x (A). Característico desvio a esquerda, com presença de células maduras e precursoras; aumento 1000x (B). Imagens do autor.	4
Figura 4: mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe via bloqueio do sítio de ligação do ATP a oncoproteína BCR-ABL. Adaptado de (HUA, 2013).....	5
Tabela 1: volume de reagentes necessário para o preparo do mix; valores em uL.	12
Tabela 2: condições necessárias a transcrição reversa em termociclador.	12
Tabela 3: volume de reagentes para RQ-PCR; valores em uL.	13

LISTA DE SIGLAS

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

Ph – Cromossomo Philadelphia

RQ-PCR – Reação em cadeia mediada pela polimerase quantitativa em tempo real

TKI – Inibidor de tirosina cinase

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa que tem origem na célula tronco hematopoiética (*stem cell*), caracterizada pela translocação cromossômica recíproca t(9;22)(q34;q11), que resulta na junção dos genes *BCR* e *ABL* no cromossomo 22q-, o cromossomo Philadelphia (Ph). Esse gene quimérico codifica uma proteína citoplasmática com atividade constitutiva de tirosina cinase, responsável pela transformação celular e efeitos proliferativos. Diversos exames podem ser executados como auxiliares no diagnóstico da LMC, mas apenas as abordagens citogenéticas, com observação das metáfases e detecção do cromossomo Ph, e por biologia molecular, com a detecção do transcrito específico por RQ-PCR, oferecem a confirmação da LMC, sendo que este último pode ser utilizado como única metodologia para acompanhamento da evolução dos pacientes portadores de LMC pré e pós-terapia com inibidor de tirosina cinase (TKI). Com a introdução dessa nova linha de eficientes fármacos, aumento da sobrevivência dos pacientes e consequente aumento da prevalência, a otimização dos ensaios, que historicamente variam de um centro de diagnóstico para outro, e sua padronização são essenciais para obtenção de resultados representativos do real estado da LMC no portador. Dessa forma, objetiva-se neste trabalho estabelecer o protocolo local de diagnóstico e monitoramento da LMC por RQ-PCR, destacando suas diferenças e vantagens em relação aos protocolos disponíveis e sua possível aplicação na rotina de laboratórios de análise clínica, com a entrada de requerimento de patente para proteção da inovação. O protocolo consiste em um conjunto de técnicas e abordagens que o diferenciam dos atualmente estabelecidos, principalmente no que se refere a análise dos dados obtidos, pois aplica um modelo matemático baseado nos princípios de amplificação da própria RQ-PCR, no qual os valores de Ct são comparados para se obter a variação de expressão; outra vantagem é a diferenciação dos dois principais transcritos, graças ao desenho dos *primers* para regiões conservadas. Com o encaminhamento do registro de patente, espera-se produzir um kit próprio para distribuição comercial.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

1.1.1 Patogênese

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma síndrome mieloproliferativa, de origem clonal, a partir de uma célula-tronco hematopoiética que apresente a translocação $t(9:22)(q34;q11)$, a qual origina o cromossomo “Philadelphia” (Ph)(Figura 1), presente em 90-95% dos casos e a primeira anormalidade cromossômica consistentemente associada a um tipo específico de câncer (MELO, 1996; MUGHAL; GOLDMAN, 2006), e nele o gene quimérico *BCR-ABL*, o qual codifica para uma proteína de fusão com atividade de tirosina cinase aumentada, elemento chave para ativação de vias proliferativas, inibição de apoptose (PI3K/AKT) e de aderência, visto que a aderência ao estroma medular regula negativamente a proliferação celular (DEININGER et al., 2000).

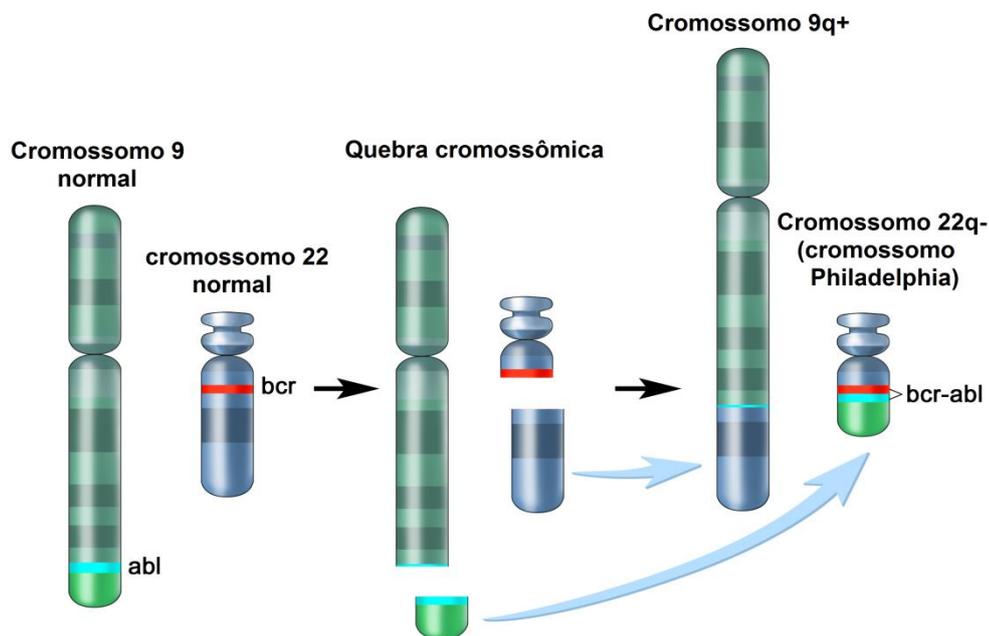


Figura 1: translocação recíproca $t(9:22)(q34;q11)$ e origem do cromossomo Ph. Adaptado de Terese Winslow: Medical and Scientific Illustration. Washington, DC, 2007

Além disso, o gene formado na translocação apresenta certa diversidade de apresentação, que dependerá dos pontos de quebra cromossômica (Figura 2), cujos mRNA quiméricos *b2a2* e *b3a2* são os transcritos predominantes (DEININGER et al., 2000). Os

transcritos codificam para a proteína P210^{BCR-ABL}, podendo ambos os transcritos serem detectados em pacientes portadores da doença, onde a proteína codificada pelo transcrito b2a2 apresenta maior sensibilidade à terapia, revelando um melhor prognóstico para estes casos (LEMOS et al., 2005); os demais transcritos podem apresentar influência nas apresentações clínicas e resposta à terapia (MELO, 1996; SOUZA et al., 2013). Caracteristicamente, o achado inicial no sangue é a neutrofilia, embora toda a linhagem mieloide seja afetada; as séries linfóide, dendrítica e epitelial também podem ser afetadas (WHO, 2008).

