

# Caracterização de Marcadores Circulantes no Linfoma de Hodgkin Clássico (LHc): Explorando o conceito de “biopsia líquida”

Elilson Veloso<sup>a</sup>, Gabriela Vera-Lozada<sup>a</sup>, Rocio Hassan<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Oncovirologia, CEMO, INCA, Rio de Janeiro, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O Linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é uma neoplasia hematológica de origem B que apresenta composição peculiar dentre os demais tipos de cânceres, pois apenas 0,5-1% da massa tumoral corresponde as células malignas, chamadas de Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS). O microambiente tumoral por sua vez, compõe a maior parcela da massa tumoral, sendo formado por estroma, matriz e um infiltrado inflamatório composto de células do sistema imune. Nos últimos dois anos, imunoterapias que tem como alvo PD1 foram aprovadas pela FDA como segunda linha de tratamento em pacientes com LHc. Isto se deve ao fato de que em 97% dos casos com LHc foram observadas alterações na região cromossômica 9p24.1, dos quais 56% apresentavam alteração no número de cópias nessa região, onde estão localizados os genes que codificam *PDL1*, *PDL2* e *JAK2*, dentre outros. As alterações nessa região foram relacionadas à maior expressão de PD-L1, menor sobrevida livre de progressão, além de terem sido mais frequentes em estágios avançados da doença. Assim, dadas as limitações técnicas impostas pela escassez de células tumorais no LHc e a amplitude do acometimento do eixo PD1-PD1L nesta doença, a abordagem de “biopsia líquida” pode ser útil para identificar alteração de número de cópias (CNV) dos genes PD-L1, PD-L2 e JAK2 em DNA circulante (ctDNA), ao diagnóstico e monitoramento da doença.

## OBJETIVO

Análise de polimorfismo de número de cópias do gene PD-L1 a partir de ctDNA plasmático em pacientes de linfoma de Hodgkin clássico por meio de qPCR em tempo real.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do plasma, extração e quantificação de DNA, análise de CNV de PD-L1 por PCR em tempo real

### Extração de DNA a partir de amostras de plasma

Visando a padronização da técnica para obtenção de DNA circulante proveniente do plasma, inicialmente foram comparadas amostras de plasma fresco (extração nas 4 primeiras horas após coleta) vs. congeladas (-80°C) de doadores saudáveis (N=10) e de LHc (N=8). Para a separação do plasma, as amostras de sangue periférico colhidas em tubos com EDTA foram submetidas a centrifugação a 1.600 rpm por 10 minutos. O plasma obtido foi submetido a uma centrifugação adicional avaliando dois perfis diferentes em cada alíquota: 1) dois minutos a 10.000 rpm e 2) 10 minutos 16.000g. De ambas centrifugações foram obtidas 2 novas porções de plasma separadas (sobrenadante e fundo do tubo), as quais foram submetidas para a extração de DNA pelo kit QiaCube (Qiamp DNA Blood mini kit, Qiagen) utilizando 400uL de amostra.

### Quantificação do DNA

As amostras foram submetidas a três métodos de quantificação: 1) espectrofotometria pelo Nanodrop, 2) fluorimetria pelo Qubit dsDNA de alta sensibilidade e, 3) quantificação absoluta por qPCR, utilizando uma curva padrão formada por diluições seriadas (6 log) de plasmídeos que continha o segmento de interesse do gene b2-microglobulina.

### Análise de número de cópias de *PDL1* por PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação do número de cópias de *PDL1* foi realizada mediante a metodologia TaqMan® (Hs03704252\_cn, Applied Biosystems; 5' FAM – 3' MGB), usando como gene referência RNaseP (*Taqman® Copy number Reference Assay, RnaseP, Human, Applied Biosystems*; 5' VIC – 3' TAMRA), no instrumento *Vii7*. O ensaio para o gene alvo (*PDL1*) amplifica e quantifica este gene, enquanto que o ensaio referência amplifica a sequência que sabidamente ocorre em duas cópias no genoma diploide (*RNaseP*). O valor de Ct foi obtido usando um valor de threshold fixo e *baseline* automático. O número de cópias de *PDL1* foi calculado pelo algoritmo do *software CopyCaller*, a partir dos dados  $\Delta Ct$ .

