



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

THAÍS LIMA DE SENA

Desenvolvimento de Teste Molecular de Triagem Neonatal para Quantificação de TREC e KREC

Orientador: Prof. Dr. Daniel M. P. Ardisson-Araújo

Coorientador: Dr. Miguel de Souza Andrade

Brasília, 2025



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Thaís Lima de Sena

Desenvolvimento de Teste Molecular de Triagem Neonatal para Quantificação de TREC e KREC

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Daniel M. P. Ardisson-Araújo
Coorientador: Miguel de Souza Andrade

Brasília, 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel M. P. Ardisson-Araújo (presidente, orientador)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido (membro interno)
Universidade de Brasília

Dr. Gustavo Barcelos Barra (membro externo)
Sabin, Diagnóstico e Saúde

Dra. Karina Mescouto de Melo (membro suplente)
Hospital da Criança de Brasília – HCB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que realiza e me gratifica em minha vida. Com Ele, tudo posso. Ao meu orientador Professor Dr. Daniel M. P. Ardisson-Araújo, pela oportunidade de realizar esse projeto, pela orientação e confiança no meu trabalho, e por todas as contribuições para o meu crescimento como pesquisadora;

Ao meu coorientador Dr. Miguel de Souza Andrade, pela paciência, resiliência e disponibilidade, pelo apoio, incentivo contínuo, por todos os ensinamentos, oportunidades e por todo o conhecimento e experiência que me passou para realização do projeto que me fez crescer como pesquisadora, profissional e como pessoa. Obrigada por confiar em mim até quando eu mesmo duvidava.

A minha mãe, Maria da Cruz, meu irmão Renilson Júnior, e cunhada Bia, pela paciência durante essa jornada, por serem meus incentivadores e exemplos, por todo carinho, amor e paciência. A Pandora e Mei, minhas filhas caninas por me acalmarem e me acompanharem por noites e dias pesquisando e escrevendo e me distraindo quando necessário;

Ao Lincoln, meu namorado, companheiro, amigo e confidente, por vibrar as minhas conquistas, por ser ombro amigo nos momentos difíceis, o maior incentivador que tive, pelo companheirismo, amizade e segurança, e principalmente por todo o amor que me proporciona. Juntos nós conseguimos;

Aos meus amigos, pela presença e apoio constantes, pelas conversas, conselhos e desabafos, pela paciência, companheirismo e carinho ao longo dos anos e dessa etapa tão importante;

Aos colegas do Laboratório de Virologia de Insetos – LAVI, em especial a Ethiane Rozo, por todos os ensinamentos, conselhos e amizade. E aos colegas do Setor de Biologia Molecular do Laboratório Sabin Diagnóstico e Saúde, obrigada pelo apoio, companheirismo e ensinamentos, em especial à Dra. Lara Franciele Velasco, coordenadora do setor, que é um dos alicerces da minha carreira profissional, uma pessoa dedicada, humana, e uma chefe e colega de trabalho excepcional. Ao Rafa por todos os conselhos e por me incentivar a iniciar esse projeto. A Cissa pela amizade e por me escutar em todos os momentos. Obrigada por todas as conversas, conselhos e incentivo. A Yanara Costa, que passou por todos os momentos de construção desse teste comigo, foi minha dupla, minha confidente de causas, cuidou como se fosse um trabalho dela própria. Obrigada por tudo Narinha, sem você seria bem mais difícil do que foi. A

Aryadne Oliveira também pelo envolvimento direto nesse projeto, pela ajuda, paciência, suportar comigo os perrengues, desafios e por todo o carinho até o parto desse filho que tem várias mães;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e a UnB pelos aprendizados;

Ao Laboratório Sabin novamente, que financiou este projeto, bem como o Hospital da Criança de Brasília, na pessoa do Dr. Claudiner, pelo incentivo e troca de amostras para comparabilidade dos testes.

A todos que, de alguma forma, me auxiliaram e fizeram a diferença para a realização deste projeto, bem como, a todos que contribuíram para minha formação acadêmica e crescimento profissional. Muito obrigada.

RESUMO

Durante a maturação linfocitária, a recombinação somática dos receptores de antígenos gera círculos de DNA extracromossômicos, conhecidos como TREC (círculos de excisão de células T) e KREC (círculos de excisão de células B). A quantificação desses marcadores permite avaliar a competência do sistema imunológico, sendo fundamental para o rastreamento de imunodeficiências primárias, como a síndrome de DiGeorge, a agamaglobulinemia ligada ao X e a imunodeficiência combinada grave (SCID). A SCID é uma doença genética rara caracterizada por comprometimento da funcionalidade dos linfócitos T, B e/ou células NK, tornando os recém-nascidos altamente suscetíveis a infecções persistentes e recorrentes. Se não diagnosticada precocemente, a SCID pode levar a óbito nos primeiros meses de vida ou causar sequelas severas caso o tratamento seja tardio. Este estudo validou um ensaio de qPCR multiplex para a triagem neonatal da SCID e outras imunodeficiências, baseado na quantificação dos TRECs e KRECs. Para a padronização, foram utilizados plasmídeos como calibradores, além de 181 amostras biológicas para validação analítica e clínica. A análise envolveu o comparativo com 2 laboratórios de apoio que já realizam o teste: laboratório de Apoio 1 com 57 amostras de recém-nascidos, laboratório apoio 2 com 40 amostras e 84 amostras foram utilizadas em comparação com o kit comercial NeoScreen SMA/TREC/KREC Real-Time Detection da empresa DNA Technology. O DNA foi extraído de discos de 3 mm de papel filtro utilizando o kit Generation DNA (QIAGEN). A reação de qPCR foi realizada no termociclador CFX96 (Bio-Rad) utilizando primers específicos para TREC e KREC (sintetizados pela IDT), além da amplificação do gene RNaseP como controle interno para normalização da quantidade de DNA. As condições otimizadas incluíram primers e sondas a 0,8 μ M e 0,4 μ M, respectivamente, com protocolo de amplificação: 50 °C/120 s, 95 °C/10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C/5 s, 55 °C/15 s e 65 °C/45 s. A validação do método demonstrou eficiência de amplificação superior a 98%, coeficiente de determinação ($r^2 \geq 0,99$) e um limite de detecção (LOD) de 8 cópias por reação para o equivalente a 13 Cópias/ μ L de sangue. Foram feitos ensaios de precisão, repetibilidade e reprodutibilidade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o parecer CAAE: 80346424.8.0000.0257. A implementação deste teste de triagem neonatal pode viabilizar diagnósticos precoces e intervenções terapêuticas oportunas, contribuindo para um prognóstico mais favorável em pacientes com SCID e outras imunodeficiências primárias.

Palavras-chave: SCID, XLA, TRIAGEM NEONATAL, TESTE DO PEZINHO, TREC, KREC

ABSTRACT

During lymphocyte maturation, somatic recombination of antigen receptors generates extrachromosomal DNA circles, known as T-cell receptor excision circles (TREC) and kappa-deleting recombination excision circles (KREC). The quantification of these markers enables the assessment of immune system competence and is essential for the screening of primary immunodeficiencies, such as DiGeorge syndrome, X-linked agammaglobulinemia (XLA), and severe combined immunodeficiency (SCID). SCID is a rare genetic disorder characterized by impaired function of T, B, and/or NK cells, rendering newborns highly susceptible to persistent and recurrent infections. Without early diagnosis, SCID can lead to death within the first months of life or cause severe sequelae if treatment is delayed. This study validated a multiplex qPCR assay for neonatal screening of SCID and other immunodeficiencies, based on the quantification of TRECs and KRECs. For standardization, plasmids were used as calibrators, and 181 biological samples were included for analytical and clinical validation. The analysis involved comparison with two reference laboratories currently performing the test: Support Laboratory 1 with 57 newborn samples, Support Laboratory 2 with 40 samples, and 84 samples were compared to the commercial NeoScreen SMA/TREC/KREC Real-Time Detection kit (DNA Technology). DNA was extracted from 3 mm dried blood spot (DBS) discs using the Generation DNA kit (QIAGEN). The qPCR assay was performed on the CFX96 thermocycler (Bio-Rad) using specific primers for TREC and KREC (synthesized by IDT), along with RNaseP gene amplification as an internal control for DNA normalization. Optimized reaction conditions included primers and probes at 0.8 μ M and 0.4 μ M, respectively, with the amplification protocol: 50 °C/120 s, 95 °C/10 min, followed by 45 cycles of 95 °C/5 s, 55 °C/15 s, and 65 °C/45 s. Method validation showed amplification efficiency above 98%, a coefficient of determination ($r^2 \geq 0.99$), and a limit of detection (LOD) of 8 copies per reaction, equivalent to 13 copies/ μ L of blood. Precision, repeatability, and reproducibility assays were also performed. This study was approved by the Ethics Committee under protocol number CAAE: 80346424.8.0000.0257. The implementation of this neonatal screening test may enable early diagnosis and timely therapeutic interventions, contributing to a more favorable prognosis in patients with SCID and other primary immunodeficiencies.

Keywords: SCID, XLA, NEWBORN SCREENING, HEEL PRICK TEST, TREC, KREC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenciação de células T e formação de TRECs	19
Figura 2 - Diferenciação das células B e formação dos Círculos de excisão por recombinação Deletora de Kappa (KRECs)	22
Figura 3 - Imunofenótipos mais comuns de SCID.....	25
Figura 4 - Gráfico de porcentagem de sobrevivência de pacientes com SCID	28
Figura 5: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo KREC e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.....	38
Figura 6: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo TREC e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.....	39
Figura 7: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo RNaseP e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.....	40
Figura 8: Esquema da diluição seriada dos plasmídeos.....	42
Figura 9: Determinação do Threshold para os fluoróforos FAM, HEX e Cy5.....	52
Figura 10: Gráfico representativo de 24 reações realizadas em triplicata da Curva Padrão	54
Figura 11: Perfil de amplificação para cada fluoróforo para as reações 16 a 23	56
Figura 12: Perfil de amplificação para cada alvo para as reações de 24 a 31.....	57
Figura 13: Perfil de amplificação para cada fluoróforo para reações de 32 a 39	58
Figura 14:—Probabilidade de detecção versus Log da concentração e Regressão Probit TREC	60
Figura 15: Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração KREC e Probit	61
Figura 16: Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração e Regressão Probit para o alvo RNaseP.....	63
Figura 17: Estabilidade dos Alvos (%) x Dias após Coleta	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes associados a SCID e Imunofenótipo associado	26
Tabela 2 - Sequências de Primers e Sondas para padronização do qPCR para TREC e KREC e RNaseP	36
Tabela 3: Relação dos Plasmídeos utilizados para preparo da Curva Padrão	41
Tabela 4: Concentrações de plasmídeos utilizadas na curva Padrão	42
Tabela 5: Relação de valores atribuídos ao cálculo para o Fator de conversão de Cópias/reação para Cópias/ μ L de sangue.....	44
Tabela 6: - Resumo das Condições de Reação	45
Tabela 7: Diluição seriada para determinação de LoD e LoQ	47
Tabela 8: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit	59
Tabela 9: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit	60
Tabela 10: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit RNaseP	62
Tabela 11: Definição de LOQ para o alvo TREC – FAM.....	64
Tabela 12: Definição de LOQ para o alvo KREC-HEX	65
Tabela 13: Definição de LOQ para o alvo RNaseP - Cy5.....	65
Tabela 14: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 1 - TREC	66
Tabela 15: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 1 – KREC	66
Tabela 16: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 2 – TREC.....	67
Tabela 17: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 2 - KREC	67
Tabela 18: Cálculo de Acurácia Teste x Kit comercial -TREC	68
Tabela 19: Cálculo de Acurácia Teste x Kit comercial -KREC.....	68
Tabela 20: Reprodutibilidade da amostra 98 em 50 extrações independentes	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA - Adenosina deaminase

BCG - do francês, Bacillus Calmette-Guérin

BCR- Receptor de células B

Ct - do inglês, Cycle threshold

DNA -do inglês, deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

DCLRE1C: gene de Reparo de Ligações Cruzadas no DNA 1C

EII - Erros Inatos da Imunidade

HIV - do inglês, human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HLA -do inglês, human leucocyte antigen (antígeno leucocitário humano)

IDCs - Imunodeficiência Combinada

ILR7A: Receptor de Interleucina 7 Alfa

IL2RG - Subunidade gama comum do receptor de interleucina 2

KREC -do inglês Kappa-deleting Recombination Excision Circles (Círculos de excisão por recombinação Deletora de Kappa)

LAGID - do inglês, Latin-American Group for Immunodeficiencies (grupo latino-americano de imunodeficiências primárias)

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL - mililitro

mg - miligrama

mm³ - milímetro cúbico

mRNA - RNA mensageiro

ng - nanograma

nM - nanomolar

NK - do inglês, Natural Killer (assassinas naturais)

nm - nanômetro

OMIM - do inglês, Online Mendelian Inheritance in Men

PCR -do inglês, polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PIDTC - do inglês Primary Immunodeficiency Treatment Consortium (consórcio de tratamento de imunodeficiências primárias)

qPCR - reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

SCID - do inglês, Severe Combined Immunodeficiency (Imunodeficiência Combinada Grave)

SDG - Síndrome de DiGeorge

SJ - do inglês, signal joint (sinal de junção)

SNP -do inglês, Single Nucleotide Polimorfism (polimorfismo de nucleotídeo único)

TCR -do inglês, T cell receptor (receptor de antígenos da célula T)

TCTH - transplante de células-tronco hematopoiéticas

TN - Triagem neonatal

TREC - do inglês, T-cell Receptor Excision Circles (círculos de excisão do receptor de célula T)

TTC7A: Domínio de Repetição Tetratricopeptídica 7 A

UTI - unidade de tratamento intensivo

SCID-X - SCID ligada ao cromossomo X

RAG1: gene ativador de recombinase 1

RAG2: gene ativador de recombinase 2

RFXANK - Proteína contendo anquirina associada ao fator regulador X (RFX)

ZAP70: Tirosina quinase associada à cadeia zeta de 70 kDa

Sumário

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
Sumário	12
1. Introdução	15
1.1. Sistema Imunológico.....	15
1.2. Erros Inatos da Imunidade (EIs)	15
1.3. Maturação linfocitária.....	17
1.4. Linfócitos T e formação do TREC (T-cell Receptor Excision Circles)	17
1.5. Linfócitos B e formação do KREC (Kappa-Deleting Recombination Excision Circles).....	20
1.6. Imunodeficiência combinada Grave.....	23
1.7. Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA)	28
1.8. PCR em Tempo Real (qPCR).....	29
1.9. Triagem neonatal e quantificação de TRECs e KRECs.....	30
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Aspectos éticos.....	35
3.2. Amostras.....	35
3.3. Extração de ácidos nucleicos	35

3.4.	Primers e Sondas	36
3.5.	Construção de plasmídeos e controles.....	37
3.6.	Preparo dos Plasmídeos para serem utilizados na Curva Padrão.....	40
3.7.	Curva padrão	41
3.8.	Cálculo do Slope e da Eficiência da Curva.....	43
3.9.	Fator de Conversão: Cálculo para conversão de cópias por reação em cópias por μL de sangue	43
3.10.	Condições de reação (qPCR)	44
3.11.	Determinação de Threshold de cada alvo da qPCR	45
3.12.	Acurácia	45
3.13.	Comparação de resultados com teste comercial	46
3.14.	Limite de Detecção.....	47
3.15.	Limite de Quantificação	47
3.16.	Linearidade	48
3.17.	Especificidade	48
3.18.	Reprodutibilidade e Repetibilidade.....	49
3.19.	Depleção de linfócitos T/B.....	49
3.20.	Estabilidade do DNA extraído de amostras de sangue seco	51
4.	RESULTADOS.....	52
4.1.	Definição de Threshold para todas as reações.....	52
4.2.	Curva Padrão.....	53
4.3.	Limite de Quantificação (LOQ)	64
4.4.	Acurácia.....	65
4.5.	Comparação do teste em estudo com o kit comercial realizado no equipamento DT PRIME (DNA Technology) para o alvo TREC e KREC.....	67
4.6.	Repetibilidade e Reprodutibilidade	68
4.7.	Estabilidade das Amostras em Papel Filtro	69
5.	DISCUSSÃO.....	71

6.	CONCLUSÃO	77
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79

1. Introdução

1.1. Sistema Imunológico

O sistema imunológico humano é composto por uma complexa rede de células, tecidos e órgãos, desempenhando um papel crucial na defesa do organismo contra agentes infecciosos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, além de ser essencial na vigilância contra células tumorais e na manutenção da homeostase. Ele pode ser dividido em dois componentes principais: a imunidade inata/celular e a imunidade adaptativa/humoral. A imunidade inata é a primeira linha de defesa, respondendo rapidamente de forma não específica aos invasores por meio de barreiras físicas, químicas e celulares, como macrófagos, neutrófilos e células NK. Já a imunidade adaptativa é mais específica e envolve linfócitos T e B, que reconhecem e respondem a antígenos específicos. Essa resposta é caracterizada por sua memória imunológica, que garante reações mais eficazes em exposições subsequentes ao mesmo patógeno (Abbas et al., 2021; Notarangelo, 2010).