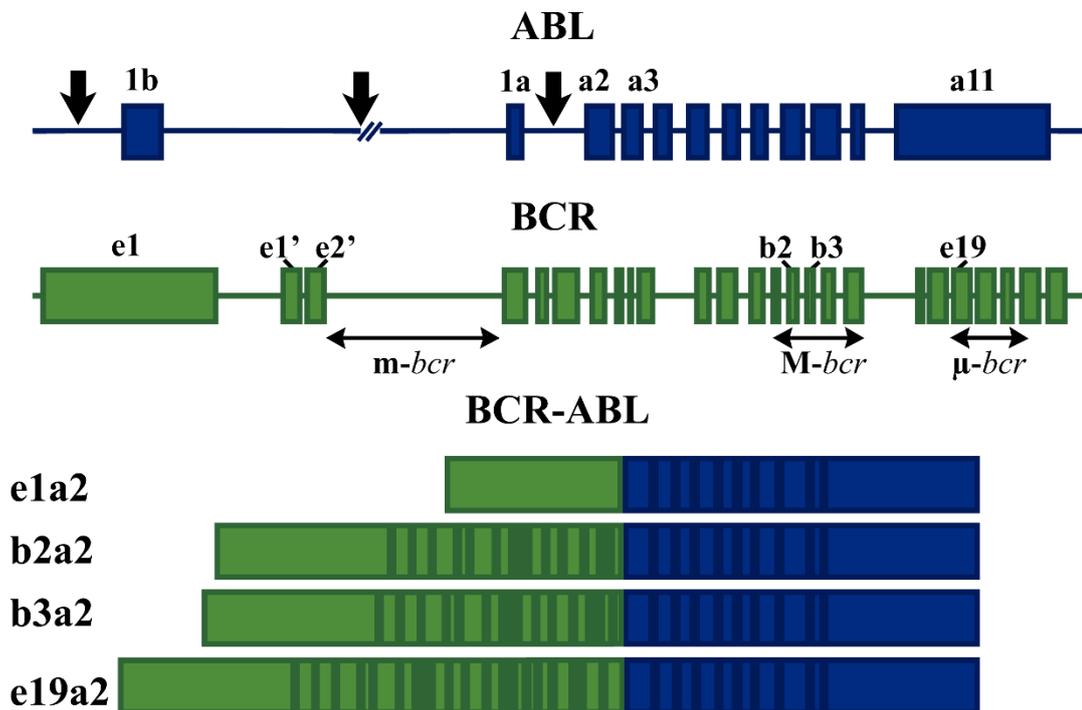


Figura 2: pontos de quebra dos genes ABL e BCR e seus possíveis transcritos.
Adaptado de DEININGER et al., 2000.

1.1.2 Histórico e epidemiologia

A LMC foi primeiro descrita por Craigie, Bennett e Virchow em 1845, relatando o aspecto “purulento” do sangue dos pacientes com a doença e o acentuado aumento das proporções esplênicas (CHAMPLIN; GOLDE, 1985). Apenas em 1960, com abordagens citogenéticas, Nowell & Hungerford observaram a presença de um diminuto cromossomo nos pacientes, posteriormente identificado como sendo um alterado cromossomo 22 (NOWELL, 1985). Com a implantação fluorescência por quinacrina e coloração por giemsa foi possível

visualizar as alterações estruturais entre os cromossomos 9 e 22 e formação do conhecido cromossomo Ph (ROWLEY, 1973).

Apenas em 1990 estabelece-se a ligação definitiva entre o gene quimérico *BCR-ABL* e a LMC, onde a presença desse gene foi capaz de produzir a síndrome mieloproliferativa (FADERL et al., 1999); finalmente, com o advento das técnicas de Biologia molecular, sabe-se hoje que o cromossomo Ph é de fato a gênese da doença, e que a translocação que o produz, citada como t(9:22)(q34;q11), gera dois genes de fusão: o *ABL-BCR* no cromossomo 9q+, sem influência na doença, e o *BCR-ABL* no cromossomo Ph, o qual codifica à tirosina cinase anômala (FUNKE et al., 2010).

Mundialmente, a LMC apresenta incidência de 1 a 2 a cada 100.000 habitantes, com pequena predominância em homens, não havendo grande alteração na incidência nos últimos anos (HÖGLUND et al., 2013; HUANG; CORTES; KANTARJIAN, 2012; WHO, 2008). De fato, apesar desta incidência não apresentar variação, o crescente aumento da prevalência é uma realidade devida principalmente ao sucesso das novas linhas de tratamento (WHITE; HUGHES, 2015), sendo encarada não mais como uma doença iminentemente fatal, mas como uma condição crônica totalmente tratável (VIGANÒ et al., 2014).

É uma doença rara em pacientes com menos de 20 anos (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2006). No Brasil, a mediana das idades afetadas é 10 anos inferior ao observado na literatura internacional (FUNKE et al., 2010). A etiologia da doença ainda hoje é obscura: não há conhecimento de que exista um componente hereditário para a ocorrência da doença, sendo aceitas as radiações ionizantes como causa provável (WHO, 2008).

1.1.3 Fases da doença

A LMC é uma doença evolução indolente, a qual apresenta três fases distinguíveis: fase crônica, acelerada e blástica (ALMEIDA et al., 2009). A fase crônica é marcadamente assintomática, mas observa-se elevada leucometria e o exame de distensão sanguínea em lâmina revela o característico desvio a esquerda, com presença de blastos usualmente em torno de 2% (WHO, 2008). Nesta fase, exames citopatológicos são elucidativos e auxiliam na distinção entre outras leucemias e avaliação da progressão fibrótica no tecido medular, que pode ocorrer no decurso de cinco anos de curso à fase acelerada (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2006).