## RESULTADOS

**Obtenção e quantificação do DNA:** As quantificações realizadas por espectrofotometria (Nanodrop) apontam para uma maior quantidade de DNA detectado no sobrenadante do plasma em todas as situações analisadas. As amostras de plasma congelado (-80°C) obtiveram maiores médias de DNA circulante, tanto as amostras que passaram por uma centrifugação única (2 minutos a 10.000rpm) como aquelas submetidas a uma centrifugação adicional a 16.000g por 10 minutos (média de 0,8 ng/uL para as amostras frescas e 1,58 ng/uL para as congeladas,  $p=0,045$ ) (Tabela 1). As amostras que passaram pela centrifugação adicional (16.000g a 10 minutos) apresentaram maior média de DNA circulante. Considerando os diferentes grupos de amostras (fresco, congelado, sobrenadante e fundo do tubo) a média de DNA obtido das amostras de paciente de LHc foi superior à dos doadores saudáveis (8,2 ng/uL vs. 2 ng/uL respectivamente;  $p=0,02$  |)

Ao contrário do que ocorreu na quantificação por espectrofotometria, o DNA obtido do fundo do tubo apresentou maiores concentrações na quantificação realizada pelo método de fluorimetria (Qubit dsDNA HS).

**Análise do número de cópias de *PDL1* por PCR em tempo real (qPCR):** Em 8 amostras foi avaliada a performance das sondas para *PDL1* e *RNaseP* em reações de qPCR simples e duplex, diferenças significativas não foram observadas no desempenho da amplificação ( $p>0,05$ ; teste de Mann-whitney). O teste de eficiência através da qPCR revelou uma eficiência acima de 95% tanto para *PDL1* como para *RNaseP* (Figuras 1A e 1B). Através da análise dos dados de  $\Delta Ct$  obtidos no experimento da curva de diluição foi possível observar que o número de cópias calculado para *PDL1* não apresentou uma variação notável entre os pontos da curva para um mesmo DNA (Figura 2). Na análise do número de cópias de *PDL1* foi observado que no grupo de doadores saudáveis apresentou uma média de 2,09 cópias tanto para DNA genômico como para DNA plasmático (Figura 3). As linhagens celulares MCF7 e L428 apresentaram 1,71 e 1,93 cópias, respectivamente.