Durante a fase embrionária até os primeiros anos de vida, o sistema imunológico passa por um desenvolvimento dinâmico, com implicações cruciais para a saúde do indivíduo. No período fetal e neonatal, há uma interação complexa entre a necessidade de proteção contra infecções e a prevenção de respostas inflamatórias excessivas que podem causar complicações, como o parto prematuro. Após o nascimento, o sistema imunológico do neonato enfrenta uma maior demanda para lidar com a exposição a diversos microrganismos. A imunidade inata desempenha um papel fundamental nesse período, compensando a imaturidade da imunidade adaptativa, que só atinge sua plena funcionalidade na infância tardia, quando a criança tem por volta de 10 anos. A limitação na memória imunológica e a vulnerabilidade imunológica tornam os neonatos mais suscetíveis a infecções. Assim, compreender as etapas do desenvolvimento do sistema imune é essencial para identificar fatores de risco e diagnosticar precocemente condições que afetam a competência imunológica em crianças (Moraes et al., 2021).

1.2. Erros Inatos da Imunidade (EIIs)

Deficiências em qualquer componente do sistema imune podem prejudicar a capacidade do corpo de reconhecer e eliminar patógenos de maneira rápida e eficiente. Quando a imunidade inata é afetada, o indivíduo fica mais suscetível a infecções de repetição, que podem ser mais graves e persistentes. Já os erros na resposta imune

adaptativa, responsável por respostas mais específicas e pela memória imunológica do indivíduo, podem levar a deficiências na produção de anticorpos por linfócitos B ou na maturação e função dos linfócitos T (Picard et al., 2017).

Os erros inatos da imunidade (EIs) representam um grupo heterogêneo de doenças genéticas que afetam diferentes componentes do sistema imunológico. Entre as mais graves estão as imunodeficiências combinadas graves (SCID), que se caracterizam pela disfunção severa de linfócitos T, frequentemente associada a deficiências em células B e NK. Clinicamente, essas crianças manifestam infecções graves e atraso no crescimento nos primeiros meses de vida, quando a imunidade materna transferida pelo leite se reduz. Sem tratamento, como o transplante de células-tronco hematopoiéticas ou terapia gênica, o desfecho é frequentemente fatal (Kwan et al., 2014). Outro exemplo importante é a agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), caracterizada pela ausência de produção de anticorpos devido a mutações no gene BTK. Isso resulta em infecções bacterianas recorrentes, sendo o tratamento padrão a reposição de imunoglobulina (Conley et al., 2009).

Com os avanços da medicina e tecnologia, os EIs vêm sendo mais diagnosticados e tratados. Quando diagnosticados tardiamente, principalmente nos casos de incidência na infância, tendem a resultar em óbitos precoces de neonatos. O amplo espectro clínico dos EIs, aliado às apresentações variáveis decorrentes de defeitos em um mesmo gene, torna essas condições um desafio diagnóstico tanto para médicos quanto para pesquisadores. A grande maioria dessas doenças envolvem susceptibilidade a patógenos, manifestações alérgicas, inflamatórias, autoimunes ou, ainda, patologias malignas (cânceres), tornando-se, por tanto, um grupo de doenças complexas e heterogêneas que necessitam de um esforço conjunto de vários profissionais para divulgá-las e estudá-las (adaptado de BRAGID, 2025; Bousfiha et al., 2021; Comeau et al. 2010).

Atualmente mais de 400 doenças já foram relatadas, ou possuem estudos em andamento, aumentando assim, a complexidade de manifestações clínicas, dos métodos diagnósticos, e do tratamento terapêutico para esses indivíduos. Embora os EIs sejam, em sua maioria, doenças monogênicas com padrão mendeliano de hereditariedade, alguns fatores como a penetrância variável, mosaicismos e interações entre fatores ambientais e genéticos podem contribuir para a diversidade fenotípica observada nessas patologias (Notarangelo, 2010).

A suspeita de EIs inicialmente se dá por infecções recorrentes, muitas vezes mais graves do que as observadas em indivíduos imunocompetentes. Além disso, podem existir susceptibilidades específicas a alguns patógenos, dependendo da natureza do defeito imunológico. Defeitos na resposta imune inata incluem deficiências em fagócitos, receptores do tipo Toll e componentes do sistema complemento. Já os defeitos na resposta imune adaptativa abrangem: i) as deficiências de anticorpos, que afetam mais da metade dos pacientes e têm como tratamento padrão a reposição de anticorpos, e ii) as imunodeficiências combinadas (IDCs), que resultam em defeitos celulares dos linfócitos T, podendo também acometer linfócitos T e células NK., com apresentações clínicas geralmente mais graves. O tratamento para as IDCs é o transplante de células-tronco hematopoiéticas, com a terapia gênica sendo uma alternativa em desenvolvimento (Kanegae et al., 2016).

1.3. Maturação linfocitária

Nas fases iniciais do desenvolvimento fetal, o tecido linfoide passa por uma modulação contínua. Com o avanço da gestação, o fígado fetal realiza a hematopoiese, após a 7ª semana, os progenitores de células T migram para o timo, onde ocorre sua maturação, enquanto células B fetais se diferenciam no fígado e para o cordão umbilical, passando por recombinação V(D)J para gerar imunoglobulinas IgM e IgD, posteriormente se transferindo para a medula óssea. A maturação dos linfócitos T e B, é fundamental para a imunidade adaptativa e envolve processos intrincados de desenvolvimento que ocorrem no timo e na medula óssea, respectivamente (Moraes et al., 2021).

No timo, os linfócitos T passam por rearranjos gênicos mediados pelas recombinases RAG1 e RAG2, gerando receptores de células T (TCR) específicos. Esses rearranjos resultam na formação de pequenos fragmentos circulares de DNA, chamados TRECs (T-cell receptor excision circles), que não se replicam durante a divisão celular, sendo indicadores da produção de novos linfócitos T. Paralelamente, na medula óssea, os linfócitos B passam por rearranjos nos genes das imunoglobulinas para formar receptores de antígenos. Durante esse processo, eventos de deleção no locus IGK geram os KRECs (Kappa-deleting recombination excision circles), que também são marcadores da atividade linfopoiética (Chiarini, et al. 2013).

1.4. Linfócitos T e formação do TREC (T-cell Receptor Excision Circles)

Os linfócitos T originam-se na medula óssea e amadurecem no timo, onde são selecionados com base na sua habilidade de distinguir o que é próprio ou não próprio no

hospedeiro. Os linfócitos T são células da imunidade adquirida que possuem receptores de membrana denominados TCR capazes de reconhecer peptídeos associados à proteína de membrana denominada complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de uma célula (Abbas,2023). Um esquema geral do processo de rearranjo do locus alfa do receptor de células T e a subsequente formação do TREC está descrito na **Figura 1**.

Os receptores de células T (TCR), do inglês T-Cell receptor, desempenham um papel fundamental no reconhecimento de antígenos apresentados pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Para garantir a diversidade necessária ao reconhecimento de bilhões de antígenos distintos, os loci que codificam os TCRs passam por um sofisticado processo de rearranjo gênico somático, denominado recombinação V(D)J. Esse mecanismo permite a geração de um repertório altamente variado de receptores, essencial para a resposta imunológica adaptativa. O TCR pode ser classificado em dois tipos, TCR $\alpha\beta$ (TCR Alfa-beta) e TCR $\gamma\delta$ (TCR Gama-delta). No caso do TCR alfa (TCR α), o rearranjo possui uma característica única, pois o locus TCR δ (delta) está fisicamente inserido dentro do locus TCRA, localizado na região cromossômica 14q11.2. Para que uma cadeia alfa funcional seja formada, o segmento delta deve ser excisado do genoma. Esse processo de exclusão ocorre de maneira precisa, resultando na formação de círculos extracromossômicos de DNA conhecidos como TRECs (T-cell Receptor Excision Circles) (Duan, 2016).

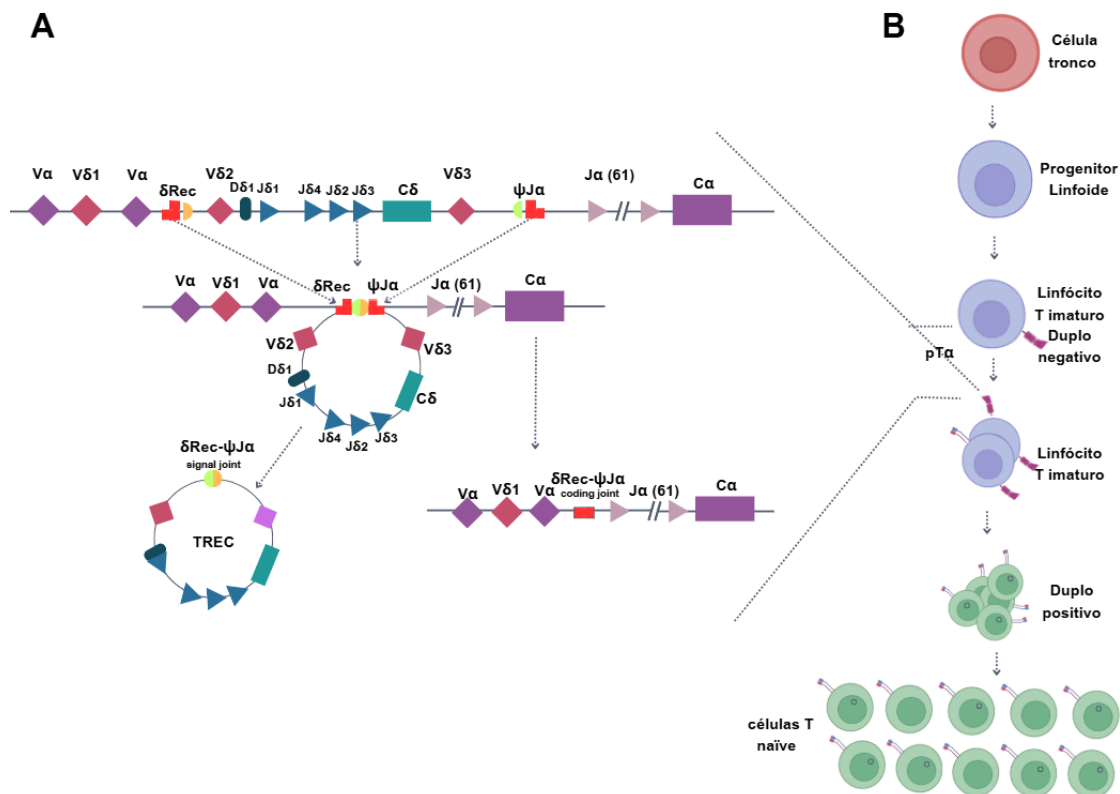


Figura 1 - Diferenciação de células T e formação de TRECs (A) Os segmentos do gene TCR δ (TCR Delta) são intercalados nos segmentos do gene TCR α (TCR Alfa) ao longo do cromossomo 14 (lôcus TCRA/TCRD), ao ocorrer a recombinação V(D)J do lôcus TCRD (δ), este é deletado, ocorre o rearranjo da deleção formando a junta de sinal δ Rec- ψ Ja formando um círculo de excisão do receptor de Células T (TREC); Em paralelo o rearranjo da junta de codificação δ Rec- ψ Ja é formado para o rearranjo do lôcus TCRA (α) no genoma. (B) Os progenitores linfóides se formam a partir de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, a partir dela, diferencia-se o progenitor linfóide comum, ainda na medula óssea, e migra para o timo via circulação sanguínea. Ao adentrar o timo, o progenitor passa a ser denominado linfócito T imaturo duplo negativo (DN), por não expressar CD4 nem CD8. Durante esse estágio, ocorre o rearranjo inicial dos genes do receptor de célula T (TCR). Com o sucesso desse processo, a célula torna-se um linfócito T imaturo duplo positivo (DP), expressando simultaneamente CD4 e CD8, além do TCR completo. Este estágio ocorre no córtex tímico e é acompanhado pelos processos de seleção positiva e negativa. As células que sobrevivem a esses eventos tornam-se células T naíve maduras (simples positivas para CD4⁺ ou CD8⁺), e migram para a circulação periférica e órgãos linfóides secundários, onde permanecem em estado de repouso (naíve) até serem ativadas por antígenos específicos. Os TRECs permanecem nas células T naíve (não ativadas), mas não são replicados durante a divisão celular. Assim, com o tempo, os níveis de TRECs diminuem devido à proliferação clonal das células T ativadas (Fonte: Adaptado de Chiarini, et al. 2013).