Na fase acelerada observa-se, no sangue periférico ou medula óssea, a presença de 10 a 19% de células blásticas, basofilia superior a 20%, trombofilia ou trombopenia não relacionada à terapia (SOUZA et al., 2013).

Na fase blástica, observa-se blastos superiores a 20% no sangue periférico ou na medula óssea, além de massiva infiltração blástica extramedular e o surgimento de sarcomas granulócitos, com anemia grave, mal-estar generalizado e muitas vezes com evolução fatal, mesmo sob terapia, o que ocorre devido à produção de novas anomalias cromossômicas e mutações que conferem resistência (ALMEIDA et al., 2009; BACCARANI et al., 2013) (Figura 3).

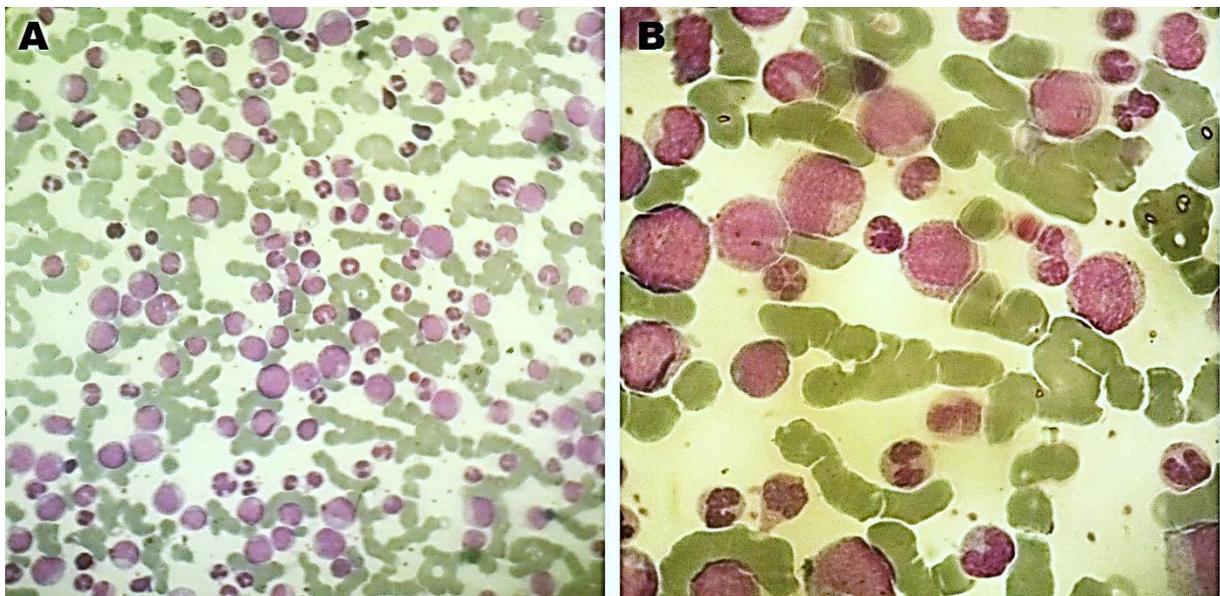


Figura 3: leucocitose acentuada observado no sangue periférico; aumento de 400x (A). Característico desvio a esquerda, com presença de células maduras e precursoras; aumento 1000x (B). Imagens do autor.

1.1.4 Tratamento e Respostas

A introdução dos Inibidores de tirosina cinase (TKI), particularmente com a comprovação da eficácia do Mesilato de Imatinibe (MI), corresponde a um marco no tratamento do câncer. A droga é eficaz e segura, com ótimos resultados mesmo em fases mais graves da doença, mas a precocidade de início do tratamento está diretamente ligada ao bom prognóstico da doença (SCERNI et al., 2009).

O MI possui um mecanismo simples: atua principalmente ocupando o sítio de ligação do ATP no interior da proteína BCR-ABL, impedindo a ativação de uma vasta gama de efetores. O fármaco age induzindo um estado inativo para enzima, graças a sua elevada especificidade, ligando-se unicamente ao sítio da proteína BCR-ABL (MUGHAL; GOLDMAN, 2006) (Figura 4).