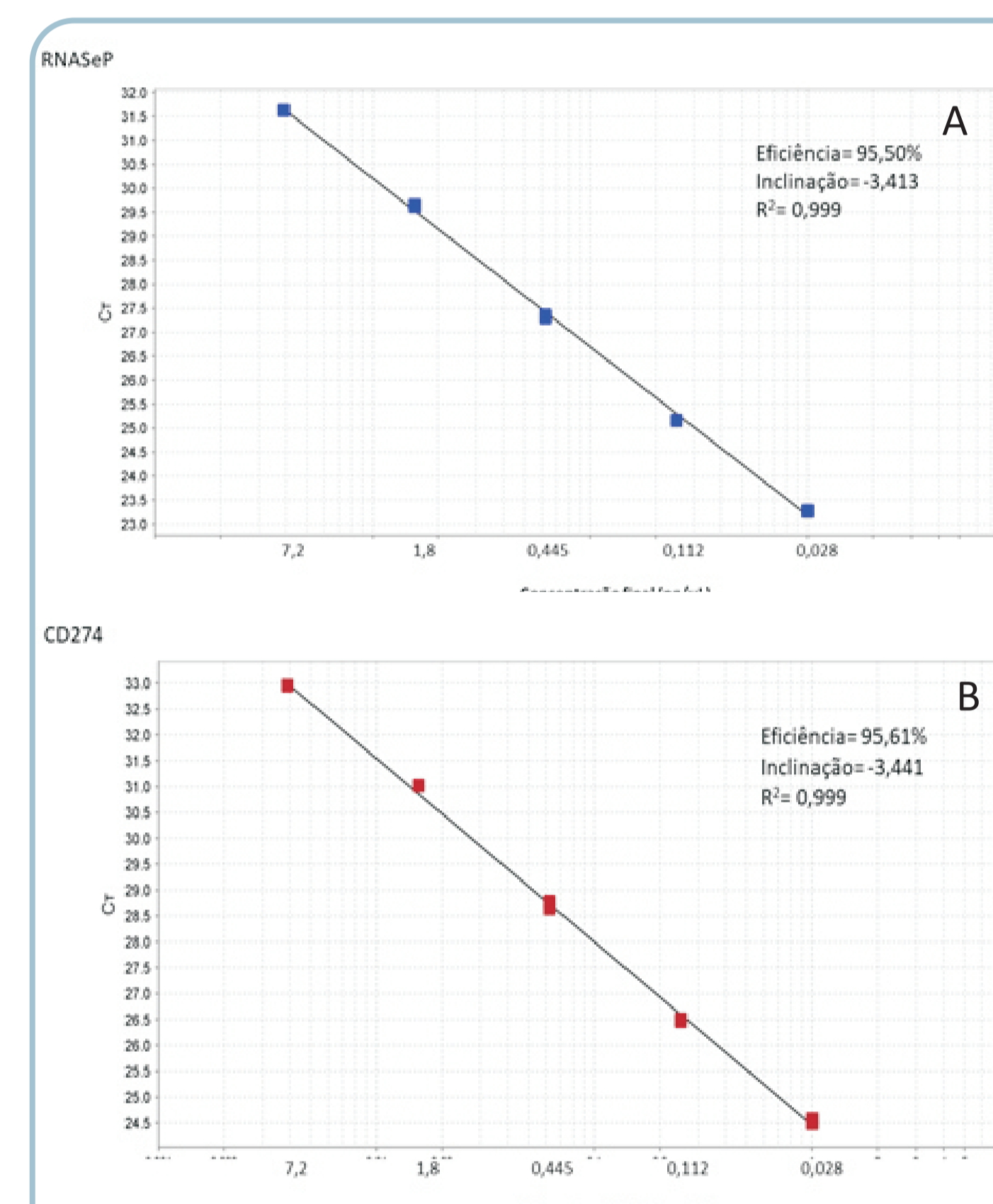


Figura 1: Curvas de eficiência para os genes estudados no número de cópias por qPCR. A: gene de referência RNaseP; B: gene alvo CD274 (*PDL1*).

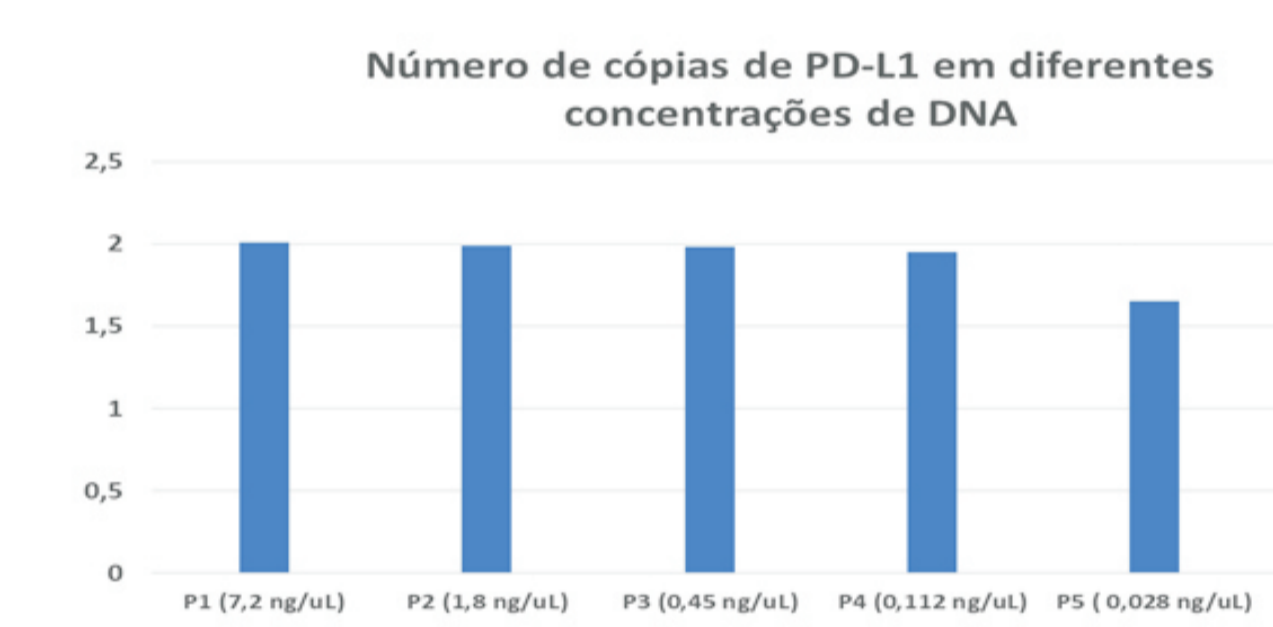


Figura 2: Número de cópias de *PDL1* em cada uma das concentrações de DNA utilizadas nos pontos da curva de eficiência por qPCR. Estes resultados foram obtidos através do *software CopyCaller V 2.1*.