O lôcus TCRA/TCRD compreende segmentos gênicos V (variável), D (diversidade) e J (junção), responsáveis pela geração da diversidade estrutural da cadeia do receptor, além do segmento C (constante), que compõe a porção final da cadeia funcional. Durante a formação do TCR α , o lôcus TCRD completo (incluindo os segmentos V, D, J e C da cadeia delta) é removido por meio da recombinação V(D)J, mediada pelas enzimas RAG1 e RAG2. Esses genes codificam proteínas que reconhecem sequências específicas, denominadas Recombination Signal Sequences (RSSs), localizadas nos segmentos gênicos. Durante o rearranjo, o complexo RAG identifica as RSSs que flanqueiam o

segmento δ REC (próximo ao final do TCRD) e o segmento ψ J α (no início do TCRA). A clivagem do DNA nesses pontos gera quebras de fita dupla, que são reparadas por meio do mecanismo de ligação não-homóloga de extremidades (NHEJ), envolvendo enzimas como DNA ligase IV e Artemis. Esse processo resulta em duas junções distintas: uma junção codificadora, que conecta os segmentos V e J no locus TCRA, gerando um gene funcional; e uma junção sinalizadora, que forma um círculo extracromossômico de DNA contendo os segmentos excisados δ REC- ψ J α , correspondentes à cadeia delta. Este círculo, denominado TREC, é um marcador exclusivo do processo de maturação dos linfócitos T, refletindo a atividade do timo na geração de células T funcionais (Chiarini et al., 2013).

Devido fatores relacionados ao seu desenvolvimento e ativação, nem todos os linfócitos T possuem TREC. Durante o processo de maturação no timo, aproximadamente 70% das células geram TRECs. Assim, uma proporção significativa de linfócitos T pode não produzir TRECs, especialmente se não passarem pelo rearranjo de forma bem-sucedida. Além disso, após a ativação, os linfócitos T proliferam e se diferenciam em linfócitos T efetores ou de memória e, durante esse processo, os TRECs não são replicados, resultando na ausência desses marcadores em células T efectoras. As células T de memória, que são essenciais para a resposta imunológica a longo prazo, podem não conter TRECs, pois são geradas após a exposição a antígenos e não passam novamente pelo processo de rearranjo no timo. Além disso, algumas células T podem ter defeitos de desenvolvimento ou podem se originar de locais extratímicos, o que também contribui para a ausência de TRECs. Portanto, a presença de TRECs é um indicador da produção e do desenvolvimento de células T no timo, mas não é uma característica universal de todas as células T maduras, refletindo a complexidade da dinâmica do sistema imunológico (Chiarini et al., 2013).

1.5. Linfócitos B e formação do KREC (Kappa-Deleting Recombination Excision Circles)

Durante o período neonatal, a imunidade adaptativa ainda está em desenvolvimento. As células B neonatais apresentam um repertório de imunoglobulinas limitado, com menor produção de anticorpos devido à sinalização fraca do receptor de células B (BCR). Inicialmente, os neonatos dependem da IgG materna, transferida pela placenta, que diminui gradualmente durante os primeiros meses de vida. O sistema

imunológico adaptativo se consolida a partir dos dois anos de idade, alcançando plena maturidade durante a primeira década de vida (Chiarini et al., 2013).

Os linfócitos B desempenham um papel essencial na defesa adaptativa do organismo e se originam principalmente na medula óssea. Essas células são responsáveis pela produção de anticorpos, que neutralizam patógenos e toxinas, além de formar memória imunológica, permitindo uma resposta mais rápida e eficaz em exposições futuras aos mesmos agentes infecciosos (Sottini et al., 2010).

A maturação das células B ocorre em etapas, iniciando-se com os progenitores linfóides, conhecidos como células Pré-B. Durante esse processo, as células B passam por rearranjos genéticos que possibilitam a expressão de imunoglobulinas de superfície, como a IgM e IgD, passando por rearranjos genéticos para formar os genes que codificam os receptores de células B (BCRs). As células que não conseguem gerar receptores funcionais, devido a falhas no rearranjo dos genes das imunoglobulinas, ou que apresentam alta autoreatividade, são eliminadas por um processo denominado seleção negativa. Essa seleção ocorre majoritariamente na medula óssea e é fundamental para evitar a liberação de células B potencialmente autoreativas na circulação periférica (Abbas, 2023).

Na fase Pré-B, o rearranjo genético do locus da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) ocorre por meio da recombinação V(D)J, um processo mediado pelas enzimas recombinase ativadora de genes (RAG) 1 e 2. Esse rearranjo resulta na formação de uma cadeia pesada funcional que, se bem-sucedida, sinaliza a progressão de estágio Pré-B. Nessa etapa, a célula B passa a rearranjar os genes da cadeia leve Kappa (IgK) e, caso necessário, lambda (Igλ), completando a montagem de um receptor de antígeno de Célula B (BCR) funcional (Chiarini, et al., 2013).

Após a produção da cadeia pesada, a célula B tentará rearranjar os genes da cadeia leve Kappa. Durante esse processo, podem ocorrer rearranjos produtivos (que resultam em uma cadeia leve funcional) ou não produtivos (que não resultam em uma cadeia leve funcional). Quando essa tentativa falha, a região λ do cromossomo 22 é ativada para rearranjo. Antes que isso ocorra, um evento de deleção envolvendo o elemento Kde (Kappa-deleting element) inativa o locus Kappa. Esse evento é mediado pela recombinação entre o Kde e uma RSS (Sequencia de sinal de recombinação) localizada na região Cκ. As enzimas da via de junção de extremidades não-homólogas, como DNA ligase IV e Artemis, religam as extremidades do DNA, formando um círculo excisado, conhecido como KREC. As células B que conseguem produzir um BCR

funcional não geram KRECs, pois não passam pelo processo de edição do receptor. Assim, a presença de KRECs indica as células B que falharam em se tornar funcionais, mas que ainda estão em um estágio de desenvolvimento (Chiarini et al, 2013).

Um esquema geral do processo de rearranjo do locus IGK do receptor de células B e a subsequente formação do KREC está descrito na **Figura 2**.

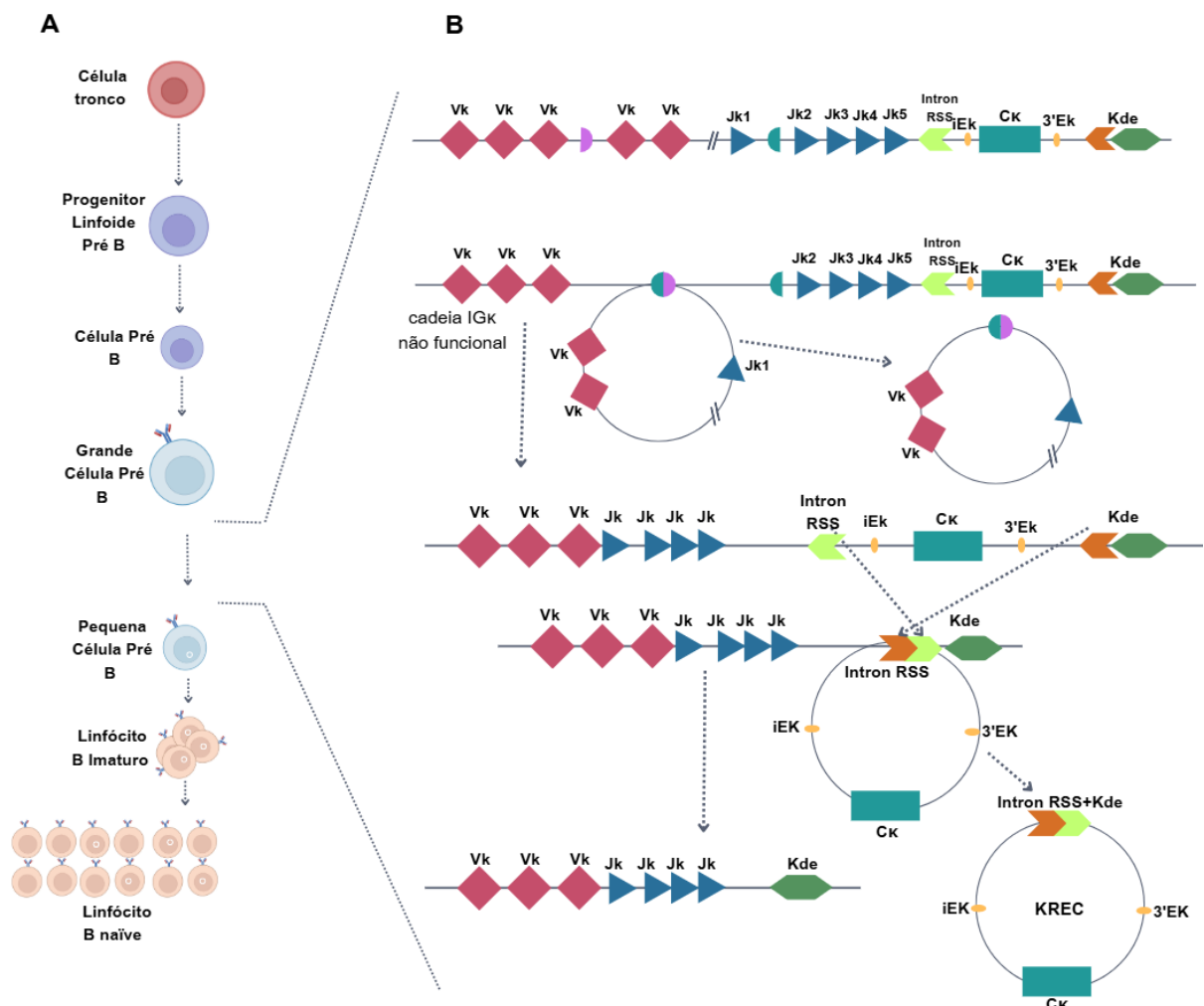


Figura 2 - Diferenciação das células B e formação dos Círculos de excisão por recombinação Deletora de Kappa (KRECs) (A) O desenvolvimento das células B começa quando as células-tronco linfóides se diferenciam em células B progenitoras (células Pré-B). Durante a fase de maturação independente de antígeno, células B competentes expressam IgM e IgD de membrana. Aproximadamente 10% das células B alcançam a maturidade e deixam a medula óssea. Células B naíve no sangue periférico, entram em apoptose, a menos que encontrem antígenos proteicos solúveis e células T auxiliares para que se diferenciem em células B ativas. Uma vez ativadas, as células B proliferam nos órgãos linfóides secundários. (B) Após a recombinação V(D)J funcional do locus da cadeia pesada (IgH) ocorre uma progressão para o rearranjo da cadeia leve Kappa (IGK) das Ig. O rearranjo V(D)J no locus IGK resulta em uma junção codificadora V_k-J_k. O rearranjo subsequente entre o Intron RSS e o κ-deleting element (Kde) pode tornar o alelo IGK não funcional, ocorrendo a exclusão do Éxon a constante K (C_k) e os elementos reguladores da cadeia leve das imunoglobulinas. Consequentemente, a junção codificadora impede quaisquer rearranjos adicionais no locus IGK e, portanto, permanece presente no genoma, enquanto uma junção de sinal intrínseco RSS-Kde é formada, originando o KREC (Fonte: Adaptado de Chiarini, et al. 2013).

Os KRECs são marcadores episômicos do processo de maturação dos linfócitos B e não são replicados durante a divisão celular. Assim, sua presença indica a atividade recente da medula óssea na geração de linfócitos B. Esse rearranjo inativa funcionalmente o alelo IGK, impedindo rearranjos adicionais no locus Kappa e direcionando a célula B a rearranjar o locus lambda para completar sua maturação (Puck, 2011).

Este processo tem impacto direto na diversidade do repertório imunológico, pois assegura a inativação funcional do locus Kappa antes da ativação do locus lambda, permitindo que diferentes rearranjos ocorram no locus da cadeia leve das imunoglobulinas. Essa diversidade estrutural é essencial para que os linfócitos B reconheçam uma ampla gama de antígenos, aumentando a capacidade do sistema imunológico de responder a diferentes patógenos (Borte et al., 2012). Esse evento garante que o locus Kappa seja funcionalmente inativado antes que o locus lambda seja utilizado (Borte et al., 2012).

1.6. Imunodeficiência combinada Grave

A SCID, do inglês Severe Combined Immunodeficiency (IDCG - Imunodeficiência Combinada Grave), representa o exemplo mais grave de EII, sendo caracterizada pela disfunção severa de células T, podendo também, afetar células B e NK. Recém-nascidos com SCID parecem saudáveis ao nascimento, mas desenvolvem infecções graves nos primeiros meses de vida. No Brasil, a prevalência é de aproximadamente 1:58.000 nascimentos, com sintomas clínicos manifestando-se precocemente, entre 3 e 6 meses, quando ocorre o declínio da imunidade recebida pelos anticorpos maternos pela amamentação, levando a infecções graves, atraso no crescimento e, sem tratamento adequado, morte precoce, frequentemente antes dos dois anos de idade (Kwan et al., 2014; Aggarwal et al., 2021).

Esta doença é considerada uma emergência pediátrica e existe um breve espaço de oportunidade para sua detecção precoce durante o período assintomático, nos primeiros meses de vida. Os pacientes afetados por esta doença não sobrevivem à infância, a menos que seja instituído o transplante de medula óssea - (TMO). Quando diagnosticada tardiamente (após os 3 meses de vida), a sobrevida após o TMO pode variar em até 50%. A morte precoce pode ser a causa de dados subestimados quanto à incidência da doença. (Kanegae, et al., 2017).

SCID são reconhecidas como um grupo de doenças genéticas caracterizadas por alterações graves no desenvolvimento e na função do sistema imunológico, no qual mais de 50 genes podem estar envolvidos. Essas alterações incluem defeitos na timopoiese, maturação e função das células T, podendo frequentemente ser acompanhados de disfunção ou ausência de células B e NK, dependendo do gene afetado. Mesmo em pacientes com número normal de células B, a ausência de células T funcionais impede a produção efetiva de imunoglobulinas (Bousfiha et al., 2022).

Crianças com SCID que não possuem histórico familiar são, em geral, diagnosticadas somente após sofrerem múltiplas infecções, podendo estas serem fatais. A SCID apresenta diferentes imunofenótipos devido à variabilidade genética nas mutações que afetam o desenvolvimento e a funcionalidade dos linfócitos T, B e, em alguns casos, os linfócitos NK. Essas mutações ocorrem em diferentes genes que desempenham papéis cruciais no sistema imunológico, resultando em características específicas no perfil imunológico de cada paciente. Os imunofenótipos de SCID têm sido amplamente utilizados para correlacionar características clínicas ao defeito molecular subjacente. A descoberta do gene que codifica a enzima ADA- Adenosina deaminase, foi um marco na compreensão molecular da SCID, mostrando que a deficiência dessa enzima causa acúmulo de metabólitos tóxicos, comprometendo o sistema imunológico e outras funções sistêmicas (Medova, et al. 2022).

O fenótipo T-B-NK- (T negativo, B negativo NK negativo), frequentemente indica deficiência de ADA (Adenosina deaminase), enquanto o fenótipo T-B+NK- (T negativo, B positivo, NK negativo) sugere mutações em IL2RG (Subunidade gama comum do receptor de interleucina 2) ou JAK3, genes envolvidos na mesma via de sinalização. A **Figura 3** esquematiza os fenótipos de SCID e os genes mais comumente associados a eles. Apesar disso, a análise genética é essencial após a suspeita clínica de SCID, pois defeitos em genes distintos podem resultar em fenótipos idênticos, como ocorre com IL2RG e JAK3, que compartilham uma via molecular. Adicionalmente, mutações no mesmo gene podem gerar apresentações clínicas distintas, como na SCID clássica e na Síndrome de Omenn, associadas a mutações nulas e hipomórficas de RAG1 e RAG2, respectivamente (Ochs & Hitzig, 2012; Puck, 2007).