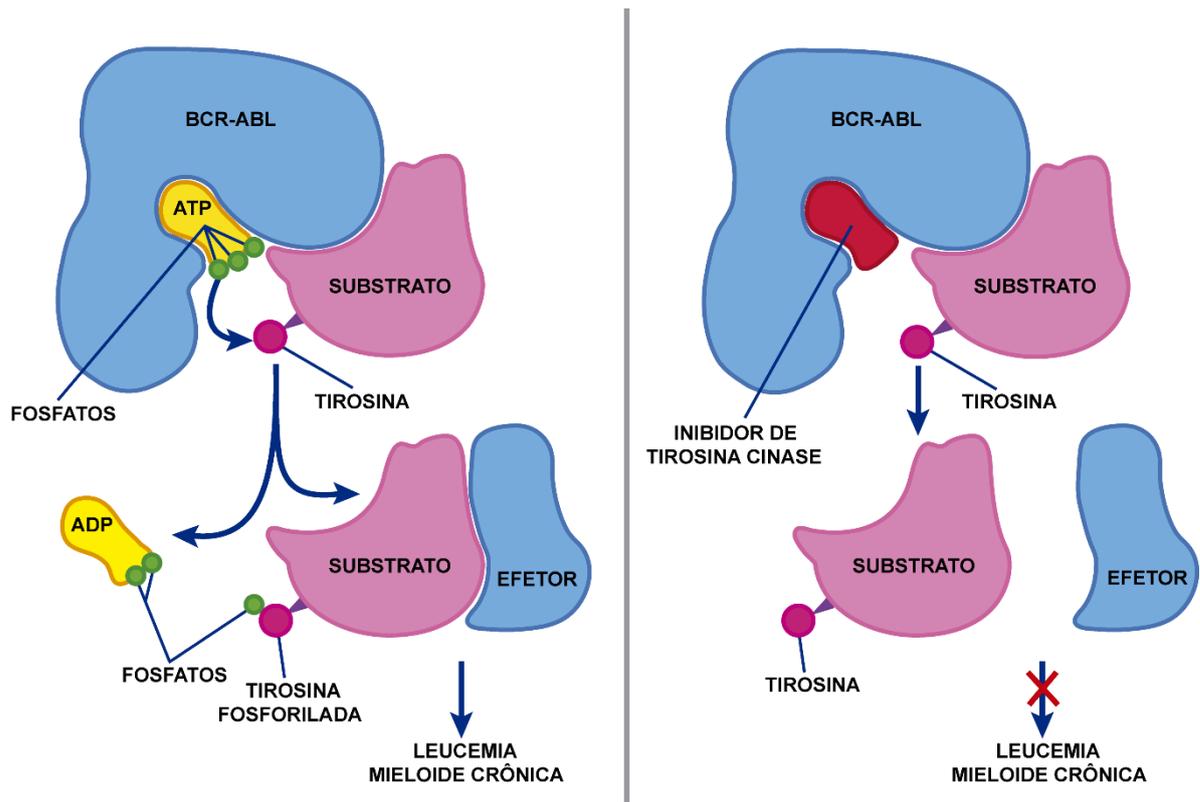


Figura 4: mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe via bloqueio do sítio de ligação do ATP a oncoproteína BCR-ABL. Adaptado de (HUA, 2013).

O principal fator para a manutenção de um tratamento ou sua descontinuidade é a resposta do paciente a terapia. Para tanto, são estabelecidas duas principais respostas: Ótima e Falha. Uma resposta Ótima implica um estado de progressão de vida semelhante ao da população em geral, não havendo necessidade de mudança na terapia. Quando a resposta ao tratamento é Falha, recomenda-se a mudança da abordagem terapêutica, objetivando a diminuição do risco de avanço para fases mais graves da doença. Intermediária às respostas citadas, há a zona de Alerta, onde as características da doença e sua resposta sugerem monitoramento mais frequente, o que facilita a transição a outras abordagens terapêuticas (BACCARANI et al., 2013).

1.1.5 Diagnóstico e Monitoramento

Diversos exames podem ser executados como auxiliares no diagnóstico da LMC, como o hemograma, o qual revelará o aumento característico das contagens leucocitárias, e análises citopatológicas, com destaque ao mielograma e a reação de peroxidase, mas apenas as abordagens citogenéticas, com observação das metáfases e detecção do cromossomo Ph, e por biologia molecular, com a detecção do transcrito específico por Reação em cadeia mediada pela Polimerase em tempo real (RQ-PCR), oferecem a confirmação da LMC, sendo que este último pode ser utilizado como única metodologia para acompanhamento da evolução dos pacientes portadores de LMC anterior e sob tratamento com inibidor de tirosina cinase (TKI) (SAVASOGLU et al., 2015; SOUZA et al., 2012).

A inserção da RQ-PCR para o estudo da LMC foi um notável avanço técnico, que possibilitaria uma ampla compreensão sobre sua evolução e sobre como as diferentes terapias agem sobre a doença. Contudo, anterior a técnica de RQ-PCR, a principal técnica utilizada para quantificação dos transcritos de *BCR-ABL1* era a PCR do tipo competitiva, que consistia na elaboração de um competidor, uma sequência de DNA ou RNA, com pequenas diferenças das sequências alvo. Para assegurar uma amplificação próxima ao observado para os alvos, seriados experimentos de padronização, além da necessidade de equilibrar as concentrações de alvo e competidor na reação de PCR e da manipulação pós-reação (CROSS et al., 1993).

A nova metodologia de tempo real trouxe a possibilidade de análise quantitativa da expressão por dois métodos: a absoluta e a relativa. Na absoluta, o número de cópias do gene é obtido pela relação do sinal obtido no ensaio de RQ-PCR e uma curva padrão; esta admite que todas as amostras ou padrões possuem aproximadamente a mesma eficiência de amplificação e detecção, independente de quaisquer fatores externos ao ensaio (WONG; MEDRANO, 2005). A construção de uma curva padrão para estabelecer comparação e determinar o número de moléculas alvo na amostra é uma etapa obrigatória, que implica a produção por clonagem de plasmídeos contendo as sequências alvo, dispostos em diluições. A curva padrão será obtida pela plotagem dos diferentes valores de Ct obtidos para cada diluição. Desse modo, o número aproximado dos genes alvo presente na amostra dos pacientes é obtido quando comparada a curva padrão (FORONI et al., 2009; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Na relativa, o mesmo sinal obtido é comparado com um calibrador ou um controle interno, um gene constitutivo padrão. A comparação com um gene constitutivo é essencial para

evitar a influência de quaisquer variações de qualidade no RNA obtido na extração, bem como avaliar a eficiência da reação de transcrição reversa, uma compensação que proporciona resultados mais acurados (HUGHES et al., 2003). Dentre os genes constitutivos disponíveis, o *ABL1* é o que melhor atende às exigências de expressão constante nos diferentes tecidos, oferecendo por isso um número seguro de cópias para amplificação e detecção, contornando problemas com amostras de baixa qualidade e falsos positivo (FORONI et al., 2009) Para este último modelo, a análise de expressão é comumente realizada pelo método comparativo de Ct, referido como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

A adoção do RQ-PCR facilitou sobremaneira a obtenção de resultados dos níveis de expressão, independente da abordagem escolhida, mas ainda havia a limitação de comunicação e equivalência de resultados. Números absolutos obtidos durante a quantificação dificultariam a interpretação e não ofereceriam uma base sólida para o acompanhamento da doença. Logo, a inserção da conversão para a escala logarítmica padronizada de base 10 foi um grande passo para a normatização das leituras obtidas, simplificando-as e produzindo a conexão entre o log e as respostas por eles alcançadas, seja em pacientes com redução ou aumento.