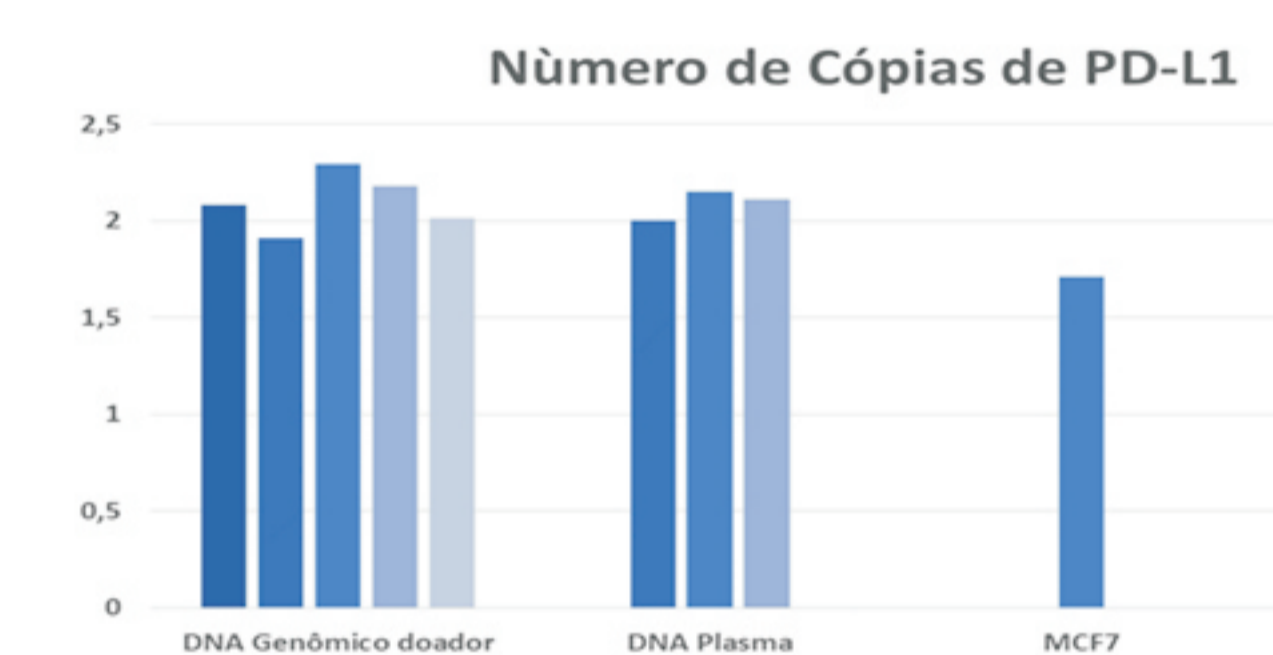


Figura 3: Número de cópias de *PDL1* em DNA de doadores saudáveis por qPCR. Estes resultados foram obtidos através do *software CopyCaller V 2.1*.

## CONCLUSÕES

- ❖ A concentração média de DNA circulante detectada pelo Qubit dsDNA foi menor que a apresentada pelo Nanodrop, o que de certa forma é concordante com a natureza da metodologia de quantificação e do próprio plasma.
- ❖ A quantificação de DNA circulante obtido de plasma por espectrofotometria deve ser evitada sempre que possível, devendo-se dar preferência a métodos mais específicos, como a fluorimetria.
- ❖ Tendo em vista que não há um consenso no que diz respeito ao cutoff para o número normal de cópias de *PDL1*, uma série de DNAs genômicos e plasmáticos se encontram em análises para assim conseguir determinar tal parâmetro.
- ❖ O número amostral de DNA de doadores saudáveis até a presente data precisa ser incrementado.

## PERSPECTIVAS

- ❖ Incrementar a análise de CNV de *PDL1* a partir de ctDNA extraído do plasma de indivíduos saudáveis e iniciar a análise no ctDNA de pacientes com LHc.
- ❖ Investigar o estado de amplificação da região 9p24.1 por hibridização in situ fluorescente (FISH) nos linfonodos de pacientes com LHc que tenham tido sua amostra avaliada por qPCR.
- ❖ Comparar os resultados obtidos por qPCR e PCR digital.