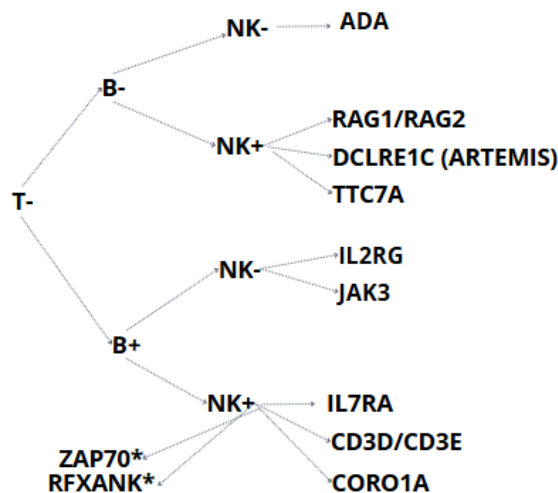


Figura 3 - Imunofenótipos mais comuns de SCID. T: Linfócitos T; B: Linfócitos B; NK: Células Natural Killer; ADA, Adenosina deaminase; RAG1: gene ativador de recombinação 1, RAG2: gene ativador de recombinação 2; DCLRE1C: gene de Reparo de Ligações Cruzadas no DNA 1C, codifica a proteína ARTEMIS; TTC7.

A Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa (SCID) ligada ao cromossomo X e outras formas T-B+ (T menos, B menos) representam entre 40-50% dos casos diagnosticados, enquanto as formas T-B-, como aquelas associadas a defeitos na recombinação V(D)J, são responsáveis por 25-37% dos diagnósticos. A deficiência de adenosina desaminase (ADA) contribui com cerca de 10-18% dos casos de SCID. Até o momento, pelo menos 17 genes foram associados à SCID, evidenciando a diversidade genética dessa condição (Kwan & Puck, 2015; Picard et al., 2018, Medova, et al. 2022).

Aproximadamente 11% de todos os pacientes com SCID apresentam rearranjos gênicos V(D)J em receptores de células T e B devido a mutações em genes da enzima recombinação (Gaspar et al., 2009; Kwan & Puck, 2015). Mutações ou deleções de genes inteiros responsáveis pelo desenvolvimento do timo, como aquelas localizadas na região crítica de DiGeorge (22q11.2), são ainda mais raras. A maioria dos bebês com a síndrome de deleção 22q11.2 apresenta diferentes formas de disfunção imunológica, que variam de linfopenia leve a atrasos na produção de IgG, além da apresentação clássica de SCID (Picard et al., 2018).

A SCID ligada ao cromossomo X e outras formas T-B+ representam 40-50% dos casos, enquanto formas T-B-, como as associadas a defeitos na recombinação V(D)J, respondem por 25-37%, e a deficiência de ADA é responsável por 10-18% dos diagnósticos (Kwan & Puck, 2015; Picard et al., 2018).

A **Tabela 1** retrata um compilado de genes associados à SCID, incluindo informações detalhadas como tipo de herança, produto gênico, função, características associadas e referências:

Tabela 1 Genes associados a SCID e Imunofenótipo associado

Gene	Imunofenótipo	Tipo de Herança	Produto Gênico ¹	Função	Características Associadas ²	Fonte
IL2RG	T-B+NK-	Ligada ao X	Receptor gama comum (γc)	Sinalização de citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21	Infecções graves e recorrentes, desenvolvimento reduzido dos linfócitos T e NK.	Gaspar et al., 2009
JAK3	T-B+NK-	Autossômica Recessiva	Janus quinase 3	Transdução de sinal via γc	Semelhante ao fenótipo ligado ao IL2RG; infecções graves, sem linfócitos T funcionais.	Gaspar et al., 2009
ADA	T-B-NK-	Autossômica Recessiva	Adenosina desaminase	Metabolismo de purinas	Acúmulo tóxico de dATP, prejudicando linfócitos. Apresenta sintomas metabólicos sistêmicos.	Giblett et al., 1972
RAG1/ RAG2	T-B-NK+	Autossômica Recessiva	Recombinase V(D)J	Recombinação gênica durante o desenvolvimento de linfócitos	Linfócitos ausentes; SCID clássico ou síndrome de Omenn (caracterizada por eritrodermia, eosinofilia e infecções graves).	Picard et al., 2018
DCLRE1C (ARTEMIS)	T-B-NK+	Autossômica Recessiva	Proteína Artemis	Reparo de DNA e recombinação V(D)J	Alta sensibilidade à radiação, infecções graves, risco aumentado para malignidades.	Cirillo et al., 2015
IL7RA	T-B+NK+	Autossômica Recessiva	Receptor da IL-7	Desenvolvimento de linfócitos T	Linfócitos T ausentes ou disfuncionais, linfócitos B normais.	Gaspar et al., 2009
CD3D/ CD3E	T-B+NK+	Autossômica Recessiva	Cadeias CD3 do TCR	Formação do receptor de célula T (TCR)	Redução ou ausência de linfócitos T; infecções graves.	Kwan et al., 2014

Gene	Imunofenótipo	Tipo de Herança	Produto Gênico ¹	Função	Características Associadas ²	Fonte
ZAP70	T baixo B+NK+	Autossômica Recessiva	Zeta-chain associated protein kinase 70 kDa	Sinalização via TCR	Desenvolvimento incompleto de linfócitos T, linfócitos T CD8+ ausentes, linfócitos T CD4+ disfuncionais.	Patel et al., 2014
RFXANK	T baixo B+NK+	Autossômica Recessiva	Proteína regulatória do MHC classe II	Apresentação de antígenos via MHC II	Linfócitos T auxiliares (CD4+) ausentes ou disfuncionais; infecções graves por patógenos oportunistas.	Picard et al., 2018
CORO1A	T-B+NK+	Autossômica Recessiva	Coronina-1A	Migração e sobrevivência de linfócitos T	Deficiência funcional de linfócitos T, infecções virais e bacterianas recorrentes.	Kwan et al., 2014
TTC7A	T-B-NK+	Autossômica Recessiva	Tetratricopeptide repeat domain 7A	Estabilidade do citoesqueleto	SCID associado a manifestações gastrointestinais graves, incluindo enteropatia.	Gaspar et al., 2009

Interpretação: 1 - 1 Produto Gênico e Função: Essas proteínas são fundamentais no desenvolvimento, sinalização ou estabilidade de linfócitos. 2 Características Associadas: Muitos genes têm manifestações fenotípicas adicionais que afetam outros sistemas além do imunológico.

No Brasil, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) permanece o tratamento padrão-ouro para SCID no diagnóstico pré-sintomático, antes do aparecimento de infecções, e é aquele que possui maior chance de sucesso no tratamento, com taxas de sobrevivência superiores a 96%, se tratados antes dos 3,5 meses de vida e sem infecções ativas. No entanto, após esta idade, este número cai para 66%, devido ao estabelecimento de complicações infecciosas, que ainda representam um dos principais desafios, especialmente em pacientes diagnosticados tardiamente ou que já apresentam infecções graves no momento do transplante (Puck et al., 2022). A **Figura 4**, demonstra o gráfico de sobrevivência de pacientes diagnosticados com SCID em diferentes fases pós transplante com diagnóstico antes dos três meses e meio de idade.

Nos Estados Unidos, a triagem para SCID por qPCR, foi adicionada no painel de triagem neonatal por recomendação da Escola Americana de Genética e Genômica Médica (ACMG- American College of Medical Genetics) no ano de 2006, se tornando um teste imprescindível antes das vacinas com vírus atenuados serem administradas nos

primeiros meses de vida, para que os pacientes em risco possam ser identificados e as vacinas potencialmente prejudiciais possam ser evitadas nessa população. Essa conduta evita infecções sistêmicas secundárias a algumas vacinas, como rotavírus, Varicela e BCG, que costumam levar crianças com imunodeficiência combinada grave a óbito precoce (Jyonouchi, 2017).

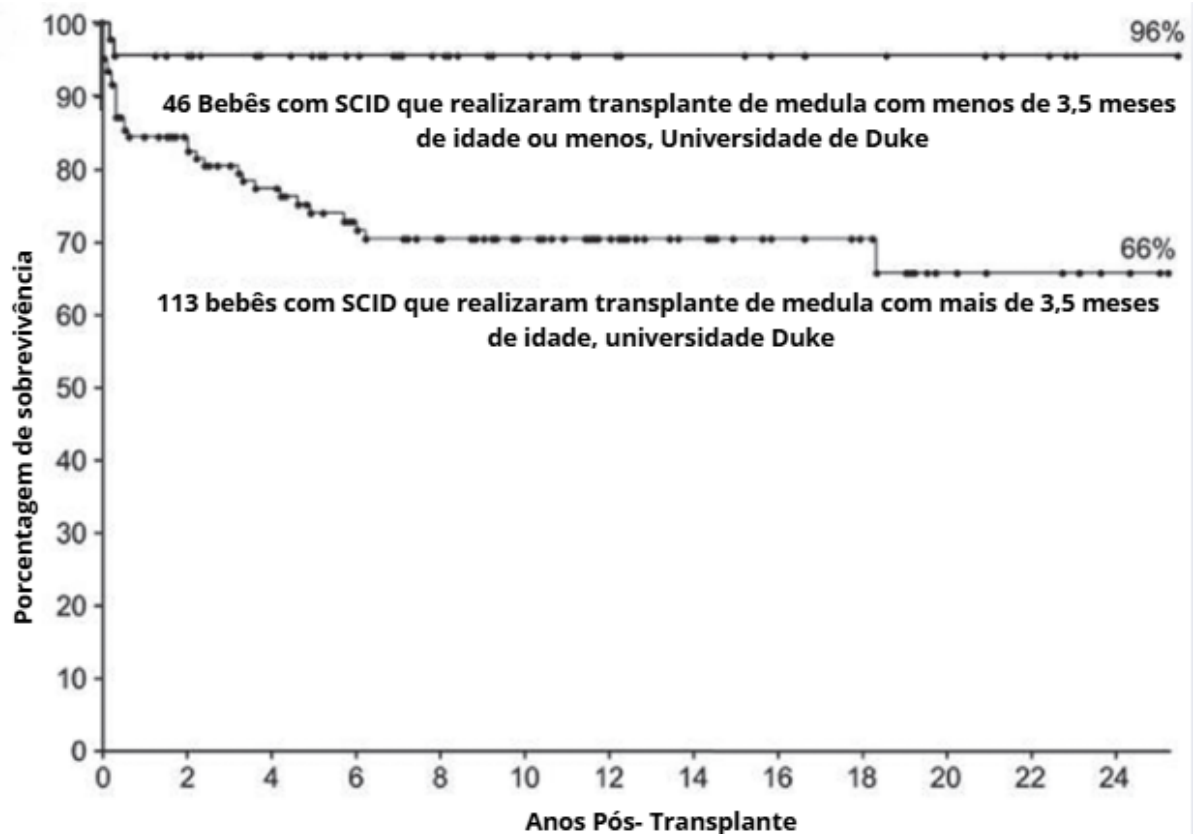


Figura 4 - Gráfico de porcentagem de sobrevivência de pacientes com SCID em relação ao diagnóstico e tratamento. Interpretação: A linha superior representa 46 crianças que fizeram TCHT antes dos 3 meses e meio de idade, com 96% de sucesso após 24 anos. A linha inferior representa 113 crianças que fizeram TCHT após 3 meses e meio de vida e a taxa de sobrevivência após 24 anos de 66% (Adaptado e traduzido de Sociedade Brasileira de Pediatria, 2021).

1.7. Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA)

A Agamaglobulinemia Ligada ao X (XLA) foi descrita pela primeira vez em 1952 pelo Dr. Ogden Bruton, sendo uma das primeiras imunodeficiências primárias reconhecidas. É uma doença genética causada por mutações no gene BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), localizado no cromossomo X. Essa mutação impede a maturação adequada dos precursores de linfócitos B, resultando na ausência ou deficiência significativa dessas células e, conseqüentemente, na incapacidade de produzir anticorpos (Mazhar et al,2025).

O diagnóstico clínico de XLA deve ser considerado em meninos com histórico de infecções bacterianas graves ou recorrentes, particularmente otite média, sinusite e

pneumonia, geralmente associadas a linfonodos pequenos ou ausentes e ausência de amígdalas. Esses pacientes frequentemente apresentam níveis extremamente baixos ou indetectáveis de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA). Apesar disso, algumas crianças podem apresentar concentrações residuais de IgM ou IgG, o que pode dificultar o diagnóstico inicial, especialmente em lactentes com menos de seis meses, quando os níveis de imunoglobulinas maternas ainda estão presentes (Picard et al., 2018).

A prevalência global da XLA é estimada em aproximadamente 1 a 10 casos por milhão de habitantes, sendo mais frequente em populações consanguíneas devido ao aumento do risco de mutações genéticas (Prince, 2020). Embora não exista cura para a XLA, o tratamento com imunoglobulinas substitutivas, administradas por via intravenosa ou subcutânea, é altamente eficaz na redução de infecções graves. Essas preparações contêm anticorpos contra uma ampla variedade de patógenos e devem ser administradas regularmente ao longo da vida. Em casos selecionados, profilaxia antibiótica pode ser utilizada para proteção adicional contra infecções bacterianas. É fundamental que pacientes com XLA evitem vacinas vivas, como a vacina oral contra a poliomielite e a tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola), devido ao risco de disseminação sistêmica do vírus atenuado (Aggarwal, et al., 2021).

Com diagnóstico precoce e tratamento adequado, pacientes com XLA podem levar vidas relativamente normais, embora continuem em risco de complicações, como infecções crônicas e doenças autoimunes. O avanço das terapias genéticas oferece perspectivas promissoras para o tratamento de imunodeficiências primárias, incluindo a XLA, embora tais abordagens ainda estejam em estágio experimental (Conley, et al., 2009).

1.8. PCR em Tempo Real (qPCR)

PCR em tempo real (real time PCR), é uma metodologia amplamente utilizada na biologia molecular para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Em comparação com a PCR convencional, a qPCR permite a monitorização da amplificação do DNA ou RNA em tempo real, através da detecção de sinais fluorescentes emitidos durante cada ciclo de amplificação (Heid et al., 1996; Bustin et al., 2009).

O princípio da qPCR baseia-se na amplificação enzimática de sequências-alvo com o uso de primers específicos e uma enzima termorresistente (Taq polimerase), sendo o produto amplificado detectado por meio de sondas moleculares do tipo TaqMan. Essas

sondas são compostas por um fluoróforo e um quencher, que se separam durante a extensão do DNA, permitindo a emissão de fluorescência proporcional à quantidade de DNA amplificado. Essa fluorescência é registrada por sensores do equipamento de qPCR, permitindo a quantificação do alvo em tempo real (Raymaekers et al., 2009).