Adicionalmente, faz-se necessária a obediência a Escala Internacional (EI), a qual estabelecia o valor de 100% de expressão aos pacientes recém diagnosticados e 0,1% para resposta molecular maior, significando uma diminuição de 3 log, e o uso de um fator de correção laboratório específico. No estudo de Hughes et al (2003), que primeiro introduziu a escala logarítmica padronizada de base 10 para avaliar os valores de *BCR-ABL*, 30 amostras de pacientes recém diagnosticados e em fase crônica da LMC, que ainda não haviam feito uso de TKI, tiveram os resultados da relação Alvo/controlado comparados e a média obtida foi estabelecida como *baseline*, a partir da qual seriam reconhecidos, em escala logarítmica, o aumento ou redução dos transcritos.

De forma geral, o atual estado da arte nos apresenta um processo cujas etapas são compatíveis com grandes centros de pesquisa em LMC, os quais possuem direcionados seus investimentos para essa linha de pesquisa. Sendo assim, por limitações de ordem técnica, a produção de curva padrão em cada reação, o uso de amostras de sangue com volumes superiores a 4 mL e execução do ensaio para amostras em duplicata ou triplicata torna o processo insustentável para os laboratórios de análises clínicas.

2 OBJETIVO

Estabelecer o protocolo local de diagnóstico e monitoramento da LMC por RQ-PCR, destacando suas diferenças e vantagens em relação aos protocolos disponíveis e sua possível aplicação na rotina de laboratórios de análises clínicas, com a entrada de requerimento de patente, para proteção da inovação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLO OTIMIZADO PARA MONITORAMENTO DA LMC

Todas as etapas da rotina de diagnóstico e monitoramento serão descritas em linguagem técnica, desde cuidados relativos a coleta e armazenamento da amostra de sangue total, separação e identificação até a realização das específicas técnicas de extração, transcrição reversa e RQ-PCR; a expressão dos resultados em escala logarítmica obedecerá ao modelo matemático proposto por LEMOS et al. (2005). O novo protocolo terá por base a rotina hoje vigente na Fundação centro de hemoterapia e hematologia do Pará (HEMOPA), destacando suas vantagens em relação aos modelos empregados em outros centros de referência.

3.2 PEDIDO DE PATENTE

O pedido de patente obedecerá às diretrizes estabelecidas pelo Instituto nacional de propriedade industrial (INPI), constantes na Instrução normativa N° 031/2013, que especifica as formalidades para requerimento de patentes, no cumprimento do disposto na Lei de Propriedade Industrial, n° 9279, de 14 de maio de 1996.

O principal pressuposto da validade do pedido de patente é seu caráter de inovação. Por esse motivo, uma pesquisa de anterioridade deverá ser executada na própria base de dados do INPI, afim de avaliar possíveis semelhanças existentes em pedidos já publicados e garantindo a originalidade da solicitação.

Após esta etapa inicial, um resumo, o relatório descritivo e as reivindicações deverão ser elaboradas. O resumo, como forma de apresentação inicial, deve ser sucinto, apresentar de forma clara a área técnica na qual se insere a inovação e o objetivo desta.

O Relatório descritivo é o documento que apresenta todos os detalhes técnicos da inovação, descrevendo a técnica e seus pormenores em linguagem técnica adequado ao modelo de protocolo. Nele deve conter os aspectos que garantem o estado inovador do pedido, os seus efeitos alcançados, descrição do atual estado da arte e o estabelecimento de comparação com o modelo proposto, os problemas enfrentados pelo que se tem descrito na literatura e como o novo modelo propõe solucioná-los, fazendo referência a periódicos ou patentes já publicadas.

As Reivindicações, por sua vez, constituem a apresentação direta dos pontos a da inovação que se pretendem proteger, definindo-os de forma objetiva e com base no apresentado no Relatório descritivo. Todos os documentos obedecerão a formatação apresentada pela instrução normativa Nº 031/2013.

O processo será intermediado pela Univesitec-UFPA, que prestará consultoria aos inventores para elaboração dos documentos exigidos bem como seu direcionamento ao INPI para o depósito da patente.

4 PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO

4.1 EXTRAÇÃO DE mRNA

O espécime utilizado é uma amostra de sangue total coletada por punção periférica em tubo de 4 mL contendo EDTA. Imediatamente após a coleta, a amostra é centrifugada por oito minutos a uma velocidade de 3000 rpm. A camada leucocitária obtida é então coletada com auxílio de pipeta automática. Para contagens normais de leucócitos (<10000), coleta-se 250 µL da camada; para contagens elevadas (>50000) 25-50 µL são suficientes. A amostra é então adicionada a um tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de guanidina tiocianato (TRI Reagent® Solution) para iniciar o processo de lise e extração de RNA, auxiliada por lise mecânica em vortex até obter uma amostra homogênea; segue-se uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, adiciona-se 200 µL de clorofórmio; agita-se no vórtex por 15 segundos até obter uma mistura homogênea e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente. Deve-se centrifugar a amostra a 12000 rcf por 15 minutos e transferir 500 µL da fase aquosa obtida para tubos estéreis de 1,5 mL e desprezar o restante.

Para iniciar a precipitação da amostra, adiciona-se 500 µL de isopropanol absoluto e homogeneiza-se por inversão durante 20 segundos; incubar por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugar a 12000 rcf por 10 minutos. Cuidadosamente, despreza-se o sobrenadante, auxiliado por pipeta automática, sem perturbar o pellet formado. Adiciona-se 500 µL de etanol 75% e homogeneiza-se em vórtex, seguido por centrifugação a 7400 rcf por 5 minutos.

Novamente, despreza-se o sobrenadante, auxiliado por pipeta automática, sem perturbar o pellet formado. Adiciona-se mais 500 µL de etanol 75%, seguido de agitação em vórtex. Uma nova centrifugação a 7400 rcf é executada por 5 minutos.

Retirar o sobrenadante com auxílio da pipeta, tomando cuidado para não aspirar o pellet formado no fundo do tubo, sempre deixando um mínimo de líquido do centrifugado; para a eliminação desse líquido restante, inverte-se os tubos sobre papel toalha até completa evaporação do álcool (aproximadamente 1h); decorrido o tempo, a amostra é hidratada com adição de 20 µL de água destilada aos tubos.

4.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA

A RT-PCR deve ser executada imediatamente após a extração de mRNA, para conservar ao máximo a integridade da amostra. É executada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), cujas quantidades dos reagentes foram otimizadas para obter economia no preparo do mix (tabela 1) sem prejudicar a qualidade da reação. A reação é adaptada ao número de amostras e o volume de reagentes deve ser calculado de acordo.

