

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES CONTIDOS NO ÉXON 9 DO GENE CALR ASSOCIADOS AO FENÓTIPO DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Gregório Rossetto Machado (PIBITI/FA), e-mail: gregmachado@gmail.com, José Renato Pattaro Junior (Co-Orientador), e-mail: pg70488@uem.br, Quirino Alves de Lima Neto, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Bioquímica e Biologia Molecular

Palavras-Chave: CALR, mutação, PCR, neoplasias, mieloproliferativas

Introdução

O gene *CALR* apresenta mutações heterogêneas do tipo indel, localizadas no éxon 9, que codifica a porção C-terminal da chaperona calreticulina. Essas mutações estão predominantemente ligadas a um tipo de neoplasia mieloproliferativa (NMP) chamada trombocitemia essencial. Essa condição se caracteriza por trombocitose, risco aumentado de eventos trombóticos/hemorragicos e evolução clonal para fase blástica ou mielofibrose. Assim, o estudo das principais mutações no gene *CALR* associadas ao desenvolvimento de NMPs é crucial para um diagnóstico abrangente e de alta resolução, ao qual precisa fornecer informações sobre o status mutacional do gene, permitindo auxiliar na classificação, prognóstico e escolhas terapêuticas.

Problema

A técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) é o padrão ouro para diagnóstico de NMPs. No entanto, é uma técnica cara e realizada em grandes centros utilizando painéis oncológicos importados. Devido à grande importância para o prognóstico de NMPs, nosso laboratório está desenvolvendo um painel genético nacional, no qual o gene *CALR* está incluso em conjunto com outros 8 genes associados a NMPs. Assim, foi realizada neste trabalho a padronização da amplificação por PCR de uma região do éxon 9 do gene *CALR*.

Solução e Benefícios

Como resultado, foi possível desenvolver *primers* específicos para amplificação por PCR da região do éxon 9 do gene *CALR* (Figura 1), que serão incorporados ao painel de genes que está em desenvolvimento pelo Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM).

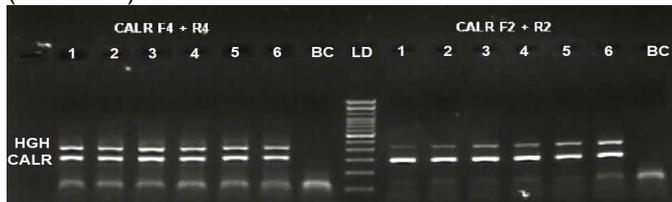


Figura 1. Teste final de amplificação da região do gene *CALR* para identificação da mutação no éxon 9 com os pares de

Potencial de Mercado e Diferencial Competitivo

Acreditamos que em um breve período de tempo, a tecnologia de NGS substituirá boa parte dos atuais procedimentos e poderá ser financiada pelo SUS. Assim, com o desenvolvimento deste painel com os *primers* para o éxon 9 do gene *CALR*, tanto setor público quanto o privado serão beneficiados com um produto mais barato e com as facilidades de logística de insumos produzidos nacionalmente.

Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos nos testes realizados, conclui-se que, em razão da obtenção de reações satisfatórias, com padronizações eficientes e eficazes para amplificação do éxon 9 do gene *CALR* em PCR, será possível ser incorporado ao painel em desenvolvimento pelo LIG-UEM e contribuir para a diminuição do custo e tempo para liberação dos resultados que ajudarão na classificação, prognóstico e decisões terapêuticas.

Estágio de Desenvolvimento da Tecnologia

TRL/MRL 4. A validação da amplificação foi realizada em ambiente de laboratório utilizando experimentais básicos para um laboratório de biologia molecular. Foi verificada uma boa amplificação que foi reproduzida com amostras de diferentes pacientes e os *primers* para o gene *CALR* puderam ser multiplexados com os *primers* para *HGH* sem problemas.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho. E, também um agradecimento especial aos professores Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer e Dr. José Renato Pattaro Junior pela orientação ao longo de toda pesquisa.

Contato Institucional

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde; sec-dbs@uem.br; (44) 3011-4833.



primers CALR F4 + R4 e CALR F2 + R2