A análise dos dados obtidos por qPCR pode ser realizada de duas formas principais: quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta é realizada por meio da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de DNA alvo, permitindo a determinação da quantidade exata de cópias na amostra. Já a quantificação relativa utiliza genes de referência endógenos para comparar a expressão gênica entre diferentes condições experimentais, com base em métodos como o $\Delta\Delta C_t$ (Livak; Schmittgen, 2001).

O valor de threshold (limiar) é o ponto em que a fluorescência da reação ultrapassa o ruído de fundo e é considerado o limite de detecção confiável. A partir dele, é determinado o C_t (Cycle threshold), que corresponde ao ciclo em que a fluorescência cruza esse limiar. O C_t é inversamente proporcional à quantidade inicial de material genético presente na amostra, sendo a principal medida utilizada para a interpretação e comparação dos resultados em ensaios de qPCR (Bustin et al., 2009).

1.9. Triagem neonatal e quantificação de TRECs e KRECs

A triagem neonatal tem como objetivo principal identificar precocemente os indivíduos afetados por doenças tratáveis, nas quais o benefício do tratamento é maior quando iniciado em fase pré-clínica. No Brasil e em muitos países utiliza-se o método de coleta de sangue seco em papel filtro, amplamente estabelecido para rastrear condições como hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria. A inclusão da análise de TREC e KREC no mesmo material elimina a necessidade de coleta adicional de sangue, reduzindo o desconforto ao recém-nascido e a logística de coleta e evidenciaram vantagens econômicas significativas ao prevenir complicações infecciosas (Medova et al., 2022).

Atualmente, a triagem neonatal é uma das estratégias mais consolidadas em saúde pública e pediatria preventiva, especialmente na área da genética. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Saúde, estabelecendo diretrizes específicas para a realização desses exames na rede pública (Ministério da Saúde, 2001). O PNTN se consolidou como um programa bem-sucedido, sendo oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Barreiros, 2018).

Em 26 de maio de 2021, a Lei nº 14.154 foi sancionada, promovendo a ampliação do escopo da triagem neonatal no Brasil. A legislação prevê a inclusão progressiva de 14 grupos de doenças no teste do pezinho, organizadas em cinco etapas de implementação (Ministério da Saúde, 2021).

A inclusão da análise de TREC e KREC no mesmo material elimina a necessidade de coleta adicional de sangue, reduzindo o desconforto ao recém-nascido e a logística de coleta e evidenciaram vantagens econômicas significativas ao prevenir complicações infecciosas (Medova et al., 2022).

TRECs e KRECs podem ser identificados por qPCR utilizando manchas de sangue seco sobre papel de filtro, pois são moléculas de DNA circulares, sem função replicativa, e sua quantidade nas células permanece estável, sendo um indicativo confiável da produção recente de linfócitos B e maturação tímica de linfócito T. A quantificação dessas moléculas é uma ferramenta crucial para a triagem de imunodeficiências primárias, como a imunodeficiência combinada grave (SCID) e a agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (XLA). Os níveis de TREC e KREC variam com a idade e é fundamental estabelecer valores de referência apropriados para diferentes faixas etárias, ajudando a identificar desvios significativos que podem indicar problemas de imunidade. Em recém-nascidos, a avaliação desses marcadores pode fornecer informações sobre a maturação do timo e a capacidade de gerar linfócitos B, que são essenciais para a resposta imune adaptativa (Puck, 2011; Kanegae et al., 2016; Medova, et al, 2022).

A detecção precoce dessas condições em recém-nascidos pode levar a intervenções terapêuticas oportunas, melhorando significativamente os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, pode ajudar a identificar grupos de recém-nascidos que estão em risco de desenvolver doenças imunológicas, permitindo um acompanhamento mais próximo e intervenções preventivas (Puck, 2011).

A pesquisa de TRECs e KRECs nos Estados Unidos, faz parte de um teste de triagem neonatal intitulado newborn screening (NBS), onde é feito juntamente ao teste do pezinho. Com isso, é possível determinar se as células do sistema imunológico estão se desenvolvendo bem nas crianças. Este exame pode alertar o médico assistente de que o desenvolvimento imunológico do recém-nascido pode ter algum distúrbio, sendo possível investigar mais de 30 doenças que fazem parte do espectro da imunodeficiência primária, sendo um teste altamente recomendado quando a criança apresenta infecções de repetição ou problemas de desenvolvimento e crescimento (Kanegae et al., 2016).

No contexto da triagem neonatal (TN) para SCID, é essencial considerar que, no Brasil, a vacina BCG representa um risco significativo para os indivíduos afetados. Esses pacientes são, em geral, assintomáticos no momento da administração da vacina, que ocorre nas primeiras horas de vida, ainda na maternidade. Portanto, considerando que a triagem para SCID é viável ao nascimento, torna-se fundamental evitar a administração de BCG e outras vacinas atenuadas em indivíduos com resultado alterado para TRECs e KRECs na triagem neonatal. Devido a esse risco, em países que realizam TN para SCID, recomenda-se que a aplicação da BCG seja realizada somente após a obtenção do resultado da triagem. Um estudo brasileiro envolvendo 70 pacientes diagnosticados entre 1996 e 2011 revelou que 65% dos indivíduos apresentaram complicações relacionadas à vacinação com BCG. Entre esses casos, 74% desenvolveram BCG disseminada, e essa forma da doença foi responsável, isoladamente ou associada a outros fatores, por 35 mortes registradas no estudo (Mazzucchelli et al., 2014).

A quantificação de TREC e KREC também pode ser empregada no monitoramento da eficácia de transplantes de medula óssea e outras terapias imunológicas, avaliando a reconstituição imunológica pós-tratamento. Exemplos incluem síndrome de DiGeorge, trissomia do 21, trissomia do 18, ataxia-telangiectasia e síndrome CHARGE. A quantificação desses marcadores tem sido aplicada em triagem neonatal para a triagem precoce de imunodeficiências congênitas e no monitoramento da atividade da medula óssea, proporcionando um diagnóstico rápido e eficaz, permitindo intervenções terapêuticas precoces que melhoram significativamente o prognóstico dos pacientes afetados. Isso é especialmente importante, pois muitas imunodeficiências primárias podem não apresentar sintomas evidentes ao nascimento, e a triagem pode identificar esses casos antes que ocorram infecções graves (Meehana et al., 2018).

O manejo do paciente com SCID e XLA é tão crucial para o desfecho da doença quanto o próprio transplante. A incidência global de SCID é estimada em 1:50.000 nascidos vivos, embora esse valor varie de acordo com a população e os avanços nos métodos de diagnóstico precoce. Esses achados sugerem que métodos de triagem neonatal mais sensíveis têm revelado casos anteriormente não diagnosticados e que a detecção dos marcadores representa um avanço significativo, permitindo rastrear não apenas SCID, mas também condições associadas à linfopenia de células T e B. Essa abordagem é particularmente valiosa para a identificação precoce de erros inatos da imunidade, como síndrome de DiGeorge, agamaglobulinemia e ataxia-telangiectasia, que

podem não ser captadas em triagens baseadas exclusivamente em TREC (Bousfiha et al., 2023).

O aumento do número de estudos utilizando a quantificação de TREC para triagem neonatal tem demonstrado que os ensaios apresentam alta sensibilidade para a detecção de imunodeficiências combinadas graves (SCID), frequentemente atingindo 100% de sensibilidade nos casos confirmados. No entanto, é importante destacar que a detecção de níveis reduzidos ou ausentes de TREC não confirma, por si só, o diagnóstico de SCID. A quantificação de TREC deve ser compreendida como um teste de triagem populacional, capaz de indicar suspeita de imunodeficiência, mas que requer investigação diagnóstica complementar para confirmar a presença de SCID ou de outros erros inatos da imunidade (EII). A ausência de TREC pode estar associada a diferentes condições clínicas, incluindo linfopenias causadas por prematuridade, infecções congênitas, síndromes genéticas ou outras imunodeficiências primárias não relacionadas à SCID. (Bousfiha et al., 2023). Nesse contexto, a inclusão da quantificação de KREC, por meio de ensaios multiplexados com TREC, amplia o escopo da triagem, permitindo também a detecção de distúrbios que afetam células B, como a agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), o que não é possível com o teste isolado de TREC. Uma revisão sistemática publicada por Bousfiha, et al., (2023) analisou cerca de 100 estudos e compilou diversas causas associadas a baixos níveis de TREC, reforçando a importância de uma interpretação criteriosa dos resultados no contexto clínico do recém-nascido.

Assim, países que incorporaram os exames de quantificação do número de TREC, tem apresentado retorno de custo/benefício para seus sistemas de saúde, onde, com o diagnóstico precoce, custos emergenciais devido às infecções de repetição são minimizados. A triagem neonatal, conhecido como teste do pezinho, deve ser incorporada como uma ferramenta para diagnóstico precoce das imunodeficiências combinadas graves, devendo ser oferecido como teste adicional recomendado antes da vacinação do recém-nascido (Kanegae et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver e validar um método triagem neonatal para imunodeficiências primárias por meio da quantificação molecular de TREC e KREC, de modo a beneficiar recém-nascidos, suas famílias e o sistema de saúde.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar protocolo de extração de ácidos nucleicos a partir de amostras de sangue coletadas em papel w903 ou Grutier card (Cartão de teste do pezinho).
- Padronizar reação de qPCR para quantificação das moléculas de TREC e KREC;
- Avaliar a estabilidade da curva padrão e padronizar procedimentos da sua construção;
- Determinar Sensibilidade do teste (limite de detecção)
- Realizar ensaios por metodologia comercial alternativa para ensaio de acurácia;
- Comparar resultados de laboratório parceiro para análise de acurácia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O presente trabalho faz parte do projeto intitulado “Desenvolvimento de teste molecular de triagem neonatal para quantificação de TREC e KREC”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital DAHER, através da Plataforma Brasil, em 08 de novembro de 2024, registrado sob o número CAAE: 80346424.8.0000.0257.

3.2. Amostras

As amostras de sangue coletadas em papel filtro foram obtidas em dois momentos. Foram inseridos nos estudos 200 pacientes que já possuíam material em um banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular do Grupo Sabin, que foram coletadas ao longo do projeto. E amostras cedidas de forma descaracterizadas por dois laboratórios de apoio, com resultados sabidamente conhecido. As amostras foram encaminhadas por unidades do Laboratório sediadas na cidade de Brasília.

3.3. Extração de ácidos nucleicos

Para a realização do estudo, foram utilizados dois métodos de extração de ácidos nucleicos a partir da mesma amostra primária em sangue seco. O objetivo foi comparar os métodos quanto à eficiência e qualidade da recuperação de DNA, utilizando discos de papel filtro com 3 mm de diâmetro. As amostras foram processadas em microtubos de 1,5 mL, onde foram realizados os procedimentos de eluição específicos para cada método.

No primeiro método, cada disco de 3 mm foi colocado em um microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 150 µL da solução Generation DNA Purification Solution 1 (QIAGEN - Catálogo: 159992). Essa solução promove a lise celular devido à presença de SDS, rompendo membranas celulares e liberando o DNA no papel filtro, além de inativar enzimas como DNAses e remover contaminantes. Após centrifugação a 1400 g por 5 minutos, os discos contendo a solução 1 foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado, eliminando moléculas indesejadas. Este processo foi repetido para assegurar a retirada de contaminantes do material. Em seguida, foram adicionados 120 µL da solução Generation DNA Elution Solution 2(QIAGEN - Catálogo: 159994), que remove contaminantes residuais, estabiliza o DNA e facilita a eluição, também tem em sua composição SDS, em baixas quantidades segundo a bula do fabricante. Após nova centrifugação e incubação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado. Para a eluição dos ácidos nucleicos, foram adicionados

novamente, 24 µL Generation DNA Elution Solution 2, a mistura foi incubada por 25 minutos a 99 °C, promovendo a liberação do DNA do papel filtro para a solução, segundo o fabricante, após a remoção de contaminantes, o DNA é liberado da matriz com Solução de Eluição de DNA 2 e a ação do calor. Amostras de DNA purificado estão prontas para análise e não requerem precipitação.

O segundo método foi realizado utilizando o kit comercial PREP-CITO DBS Extraction Kit (P-015-N/2EU PREP-CITO DBS, DNA Technology, Moscou). Inicialmente, foram adicionados 1400 µL da Wash Solution H a um tubo contendo três discos de 3 mm. O conteúdo foi misturado em vórtex por 10 segundos, garantindo que os discos permanecessem submersos, e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos, com misturas ocasionais. Após centrifugação a 16000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e 500 µL da Wash Solution Ck foram adicionados. O procedimento incluiu nova mistura em vórtex, incubação à temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugação e remoção completa do sobrenadante. Para a etapa de lise, foram adicionados 100 µL da solução de lise ao tubo, misturados em vórtex, e os tubos foram aquecidos a 90 °C por 20 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram centrifugados brevemente e adicionados 2 µL da solução neutralizante, com posterior mistura em vórtex. Os ácidos nucleicos extraídos nos dois métodos foram armazenados a 2-8 °C por até 1 dia ou a -18/-22 °C por até 1 mês.

3.4. Primers e Sondas

Para a realização da qPCR quantitativa (qPCR) multiplex em tempo real, as regiões específicas para a região SJ (SJ = signal joint) dos alvos TREC e KREC foram selecionadas para amplificação. O gene codificador da RNaseP (NM_006413) foi selecionado para ser utilizado como controle endógeno. As sequências de primers estão apresentadas na **Tabela 2**. Os primers e sondas foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies), garantindo as mesmas concentrações para versões em Primer XL e compras individuais.

Tabela 2 - Sequências de Primers e Sondas para padronização do qPCR para TREC e KREC e RNaseP

Descrição	Sequência (5' - 3')	Fluoróforo Reporter	Quencher Interno	Quencher terminal	b	M°C	GC	Autor
TREC Reverse	GCCAGCTGCAGGGTTTAGG	-	-	-	9	1	3,2	Douek, et al.2000

TREC Forward	CACATCCCTTTCAACCATGCT	-	-	-	1	8,8	7,6	Douek, et al.2000
TREC Probe	5'-/56FAM/ ACA CCT CTG /ZEN/ GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT /3IABkFQ/ - 3'	FAM	ZEN	Iowa Black FQ(IABkFQ)	0	8,3	6,7	Douek, et al.2000
KREC Probe	5'-/5HEX/TCT GCA CGG /ZEN/GCA GCA GGT TGG /3IABkFQ/ - 3'	HEX	ZEN	Iowa Black FQIABkFQ)	1	4	4,2	Sottini et al.2010
KREC Forward	TCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCAC T	-	-	-	7	0,4	7	Sottini et al.2010
KREC Reverse	AGGAGCCAGCTCTTACCCTAGAGT	-	-	-	4	7,8	6,7	Sottini et al.2010
RNAseP Reverse	AGATTTGGACCTGCGAGCG	-	-	-	9	0,4	7,9	Carlos, et al.2021
RNAseP Forward	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	-	-	-	0	2,4	0	Carlos, et al.2021
RNAseP Probe	5'-/5Cy5/TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG/3IAbRQSp/	CY5	TAO	Iowa Black RQ-S (3IAbRQSp)	3	7,2	0,9	Carlos, et al.2021

3.5. Construção de plasmídeos e controles

Os plasmídeos para KREC e TREC foram adquiridos da empresa Thermo Fisher (GeneArt Plasmid) sob o código Construct ID 18ACJFZP. O vetor plasmidial contendo a sequência de TREC possui 2.524 pares de bases, enquanto o vetor com a sequência de KREC possui 2.534 pares de bases.