N° Amostras	Água	Buffer	Primer	dNTP	Transcriptase	Volume Final
1	4,2	2	2	0,8	1	10

Tabela 1: volume de reagentes necessário para o preparo do mix; valores em uL.

O procedimento é executado em capela de fluxo laminar que, anterior ao processo, deve ser limpa e exposta a luz UV por 15 minutos. Em um tubo de 1,5 ml deve-se adicionar as correspondentes quantidades de reagentes e homogeneizar. Adiciona-se 10 µL do mRNA extraído e 10 µL do mix em um tubo de 0,2 ml. O material agora está pronto para ser transcrito em termociclador, sob as seguintes condições:

Temperatura	Tempo	Ciclagem
50°C	2'	1x
95°C	10'	1x
95°C	15"	50x
60°C	1'	

Tabela 2: condições necessárias a transcrição reversa em termociclador.

Ao término da reação obtém-se cDNA, o qual pode ser usado imediatamente ou armazenado a -20°C para estudos futuros.

4.3 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA RQ-PCR PARA DETECÇÃO DOS TRANSCRITOS B2A2 E/OU B3A2

A RQ-PCR pode ser executada imediatamente após a transcrição reversa ou utilizar amostras de cDNA armazenadas a -20°C . O resultado esperado para o procedimento é a obtenção de amplificado cujo correspondente fluorescente será detectado pelo sistema de detecção. O sinal fluorescente será tanto maior quanto a quantidade de cópias presente na amostra original, sendo estas amostras detectadas primeiro durante os ciclos; o ponto onde primeiro se detecta a fluorescência, chamado ciclo limiar (*threshold cycle*, Ct), é o dado bruto de interesse na análise, utilizado para o cálculo de expressão dos genes em teste.

Todo o processo de preparo do mix para a RQ-PCR deve ser executado em capela de fluxo laminar. Cuidados anteriores ao processo devem ser tomados, como a desinfecção das superfícies e pipetas. A exposição por 30 minutos dos materiais a luz UV também é recomendado para maior segurança do processo.

O preparo do mix é feito em três diferentes tubos plásticos de 1,5mL, cada um correspondendo ao gene testado. Dessa forma, cada paciente terá três tubos associados, cada um referente ao gene a ser testado, como segue:

Quantidade de amostras	Master Mix	Água	Assay (ABL, B2A2, B3A2)	Total	cDNA
1	15	10,5	1,5	27	3

Tabela 3: volume de reagentes para RQ-PCR; valores em μL .

Todos os reagentes empregados são os mesmos para todos os tubos, exceto os *assays*, os quais caracterizam qual gene está em teste; recomenda-se o uso de água ultrapura como solvente. Para diminuir o risco de contaminação, deve-se utilizar alíquotas com quantidades suficientes para cada reação.

Os reagentes e a amostra podem ser adicionados a tubos de 0,2 mL ou ser preparados para uma disposição em placa de 96 poços, o que dependerá da quantidade de amostras. Para um laboratório onde a rotina não é regular e a maioria dos pacientes é para monitoramento, a execução em tubos é economicamente preferível.

O resultado obtido do sistema de detecção é o conjunto dos Ct's dos genes em teste, que se referem a cada paciente. Todos devem apresentar expressões detectáveis para o gene de controle endógeno, confirmando que a extração foi bem-sucedida. Caso haja detecção de um ou ambos os transcritos alvo, o Ct será comparado ao Ct do controle, seguindo a fórmula:

$$\frac{2^{-CT (BCR-ABL)}}{2^{-CT(ABL)}} \cdot 10^6$$

Obtém-se desta o resultado de expressão na Escala Internacional (EI), devendo ser adicionalmente multiplicado pelo Fator de correção (FC) do laboratório. Para melhor interpretação, o resultado deve ser convertido a escala logarítmica, podendo-se verificar imediatamente a redução ou aumento do Log para cada transcrito.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. et al. Recomendações para o diagnóstico, tratamento e monitorização da Leucemia Mieloide Crónica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 22, p. 537–544, 2009.
- BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872–884, 2013.
- BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Leucemia Mielóide Crônica : história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 11, p. 3–7, 2006.
- BRANFORD, S. et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3330–3338, 2008.
- CHAMPLIN, R. E.; GOLDE, D. W. Chronic Myelogenous Leukemia: recent advances. **Blood**, v. 65, n. 5, p. 1039–1047, 1985.
- CROSS, N. C. et al. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1929–1936, 1993.
- DEININGER, M. W. N. et al. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343–3356, 2000.
- FADERL, S. et al. The biology of chronic myelogenous leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 164–172, 1999.
- FEDERAL, S. P. **Instrução Normativa**. [s.l: s.n.].
- FORONI, L. et al. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 8, p. 517–522, 2009.
- FUNKE, V. M. et al. Leucemia mieloide crônica e outras doenças mieloproliferativas crônicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 55 41, p. 71–90, maio 2010.
- HÖGLUND, M. et al. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. **Blood**, v. 122, n. 7, p. 1284–92, 15 ago. 2013.

HUA, X. **Gleevec®: Protein Kinase Inhibitor Therapy for Chronic Myeloid Leukemia.**

Disponível em: <<http://www.veomed.com/va041542042010#>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

HUANG, X.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. **Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3123–7, 2012.

HUGHES, T. P. et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 15, p. 1423–1432, 2003.

LEMOS, J. A. R. et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 4, p. 803–11, jan. 2005.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2375–2384, 1996.

MUGHAL, T. I.; GOLDMAN, J. M. Chronic myeloid leukemia: why does it evolve from chronic phase to blast transformation? **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 198–208, 2006.

NOWELL, P. C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 8, p. 19, 1985.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290–293, 1973.

SAVASOGLU, K. et al. Effectiveness of Quantitative Real Time PCR in Long-Term Follow-up of Chronic Myeloid Leukemia Patients. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 25, n. 8, p. 568–572, 2015.