A **Figura 5** apresenta o mapa de visualização dos plasmídeos contendo as sequências-alvo dos primers e sonda do alvo da região do sinal de Junção do alvo KREC, conforme gerados no software Geneious Prime®.

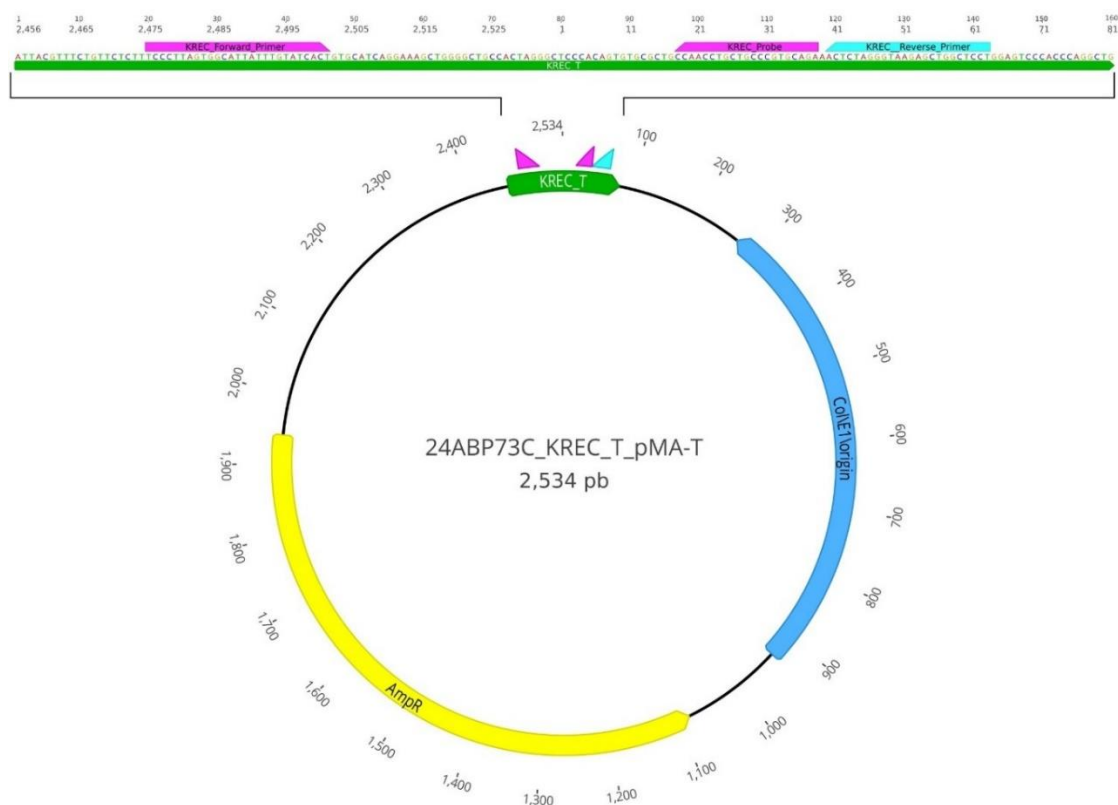


Figura 5: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo KREC e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.

A **Figura 6** apresenta o mapa de visualização dos plasmídeos contendo as sequências-alvo dos primers e sonda do alvo da região do sinal de Junção do alvo TREC, conforme gerados no software Geneious Prime®.

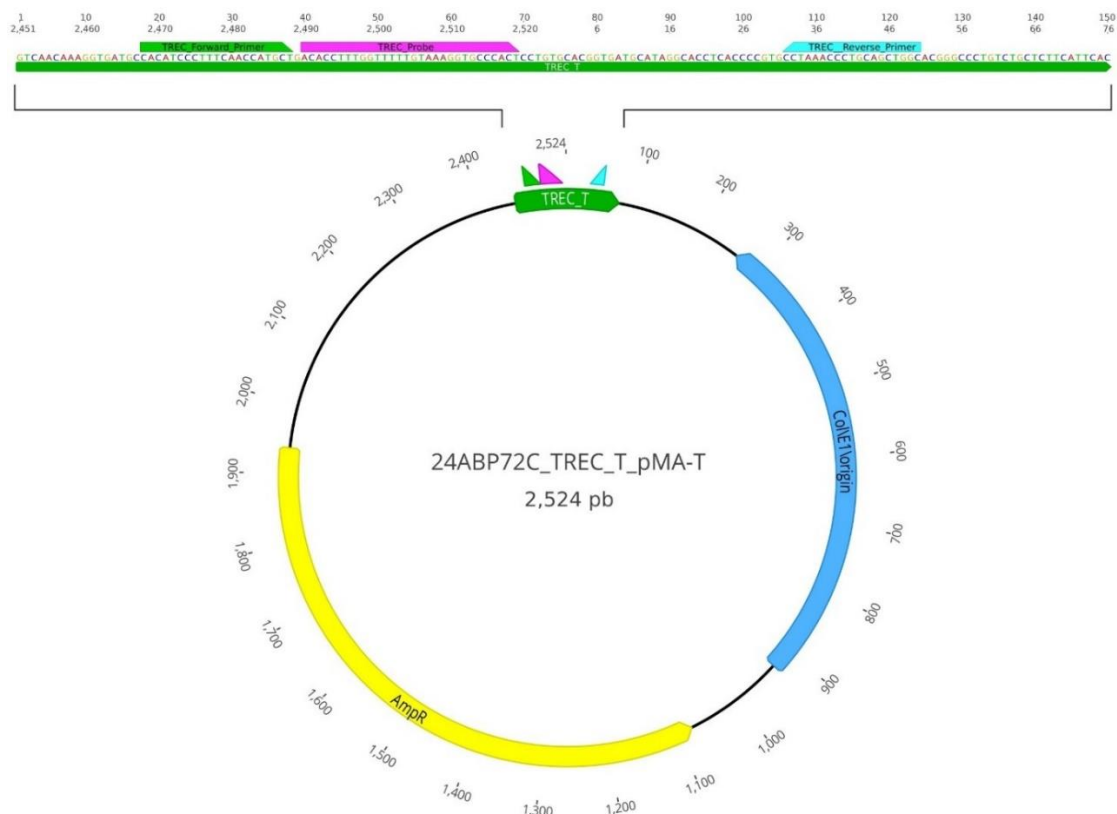


Figura 6: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo TREC e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.

Para construção do plasmídeo para o gene RNaseP, foi realizado o alinhamento das sequências dos primers e sondas do gene codificador da RNaseP (NM_006413-Homo sapiens ribonuclease subunidade p30 (RPP30)), as regiões de anelamento foram analisadas in sílico no Geneious Prime® de modo a selecionar a região onde o anelamento ocorre especificamente em uma região. Posteriormente a sequência escolhida foi enviada para síntese pela Thermo Fisher. o vetor com a sequência de RNaseP apresenta 2.561 pares de bases. A **Figura 7** retrata o plasmídeo confeccionado e a região de anelamento dos primers e a sonda para o alvo RNaseP.

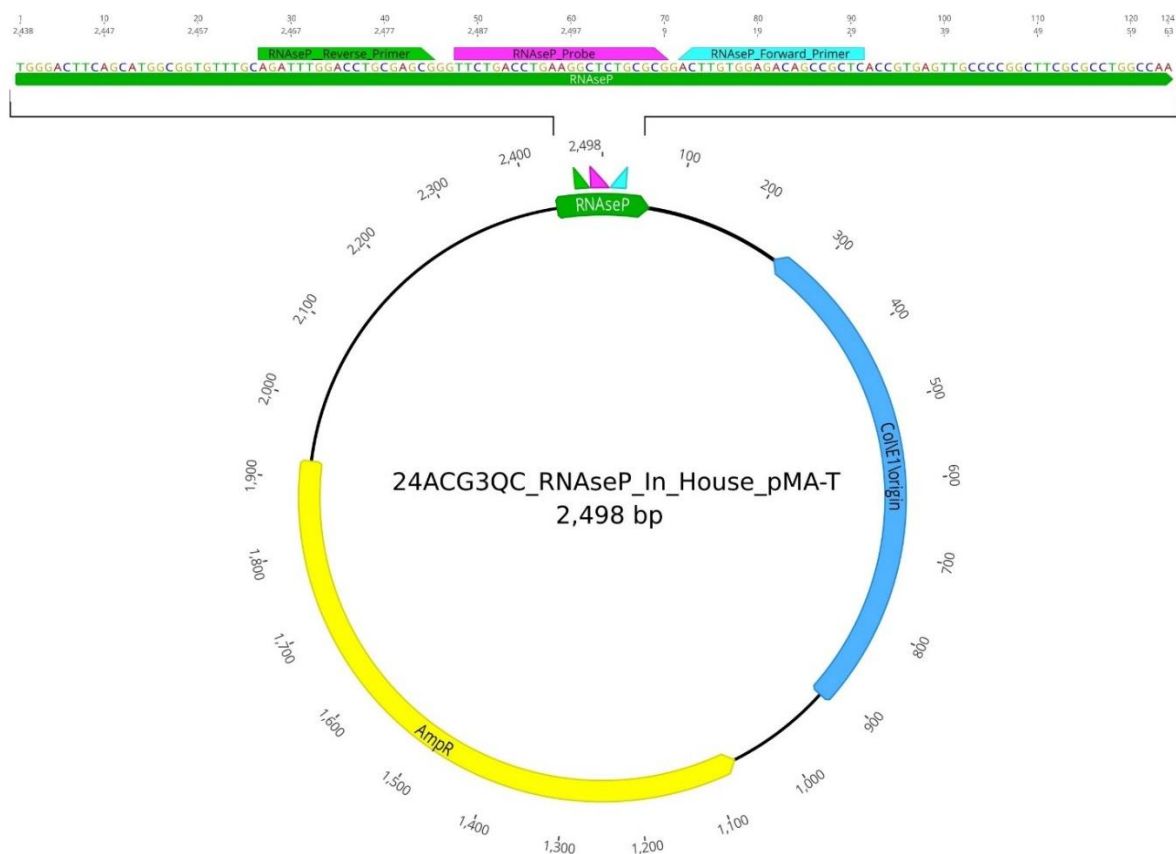


Figura 7: Região de anelamento dos primers e sonda para o alvo RNAseP e mapa dos plasmídeos no Software Geneious Prime.

3.6. Preparo dos Plasmídeos para serem utilizados na Curva Padrão

O preparo dos plasmídeos seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante Thermo Fisher. Inicialmente, os plasmídeos liofilizados foram diluídos com tampão Low TE. Para um plasmídeo liofilizado contendo 5 µg, foram adicionados 500 µL de tampão Low TE ao tubo, seguidos de vórtex e centrifugação.

Foi realizado o cálculo da concentração do plasmídeo em relação ao volume total adicionado na solução mãe.

Concentração =	Massa total (ng)
	Volume (µL)
Logo,	
Concentração =	500ng = 10ng/µL
	500 µL

Assim, a solução mãe de cada plasmídeo estava a 10ng/µL na solução final.

Para a determinação do número de cópias, foi utilizada a ferramenta disponível na Internet pela empresa ThermoFisher 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>)

Os plasmídeos utilizados para preparar a curva padrão para quantificação de TREC e KREC estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Relação dos Plasmídeos utilizados para preparo da Curva Padrão

Descrição	Lote	Volume final estoque (uL)	Pares de bases	ng/uL	cp/uL
TREC	24ABP72C - 3819480	500	2.524	10	$3,67 \times 10^9$
KREC	24ABP73C - 3819481	500	2.534	10	$3,66 \times 10^9$
RNAseP	24ACG3QC - 3857614	500	2.498	10	$3,60 \times 10^9$

Os tubos contendo os plasmídeos foram deixados em repouso na bancada por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de nova agitação e centrifugação para garantir a homogeneização completa. Cada plasmídeo foi diluído em uma proporção de 1:10 em uma solução de estabilização contendo 0,05% de detergente Tween®-20 em tampão Low TE, enriquecida com uma sequência aleatória de RNA de 200 bases, chamada AEC (número de acesso NCBI MF374500), para evitar a degradação dos plasmídeos durante o processo de diluição.

A solução foi desnaturada a 95°C por 10 minutos para desenovelar as sequências dos plasmídeos, alcançando uma concentração final de $3,3 \times 10^8$ cópias/ μ L. A partir da solução desnaturada, foi preparada uma nova diluição na proporção de 1:10, resultando em um estoque com concentração aproximada de $3,3 \times 10^7$ cópias/ μ L, armazenado a 4°C para uso em curto prazo. Cada diluição foi adequadamente misturada por vórtex e centrifugada antes de avançar para a próxima etapa, garantindo a estabilidade das diluições seriadas.

Finalmente, foram adicionados 10 μ L de cada plasmídeo em microtubos, complementados com 70 μ L da solução estabilizadora enriquecida com AEC e RNA sintético, resultando em uma concentração média de aproximadamente $3,3 \times 10^5$ cópias/ μ L para cada plasmídeo. As soluções foram submetidas a diluições seriadas para o preparo das curvas-padrão utilizadas nas análises.

3.7. Curva padrão

As curvas-padrão foram construídas para cada plasmídeo utilizando seis diluições seriadas na proporção de 1:10, visando calibrar a quantificação dos alvos. A estabilidade

dessas curvas foi avaliada sob diferentes condições experimentais, como mudanças de lotes de reagentes e pipetas, para validar sua aplicabilidade e verificar a possibilidade de importação de curvas previamente geradas. Para garantir a comparabilidade entre os alvos, os valores de RNaseP foram normalizados considerando as diferenças na concentração inicial de DNA entre as reações de TREC e KREC.

Para a construção dos pontos da curva-padrão, foram utilizados seis tubos de 1,5 mL, cada um contendo 90 µL da solução de estabilização previamente preparada. Inicialmente, 10 µL da solução de plasmídeos estoque, com concentração de $1,10 \times 10^5$ cópias/µL, foram adicionados ao primeiro tubo (Tubo 1). Este foi submetido a vortex por 10 segundos para homogeneização, seguido de uma centrifugação rápida em microcentrífuga. O mesmo procedimento foi repetido sucessivamente para os demais tubos, garantindo a diluição seriada na proporção de 1:10 até alcançar uma concentração final de $3,3 \times 10^0$ cópias/µL no sexto tubo (Tubo 6). Esse processo assegurou a precisão na construção das diluições utilizadas para a curva-padrão conforme **Figura 8**:

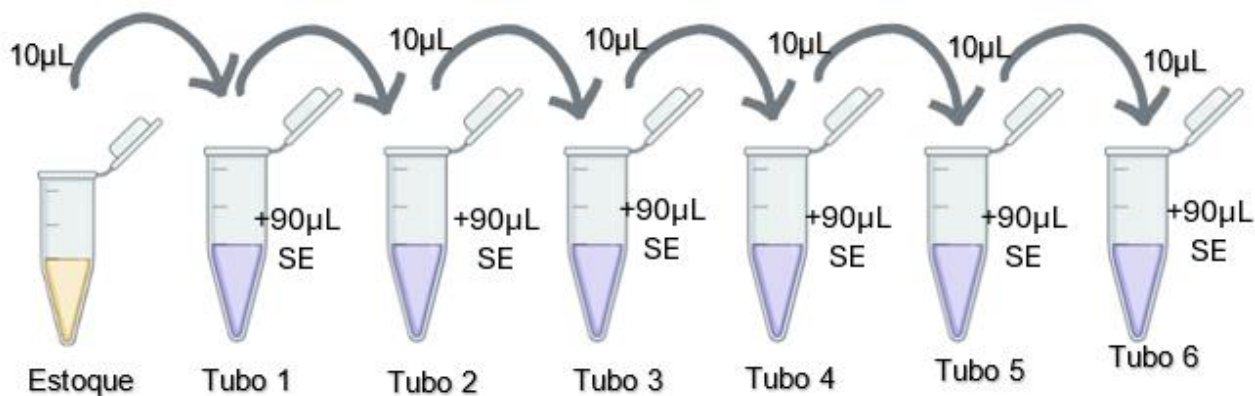


Figura 8: Esquema da diluição seriada dos plasmídeos. Diluídos na concentração 1:10, onde separa-se 6 tubos aos quais adicionamos inicialmente 90µL de Solução estabilizante (SE), em seguida, 10uL da solução de plasmídeo é adicionada, seguido de vortex e centrifugação rápida para cada tubo.

A **Tabela 4** discrimina a concentração em cópias por microlitro da solução de plasmídeo e o valor de cópias aproximada de reação, utilizando 8µL da solução de plasmídeos por reação.

Tabela 4: Concentrações de plasmídeos utilizadas na curva Padrão

Descrição	Volume do tubo (µL)	Vol. de reação	TREC		KREC		RNaseP	
			Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **	Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **	Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **
Mãe	500	8	3,67E+09	2,94E+10	3,66E+09	2,92E+10	3,71E+09	2,97E+10
Estoque A*	50	8	3,67E+08	2,94E+09	3,66E+08	2,92E+09	3,71E+08	2,97E+09
Estoque B	100	8	3,67E+07	2,94E+08	3,66E+07	2,92E+08	3,71E+07	2,97E+08

Estoque***	100	8	3,67E+06	2,94E+07	3,66E+06	2,92E+07	3,71E+06	2,97E+07
Ponto 1	100	8	3,67E+05	2,94E+06	3,66E+05	2,92E+06	3,71E+05	2,97E+06
Ponto 2	100	8	3,67E+04	2,94E+05	3,66E+04	2,92E+05	3,71E+04	2,97E+05
Ponto 3	100	8	3,67E+03	2,94E+04	3,66E+03	2,92E+04	3,71E+03	2,97E+04
Ponto 4	100	8	3,67E+02	2,94E+03	3,66E+02	2,92E+03	3,71E+02	2,97E+03
Ponto 5	100	8	3,67E+01	293,65	3,66E+01	2,92E+02	3,71E+01	2,97E+02
Ponto 6	100	8	3,67E+00	29,36	3,66E+00	29,25	3,71E+00	29,67

* Tubo desnaturado (95°C por 10 minutos); ** Valor atribuído a quantificação da reação no equipamento CFX; *** Tubo contendo os plasmídeos na proporção igualitária. Foram feitas várias alíquotas para congelar e fazer a curva padrão a partir desse ponto.

3.8. Cálculo do Slope e da Eficiência da Curva

Para determinar a eficiência da curva padrão, a razão de aumento (slope) e o intercepto (y-intercept) da curva de calibração foram calculados. A eficiência da reação PCR (E) pode ser calculada a partir da equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Os valores de Slope obtidos devem ser próximos de -3,32, o que corresponde a uma eficiência de 100%, indicando que a quantidade de produto de PCR dobra a cada ciclo. É ideal que o slope esteja entre -3,1 e -3,6, correspondendo a uma eficiência entre 90% e 110%, que é considerado aceitável de acordo com as diretrizes MIQE (Bustin et al. 2009).

O Y-intercept da curva de calibração foi interpretado como o valor de Ct correspondente a 1 cópia do alvo amplificado. Este valor serve como referência para a quantificação das amostras experimentais. A partir desse Y-intercept, as quantidades do alvo nas amostras foram calculadas usando a equação da linha de calibração, permitindo a determinação do número de cópias do alvo em cada amostra analisada.

3.9. Fator de Conversão: Cálculo para conversão de cópias por reação em cópias por µL de sangue

Para expressar a quantidade de TRECs e KRECs em cópias por microlitro (µL) de sangue a partir de uma reação de qPCR utilizando sangue seco em papel filtro, foi realizado um cálculo de conversão com base em publicações da literatura que estimam que um picote circular de 3,2 mm de diâmetro equivale a aproximadamente 3 µL de sangue (Lynch et al., 2013; Douek et al., 2010).

Foi utilizado um perfurador de 3,0 mm, não dispondo do padrão de 3,2 mm. Para corrigir essa diferença, foi calculada a área do picote ($A = \pi r^2$), resultando em:

Área do picote de 3,2 mm = 8,042 mm² (volume estimado de 3 µL);

Área do picote de 3,0 mm = 7,069 mm²;

A relação entre as áreas fornece um volume estimado de sangue no picote de 3,0 mm igual a 2,614 μL .

A extração foi realizada em um volume final de 34 μL de eluído. Em cada reação de qPCR foram utilizados 8 μL desse eluído, correspondendo a uma fração de $34/8 = 4,25$. Esse valor representa o quanto o resultado da reação (em cópias) deve ser multiplicado para estimar o total de cópias presentes na amostra extraída.

Em seguida, para expressar esse valor em cópias por μL de sangue original, divide-se esse fator de 4,25 pelo volume de sangue estimado no picote (2,614 μL), resultando em um fator de conversão igual a 1,63. Assim, o valor obtido em cópias por reação é multiplicado por 1,63 para se obter o resultado em cópias por μL de sangue.

Tabela 5 a abaixo, retrata o cálculo realizado para obtenção da conversão do número obtido de cópias por reação para o valor de cópias por μL de sangue.

Tabela 5: Relação de valores atribuídos ao cálculo para o Fator de conversão de Cópias/reação para Cópias/ μL de sangue

Volume de sangue - 3.0mm (tamanho do picote)	2,614
Volume eluído (μL)	34
Volume amostra em 20 (μL)	8
Volume total da PCR (μL)	20
Fator de reação	4,25
Fator de conversão (FC) (cópias/μL sangue)	1,63

3.10. Condições de reação (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em um termociclador CFX96 Dx (Bio-Rad). Durante a fase de otimização, os parâmetros da PCR seguiram as recomendações descritas na bula dos produtos. As condições iniciais consistiram em: Pré-incubação a 95°C por 30 segundos, amplificação a 95°C por 5 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, e resfriamento final a 40°C por 30 segundos. Após os testes de otimização, as condições de ciclagem foram ajustadas para as seguintes etapas: Desnaturação inicial: 50°C por 2 minutos, seguida de 95°C por 10 minutos. Amplificação: 45 ciclos, com: 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos (leitura de fluorescência), 65°C por 45 segundos (segunda leitura de fluorescência). O volume final das reações foi padronizado em 20 μL por poço. A composição da reação multiplex para os alvos TREC, KREC e RNaseP incluiu: DNA Master Mix (5 $\times$, Roche): 4 μL ; Primers (20 μM) e sondas (10 μM): TREC: 0,8 μL ; KREC: 0,8 μL ; RNaseP: 0,8 μL ; Água nucleasse free: 4,8 μL ; Amostra ou controle: 8 μL .

Os primers e sondas foram previamente reconstituídos e diluídos para concentrações estoque de 20 μM (primers) e 10 μM (sondas), formando assim um PrimeTime (PT), 25 vezes mais concentrado do que a reação. A **Tabela 6**, discrimina o resumo das condições de reação, para que na reação final, foram adicionados volumes equivalentes para alcançar as concentrações desejadas de 0,8 μM para primers e 0,4 μM para sondas.

Tabela 6: Resumo das Condições de Reação

COMPONENTE	1 Reação (μL)
Mix DNA MASTER ROCHE	4
PT TREC 25x	0,8
PT KREC 25x	0,8
PT RNaseP 25x	0,8
H ₂ O	5,6
Amostra/NPC/PC/NTC	8
Volume final	20

3.11. Determinação de Threshold de cada alvo da qPCR

A análise dos dados foi realizada no software do próprio termociclador CFX96 Dx (Bio-Rad). Os valores de Ct (cycle threshold) foram definidos pela interseção da curva de amplificação com o threshold estabelecido no início da fase exponencial de amplificação do DNA. O valor de threshold foi determinado com o auxílio de um script em Python, desenvolvido pelos orientadores e pela autora, que otimizou a precisão na definição dos pontos de leitura. Os valores de threshold estabelecidos para cada alvo foram 1080 para FAM-TREC, 885 para HEX-KREC e 225 para Cy5-RNaseP. Com os valores de Ct, foi possível calcular a concentração de TRECs, KRECs e RNaseP por microlitro de sangue, e a análise relativa, utilizando a equação da reta gerada pelas curvas-padrão das sequências dos plasmídeos.

3.12. Acurácia

A acurácia do ensaio foi avaliada utilizando amostras de controle com concentrações previamente conhecidas para os alvos TREC, KREC. O valor obtido no ensaio foi comparado ao valor esperado, calculando-se o percentual de recuperação. A análise foi realizada em triplicatas para garantir a representatividade dos resultados, e os valores aceitáveis de recuperação foram definidos entre 85% e 115%. Esses valores são usados para verificar se o método está quantificando adequadamente a quantidade de

DNA ou RNA em uma amostra, conforme recomendações das diretrizes MIQE (Bustin et al., 2009).

A acurácia foi avaliada comparando-se os resultados experimentais (valor observado) com os valores esperados (valor teórico ou conhecido). O percentual de recuperação é calculado pela fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{Valor observado} / \text{Valor esperado}) \times 100;$$

Onde:

Recuperação $\geq 85\%$ e $\leq 115\%$: Indica que o ensaio está produzindo resultados confiáveis, com valores muito próximos do real, dentro de um intervalo aceitável de variação para experimentos biológicos.

Recuperação $< 85\%$: Sugere que o método pode estar subestimando a quantidade do analito (perda na eficiência de amplificação ou interferências).

Recuperação $> 115\%$: Indica superestimação do analito, possivelmente devido a contaminação, amplificação inespecífica ou erro experimental.

3.13. Comparação de resultados com teste comercial

Realizamos a extração de DNA a partir de sangue seco em papel filtro (W903) utilizando o kit PREP-CITO DBS Extraction Kit. Para cada amostra, utilizamos três discos de 3,0 mm de diâmetro, incluindo um controle negativo (C-). No pré-tratamento, adicionamos 1.400 μL da solução de lavagem H aos tubos contendo os discos e o controle negativo, com homogeneização em vortex por 10 a 20 segundos. Os tubos foram incubados horizontalmente por 5 minutos à temperatura ambiente, com agitação ocasional, e então centrifugados a $16.000 \times g$ por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, deixamos 10 μL residuais para preservar os discos.

Na segunda lavagem, adicionamos 500 μL da solução CK, homogeneizamos por 20 segundos, incubamos por 2 minutos com agitação ocasional e centrifugamos novamente. Em seguida, adicionamos 100 μL da solução de lise, homogeneizamos e incubamos os tubos a 90°C por 20 minutos. Após resfriamento, adicionamos 2 μL da solução neutralizante e realizamos nova centrifugação.

Preparamos a mistura de reação combinando o tampão de PCR e a polimerase TechnoTaq MAX (10 μL de tampão e 0,5 μL de polimerase por tubo, considerando N+1 amostras). Adicionamos 10 μL da mistura a cada tubo, seguidos de 20 μL de óleo mineral. Cada tubo recebeu 5 μL de DNA eluido, com exceção dos tubos de controle (C-, C+1 e C+2), que receberam os respectivos controles.

Agitamos e centrifugamos brevemente os tubos antes de levá-los ao termociclador em tempo real. A análise dos resultados foi realizada automaticamente pelo software do equipamento ao término do protocolo.

3.14. Limite de Detecção

Para a estimativa do Limite de Detecção (LOD), utilizou-se a regressão probit, um método estatístico recomendado pelo CLSI EP17-A2. Os dados de detecção foram organizados como variáveis binárias (Detecção: Alterado/Normal) para cada ponto de diluição, baseando-se em múltiplas replicatas. A proporção de detecções foi convertida em valores de probit e plotada contra o logaritmo da concentração, permitindo a aplicação da equação linear da regressão para calcular o ponto onde a curva intercepta o valor correspondente ao LOD.

A equação da reta da regressão probit foi empregada para determinar a concentração com 95% de probabilidade de detecção conforme recomendada por Guilines de validação de métodos (Bustin et al. 2009). Os resultados foram analisados com base na curva padrão gerada para cada alvo, assegurando a inclusão de controles negativos e positivos em todas as reações. Conforme descrito na **Tabela 7**.

Tabela 7: Diluição seriada para determinação de LoD e LoQ

Descrição	Volume do tubo (µL)	Vol. de reação	TREC			KREC			RNaseP		
			Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **	Cópias/uL de Sangue	Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **	Cópias/uL de Sangue	Pontos da curva (cópias/µL)	Cópias/reação **	Cópias/uL de Sangue
Ponto 5	100	8	3,67E+01	293,65	478,65	3,66E+01	292,49	476,76	3,71E+01	296,71	483,63
Ponto 5 A	100	8	1,84E+01	146,82	239,32	1,83E+01	146,24	238,38	1,85E+01	148,35	241,81
Ponto 5 B	100	8	9,18E+00	73,41	119,66	9,14E+00	73,12	119,19	9,27E+00	74,18	120,91
Ponto 5 C	100	8	4,59E+00	36,71	59,83	4,57E+00	36,56	59,59	4,64E+00	37,09	60,45
Ponto 5 D	100	8	2,29E+00	18,35	29,92	2,29E+00	18,28	29,80	2,32E+00	18,54	30,23
Ponto 5 E	100	8	1,15E+00	9,18	14,96	1,14E+00	9,14	14,90	1,16E+00	9,27	15,11
Ponto 5 F	100	8	5,74E-01	4,59	7,48	5,71E-01	4,57	7,45	5,80E-01	4,64	7,56
Ponto 5 G	100	8	2,87E-01	2,29	3,74	2,86E-01	2,29	3,72	2,90E-01	2,32	3,78
Ponto 5H	100	8	1,43E-01	1,15	1,87	1,43E-01	1,14	1,86	1,45E-01	1,16	1,89

3.15. Limite de Quantificação

A determinação do Limite de Quantificação (LOQ) do ensaio de qPCR para os alvos foi realizada por meio de diluições seriadas de plasmídeos contendo as sequências-

alvo. As concentrações testadas variaram entre aproximadamente 146,82 cópias/reação (equivalente a 239 cópias/μL de sangue) e 1,15 cópias/reação (equivalente a 2 cópias/μL de sangue). Em cada ponto de diluição, foram usadas até 40 réplicas, especialmente para os pontos de menor concentração, a fim de garantir a precisão dos resultados. A definição do LOQ foi baseada em critérios da diretriz do MIQE (Bustin et al. 2009) para assegurar a confiabilidade do ensaio, os quais incluem:

- Coeficiente de Variação (CV%): O CV é calculado como o desvio padrão (DP) dos valores de Ct (ciclos de threshold) dividido pela média dos Ct, multiplicado por 100:

$$CV\% = (DP/Média \text{ de } Ct) \times 100$$

Para que o LOQ seja considerado validado, o CV deve ser igual ou inferior a 20% entre os valores de Ct das réplicas.