SCERNI, A. C. C. et al. Influence of late treatment on how chronic myeloid leukemia responds to imatinib. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 8, p. 731–4, jan. 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SOUZA, C. A. DE et al. Chronic myeloid leukemia treatment guidelines: Brazilian Association of Hematology, Hemotherapy and Cell Therapy. Brazilian Medical Association Guidelines Project - 2012. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 5, p. 367–382,

2012.

SOUZA, C. A. DE et al. Leucemia mieloide crônica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 220–232, 2013.

VIGANÒ, I. et al. First-line treatment of 102 chronic myeloid leukemia patients with imatinib: A long-term single institution analysis. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 10, p. E184–E187, 2014.

WHITE, D. L.; HUGHES, T. P. Living with CML: is death no longer the end (point)? **Blood**, v. 126, n. 1, p. 2–4, 2015.

WHO. **World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. ed. Lyon: WHO, 2008.

WINSLOW, T. **Philadelphia Chromosome**. Disponível em: <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7153>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005.

ZHANG, T. et al. Inter-Laboratory Comparison of Chronic Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Monitoring. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 4, p. 421–430, 2007.

APÊNDICE A: Resumo

PROTOCOLO DE EXPRESSÃO DO GENE *BCR-ABL* PARA DIAGNÓSTICO E MANEJO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

O presente protocolo consiste de um conjunto de procedimentos e técnicas para o diagnóstico e monitoramento da LMC. O protocolo, de base genética e composto por ferramentas de biologia molecular, utiliza um conjunto específico de sequencias iniciadoras para identificar os genes envolvidos no desenvolvimento da doença. Tais métodos são auxiliares para a criação de uma rotina diagnóstica e de monitoramento da LMC em laboratório de biologia molecular, visando eliminar etapas laboriosas e que apresentam facilidade intrínseca de apresentar contaminação, como a criação de uma curva padrão para cada reação, a qual pode ser substituída por ensaio matemático próprio. Este ensaio matemático usa como principal base o processo de amplificação dentro de cada ciclo, pois o número de cópias dos genes alvo e controle dobram e consequentemente o sinal aumenta de forma semelhante.

APÊNDICE B: Relatório descritivo

PROTOCOLO DE EXPRESSÃO DO GENE BCR-ABL PARA DIAGNÓSTICO E MANEJO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

1. A Leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa, caracterizada pelo aumento significativo no número de granulócitos e seus precursores no sangue periférico e na medula óssea. É uma doença trifásica, atualmente de caráter crônico graças as novas terapias, que apresenta curso indolente e cuja impressão diagnóstica é geralmente obtida em exames hematológicos de rotina.
2. O presente protocolo consiste de um conjunto de procedimentos e técnicas para o diagnóstico e monitoramento da LMC, auxiliar também para a escolha da melhor terapia disponível. O protocolo, de base genética e composto por ferramentas de biologia molecular, utiliza um conjunto específico de sequencias iniciadoras para identificar os genes envolvidos no desenvolvimento da doença expressos pelos pacientes, bem como seus níveis.
3. Das ferramentas componentes, a Reação em cadeia media pela polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR) gera os resultados necessários a análise. Para tanto, diversos protocolos foram desenvolvidos e tentativas de padronização e universalização de resultados surgiram nas últimas duas décadas (BACCARANI et al., 2006, 2013; CROSS et al., 2008; LANGE; DEININGER, 2010; WANG; BROWN, 1999).
4. Um maior número de metodologias possibilitou maior compreensão dos eventos que interferem na análise dos níveis de expressão nos pacientes, mas gerou também dúvida sobre qual metodologia é a mais indicada para uso em rotina e se os resultados obtidos em cada uma são equivalentes (ZHANG et al., 2007).
5. Para cada procedimento há também a necessidade de comparação dos níveis de expressão gênica, o que exige o uso de controles endógenos e, para diversos protocolos, o uso de uma curva padrão. A construção de uma curva padrão para estabelecer comparação e determinar o número de moléculas alvo na amostra é uma etapa obrigatória, que implica a produção por clonagem de plasmídeos contendo as sequencias alvo, dispostos em diluições seriadas de 100000 a 10 moléculas. A curva padrão será obtida pela plotagem dos diferentes valores de Ct obtidos para cada diluição.

6. Desse modo, o número aproximado dos genes alvo presente na amostra dos pacientes é obtido quando comparada a curva padrão. A construção dessa curva configura um processo analítico mais demorado e dispendioso, tendo em vista a necessidade de produção de padrões com plasmídeos (FORONI et al., 2009; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).
7. Ao final da análise por RQ-PCR, com obtenção dos valores numéricos brutos relativos a expressão dos genes alvo, faz-se necessário o uso de uma escala numérica padronizada. No estudo de Hughes et al (2003), que primeiro introduziu a escala logarítmica padronizada de base 10 para avaliar os valores de BCR-ABL, 30 amostras de pacientes recém diagnosticados e em fase crônica da LMC, que ainda não haviam feito uso do medicamento Inibidor de Tirosina Cinase (TKI), tiveram os resultados da relação Alvo/controlado comparados e a média obtida foi estabelecida como baseline, a partir da qual seriam reconhecidos, em escala logarítmica, o aumento ou redução dos transcritos.
8. Descreve-se ainda que não é necessário saber a baseline de cada indivíduo, isto é, seu estado inicial de expressão dos genes alvo, para calcular as variações de expressão gênica subsequentes, visto que isso seria feito baseado na padronização descrita. Ainda hoje o cálculo da baseline é utilizado de forma semelhante, onde são considerados os valores médios de expressão ao diagnóstico em cada laboratório. Essa abordagem otimiza a avaliação, mas também não leva em conta as características particulares da apresentação da LMC em cada indivíduo.
9. No tocante a universalização do método, a continuidade de um paciente em um único laboratório para o seguimento de seu tratamento oferece evidentemente vantagem, pois se estaria sujeito sempre às mesmas condições de análise e de interpretação clínica. Contudo, justifica-se a necessidade de consenso na interpretação dos resultados exatamente por englobar opiniões clínicas comuns de diferentes especialistas, por facilitar a mobilidade do paciente caso haja necessidade de mudança para outro local de atendimento e por auxiliar na produção de dados para pesquisa (BRANFORD et al., 2008).
10. De forma geral, o atual estado da arte nos apresenta um processo cujas etapas são compatíveis com grandes centros de pesquisa em LMC, os quais possuem direcionados seus investimentos para essa linha de pesquisa. Sendo assim, por limitações de ordem técnica, a produção de curva padrão em cada reação, o uso de amostras de sangue com volumes superiores a 4 mL e execução do ensaio para amostras em duplicata ou triplicata torna o processo insustentável para os laboratórios de análises clínicas (Reivindicação 1).

11. Esta invenção tem como principal objetivo oferecer um conjunto de métodos e condutas que possibilitem a criação de uma rotina diagnóstica e de monitoramento da LMC em laboratório de biologia molecular, eliminando etapas laboriosas e que apresentam facilidade intrínseca de apresentar contaminação, como a criação de uma curva padrão dentro de cada reação, a qual pode ser substituída por ensaio matemático próprio, desenvolvido baseado nos fundamentos da própria técnica. Este ensaio matemático usa como principal base o processo de amplificação dentro de cada ciclo, pois o número de cópias dos genes alvo e controle dobram e conseqüentemente o sinal aumenta de forma semelhante.

12. A relação entre os genes só é possível por que para controle é usado um gene constitutivo (*ABL*), o qual apresenta obrigatoriamente uma expressão fixa para cada paciente, mas em virtude de as amostras passarem por um processo de extração cuja eficiência pode variar, os valores também podem variar de um paciente para outro. Como ambos os genes, controle e alvo são submetidos às mesmas condições, é segura a manutenção da relação de expressividade, onde o gene controle é encarado como um limiar de normalidade e por isso permite a avaliação se o gene alvo, causador da LMC, apresenta expressão e se essa expressão pressupõe um aumento de log ou sua redução, dados necessários para compreensão prognóstica.

13. Essas características permitem ao operador a execução da técnica sustentada por bases matemáticas e biomoleculares, sujeitas a variações muito menores no processo de execução se comparadas às metodologias atuais, bases essas que oferecem a possibilidade de obter resultados acurados de forma equivalente ou superior aos adotados atualmente e comercialmente disponíveis.

14. Toda análise de expressão exige máximo cuidado com o espécime a ser analisado. Por se tratar de uma amostra rotineira, coletada em tubo de 4mL e com anticoagulante EDTA, esta deve ser empregada unicamente para a análise de expressão e enviada de imediato ao laboratório para ser conservada em trizol, podendo ser armazenada a -20 ou encaminhada diretamente para análise, preferencialmente este último caso.

15. O protocolo completo compreende três etapas críticas para a obtenção dos resultados brutos de expressão do gene controle e dos alvos: a extração, realizada pelo método de trizol-clorofórmio; a transcrição reversa (RT-PCR), com a obtenção do cDNA a partir do RNA extraído; por último a reação em cadeia mediada pela polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR). Desta última etapa obtém-se os dados de expressão baseados no Ct, ciclo em que primeiro é detectado o sinal correspondente à amplificação, que serão aplicados ao modelo matemático para sua conversão a escala logarítmica, na qual pode-se interpretar a presença de variação na expressão.

16. O modelo matemático aqui exposto segue a base biológica de presença de dois alelos expressos, que contribuem para o nível de expressão, além do processo de amplificação que ocorre em cada ciclo, dobrando o número de cópias do produto que obtivemos no ciclo anterior (LEMOS et al., 2005), de onde depreende-se:

$$\frac{2^{-CT (BCR-ABL)}}{2^{-CT(ABL)}} \cdot 10^6$$

Figura 1: fórmula para cálculo da expressão dos transcritos do gene *BCR-ABL*

17. Desse modo, a quantificação será baseada na razão entre o gene Alvo (*BCR-ABL*) e o controle endógeno (*ABL*) (Reivindicação 3).

18. Uma grande limitação observada em protocolos anteriores é ausência de detecção diferenciada para os principais transcritos relacionados a LMC. Graças ao desenho de *primers* com sequências específicas, que complementam regiões conservadas de cada transcrito, obtém-se não somente a detecção da doença, mas qual ou quais transcritos cursam para seu desenvolvimento. Este é um avanço importante para o manejo da doença, pois diferentes transcritos podem influenciar na evolução da doença e, conseqüentemente, na terapia escolhida (SOUZA et al., 2013).

19. Para detecção do gene *ABL* temos a sequência *TTGTGGCCAGTGGAGATAACAC* como primer direto, a sequência *GCTTCACACCATTCCCCATTG* como primer reverso e a sequência *CCGGAGCTTTTACCTTT* para a sonda acoplada ao agente fluorescente.

20. Para detecção do gene *B2A2* temos a sequência *AGCATTCCGCTGACCATCAATAA* como primer direto, a sequência *AGGCTCAAAGTCAGATGCTACTG* como primer reverso e a sequência *CTGAAGGGCTTCTTCC* para a sonda acoplada ao agente fluorescente.

21. Para detecção do gene *B3A2* temos a sequência *GTTTCTGAATGTCATCGTCCACTCA* como primer direto, a sequência *GATGCTACTGGCCGCTGAA* como primer reverso e a sequência *CAGAGTTCAAAGCCC* para a sonda acoplada ao agente fluorescente (Reivindicação 2).

22. Para todos, o agente fluorescente é a Amidita de fluoresceína (FAM), para detecção nas plataformas de tempo real disponíveis.

APÊNDICE C: Reivindicações

PROTOCOLO DE EXPRESSÃO DO GENE *BCR-ABL* PARA DIAGNÓSTICO E MANEJO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

1. Protocolo de expressão do gene *BCR-ABL*, caracterizado pelo conjunto de metodologias para diminuição do tempo de execução dos testes e diminuição do volume de amostra necessária.
2. Protocolo de expressão do gene *BCR-ABL* para detecção específica dos principais transcritos envolvidos na doença, caracterizado pelo fato de utilizar *primers* com sequências específicas para os transcritos mais prevalentes.
3. Protocolo de expressão do gene *BCR-ABL* que dispensa o uso de curva padrão para cada reação, caracterizado pelo fato de utilizar modelo matemático baseado nas características intrínsecas a técnica de PCR em tempo real para obtenção dos resultados de expressão.