- Taxa de positividade: A taxa de positividade refere-se ao número de réplicas que apresentaram resultados positivos em relação ao total de réplicas analisadas. Para estabelecer o LOQ, é necessário que a taxa de positividade seja igual ou superior a 95%, ou seja, pelo menos 38 de 40 réplicas devem resultar em detecção positiva do alvo.

- Média de Ct consistente com a curva padrão, com padrão linear: A média dos valores de ciclos de threshold (Ct) obtidos para o ponto de diluição em questão deve corresponder à curva padrão. Esta curva é gerada usando uma análise de regressão linear com base em concentrações conhecidas dos padrões. Um bom ajuste da curva é indicado por um coeficiente de correlação (r^2) $\geq 0,98$, o que significa que há uma forte correlação entre a concentração dos padrões e os valores de Ct.

3.16. Linearidade

A linearidade foi avaliada com base na curva padrão gerada para os alvos TREC, KREC e RNaseP, utilizando diluições seriadas dos padrões de plasmídeo em concentrações que variáveis de cópias/μL. A análise de regressão linear foi realizada para cada alvo, determinando o coeficiente de correlação (R^2), e definidos os valores de aceitabilidade de 0,98, conforme as diretrizes da CLSI EP06-A (Clinical and Laboratory Standards Institute).

3.17. Especificidade

A especificidade foi avaliada pela inclusão de controles negativos e pela análise de cruzamento de sinal entre os alvos TREC, KREC e RNaseP em reações multiplex. A ausência de amplificação em controles negativos e a detecção específica de cada alvo na

presença de outros componentes da reação confirmaram a especificidade do ensaio. Adicionalmente, foram realizados testes de exclusividade com DNA genômico de diferentes fontes, garantindo a ausência de amplificação inespecífica.

3.18. Reprodutibilidade e Repetibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada por meio de experimentos de inter e intra-ensaio. Para isso, amostras em triplicata com diferentes concentrações dos alvos TREC, KREC e RNaseP foram testadas em três dias distintos. Cada teste foi realizado por operadores diferentes e utilizando lotes variados de reagentes, assegurando a robustez e a reprodutibilidade do protocolo.

Os valores de Ct e de quantificação absoluta foram registrados para cada amostra, e o coeficiente de variação (CV%) foi calculado. Segundo as diretrizes estabelecidas pelas MIQE Guidelines, foi considerada aceitável uma variabilidade inferior a 5% para replicações intra-ensaio e inferior a 10% para replicações inter-ensaio.

A repetibilidade foi determinada utilizando a mesma amostra em diferentes eventos de extração. A amostra foi testada em um único dia, em condições idênticas, para minimizar a variabilidade técnica. A análise foi realizada por um único operador utilizando o mesmo lote de reagentes.

Para a avaliação da repetibilidade, os valores de Ct e as quantificações absolutas foram medidos e o coeficiente de variação (CV%) foi calculado. Com base nas diretrizes estabelecidas pelas MIQE Guidelines, um CV% inferior a 5% foi considerado aceitável para garantir a precisão dentro do mesmo ensaio.

3.19. Depleção de linfócitos T/B

A depleção de linfócitos T e B foi realizada para verificar a sensibilidade e especificidade analítica do teste em diferentes concentrações. Em comparação com os valores encontrados de Linfócitos T e B totais por citometria de fluxo. O valor de corte para determinar se uma amostra era anormal ou inconclusiva foi assim estabelecido, garantindo 100% de sensibilidade para detectar amostras verdadeiramente alteradas (com baixo número de linfócitos T e B. A separação das populações linfocitárias foi feita por coluna magnética, seguida de mensuração em citometria de fluxo de amostras de sangue total. Essas amostras, consideradas normais e com valores previamente conhecidos, foram submetidas a um processo de diluição seriada. Durante o procedimento, foi realizado o "Skipe" do concentrado linfocitário, e a quantidade de TRECs e KRECs foi quantificada com o objetivo de padronizar a menor recuperação

possível de cópias, tanto em amostras de sangue total quanto em sangue condicionado em papel filtro com o intuito de utiliza-las como controle de reação e verificar a sensibilidade do teste.

O processo de separação para células B começa com o uso do Biotin-Antibody Cocktail, que contém anticorpos biotinilados capazes de se ligar aos marcadores presentes em células não-B, como CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, e CD235a. Esses anticorpos biotinilados se ligam às células não-B, e as MicroBeads anti-biotina se aderem aos anticorpos. Quando a amostra é aplicada na coluna magnética, as células não-B, marcadas pelas MicroBeads, são retidas na coluna devido à ação do campo magnético. As células B, que não foram rotuladas, passam pela coluna e são coletadas no eluato. Se uma eluição opcional for realizada, as células não-B, que estavam retidas na coluna, podem ser coletadas ao remover a coluna do campo magnético e empregar um êmbolo.

Para a separação de células T, o processo é semelhante. O Biotin-Antibody Cocktail, que contém anticorpos biotinilados, se liga aos marcadores presentes em células não-T, como CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 e CD235a (GlycophorinA). Essas células não-T, marcadas com as MicroBeads anti-biotina, são retidas na coluna magnética, enquanto as células T, que não foram rotuladas, passam pela coluna e são coletadas no eluato. Assim como no caso das células B, se for realizada a etapa de eluição, as células não-T retidas podem ser coletadas.

Para garantir um bom desempenho do protocolo, é fundamental manter as células frias e trabalhar com soluções previamente resfriadas (2-8 °C). Os volumes recomendados para a rotulagem magnética são baseados em até 10^7 células totais, sendo que, ao trabalhar com quantidades menores ou maiores de células, deve-se ajustar proporcionalmente os volumes de reagentes e a solução total. Para um desempenho ideal, é importante garantir que a suspensão celular esteja bem homogeneizada antes da rotulagem magnética.

O processo de preparação das células inclui várias etapas, iniciando com a centrifugação de amostras de sangue total a 3000 rpm por 10 minutos. Após a separação da camada leucocitária, esta é transferida para falcons de 15 mL contendo soluções adequadas, como água livre de nuclease e Phamalyze. A suspensão é cuidadosamente homogeneizada e centrifugada, e, ao final, o pellet celular é suspenso em PBS. O próximo passo é a rotulagem magnética, onde o pellet é suspenso em buffer e incubado com o Biotin-Antibody Cocktail e as MicroBeads anti-biotina.

Após a incubação, a separação magnética é realizada utilizando uma coluna magnética. A coluna é lavada com buffer adequado, e o eluato, que contém as células não marcadas, é coletado. No caso das células B ou T, as células não rotuladas são as que representam o isolamento enriquecido. Se a etapa de eluição for realizada, as células não marcadas são expelidas da coluna usando um êmbolo.

3.20. Estabilidade do DNA extraído de amostras de sangue seco

Para verificar a estabilidade do DNA extraído de amostras de sangue seco em papel filtro (W903), foi realizado um experimento com cinco replicatas biológicas de cada amostra, submetidas ao processo completo de extração e qPCR em intervalos regulares de tempo: 1, 4, 7, 10 e 13 dias após a coleta. Essa abordagem visou simular as condições reais da rotina laboratorial e avaliar a confiabilidade dos alvos moleculares ao longo do tempo.

A estabilidade das amostras foi calculada com base nas amplificações válidas de cada alvo, considerando aquelas com valores de quantificação > 0. Para cada dia de análise, os dados foram obtidos da seguinte forma:

- Amplificações válidas: Número de amostras com quantificação válida para cada alvo.
- Total analisado: Número total de amostras naquele dia, incluindo aquelas com falhas.
- Estabilidade estimada (%): Calculada conforme a fórmula:

$$\text{Estabilidade estimada (\%)} = \frac{(\text{Amplificações válidas}) \times 100}{\text{Total analisado}}$$

4. RESULTADOS

4.1. Definição de Threshold para todas as reações

A análise dos dados foi realizada utilizando o software do próprio termociclador CFX96 Dx (Bio-Rad). Os valores de Ct (cycle threshold) foram definidos a partir da interseção da curva de amplificação com o threshold estabelecido no início da fase exponencial da reação de PCR, conforme critérios padronizados para ensaios quantitativos. Para garantir maior precisão e reprodutibilidade na determinação dos pontos de leitura, o valor ideal de threshold foi definido com o auxílio de um script em Python. Esse algoritmo automatizado selecionou, para cada canal de fluorescência, o valor de threshold mais próximo daquele no qual a eficiência da curva de amplificação global se aproximava de 1. A **Figura 9** demonstra o gráfico dos valores encontrados bem como o compilado de 24 reações realizadas para chegar a esse valor, os valores finais de threshold foram aplicados a todas as reações garantindo a validade do modelo de quantificação. Os valores finais de threshold adotados foram: 1.080 para o canal FAM-TREC, 885 para HEX-KREC e 225 para Cy5-RNaseP. A partir dos valores de Ct obtidos, foi possível calcular as concentrações absolutas de TREC, KREC e RNaseP por microlitro de sangue, com base na equação da reta derivada das curvas-padrão construídas com diluições seriadas de plasmídeos contendo as sequências alvo.

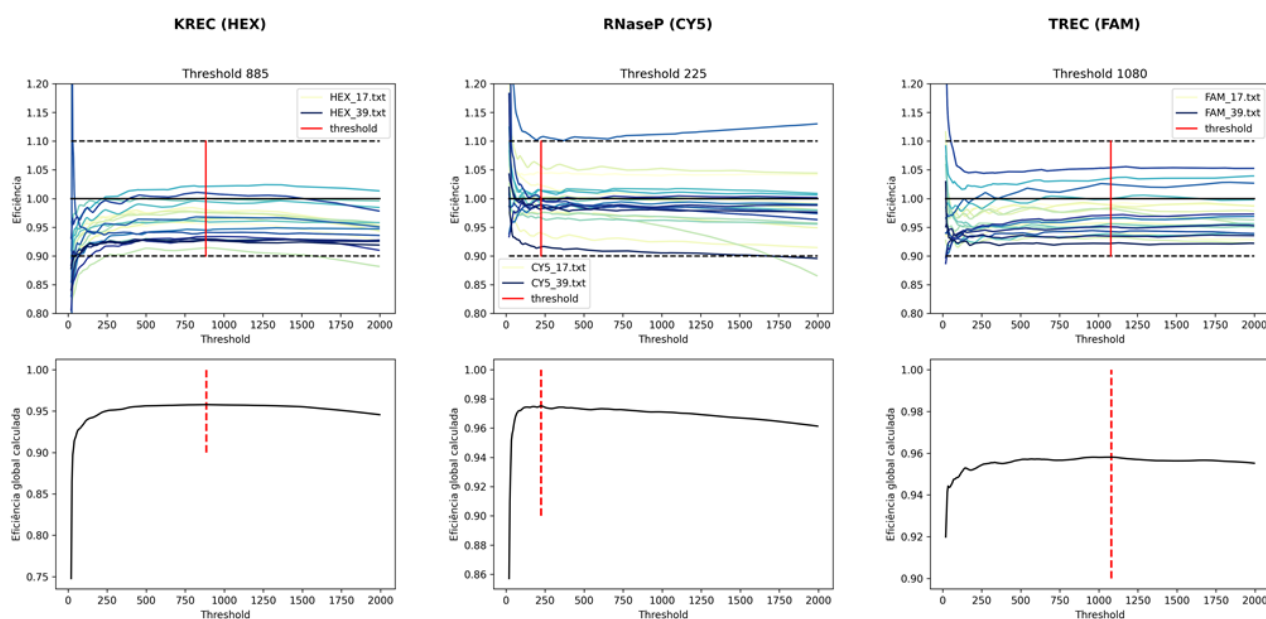


Figura 9: Determinação do Threshold para os fluoróforos FAM, HEX e Cy5. Os gráficos da parte superior apresentam os valores de eficiência em função do threshold. Os gráficos da parte inferior apresentam os valores de eficiência global calculada em função do threshold. As linhas tracejadas pretas indicam os valores mínimos e máximos aceitáveis para eficiência (0,9 e 1,1). A linha tracejada vermelha indica o valor de Threshold em que as eficiências são globalmente maximizadas (mais próximas de 1).

4.2. Curva Padrão

Foram realizadas 24 reações de curva-padrão em triplicata para avaliar a linearidade e reprodutibilidade do ensaio de qPCR multiplex. Durante o experimento, ocorreram dois erros de pipetagem por parte do operador. Como os pontos de curva estavam concentrados no mesmo tubo, as reações 29 e 34 tiveram o ponto de curva P5 com o valor esperado para todos os alvos no P6. Esses pontos discrepantes foram identificados e considerados na **Figura 9**, porém, excluídos na análise final da curva. No entanto, os demais pontos da curva foram discriminados corretamente, garantindo a confiabilidade dos dados.

A **Figura 10** apresenta os valores de Ct obtidos para os diferentes alvos nos diferentes pontos de diluição ao longo dos experimentos. a correlação entre os alvos, destacando os valores de Ct obtidos em cada ponto da curva. Os valores individuais das triplicatas estão representados em linhas pontilhadas, cada uma com um marcador específico: triângulo (Δ), estrela $\star$ e círculo ($\bullet$). As médias são indicadas por linhas contínuas e marcadas com uma cruz (+). A linha preta discrimina 1 desvio padrão em relação à média dos resultados. Para cada três reações realizadas, foi feita uma nova diluição dos pontos de curva a partir do ponto denominado "0", mantido sob refrigeração a 4°C.

Foram utilizados quatro equipamentos distintos para amplificação das curvas-padrão e das amostras de acurácia. No equipamento identificado como CFX 19, os valores de RFU (Relative Fluorescence Units) foram mais elevados, resultando em valores de Ct ligeiramente menores em comparação com os demais equipamentos. Essa diferença pode estar associada à sensibilidade do detector óptico ou à calibração específica do instrumento. No entanto, esses valores foram mantidos na análise final, assim como a definição do threshold para cada fluoróforo, uma vez que o objetivo era incluir o máximo de variáveis possíveis na curva. Dessa forma, foi possível avaliar desafios laboratoriais comuns, como a disponibilidade de equipamentos, mudanças de lote de reagentes e variações entre operadores.

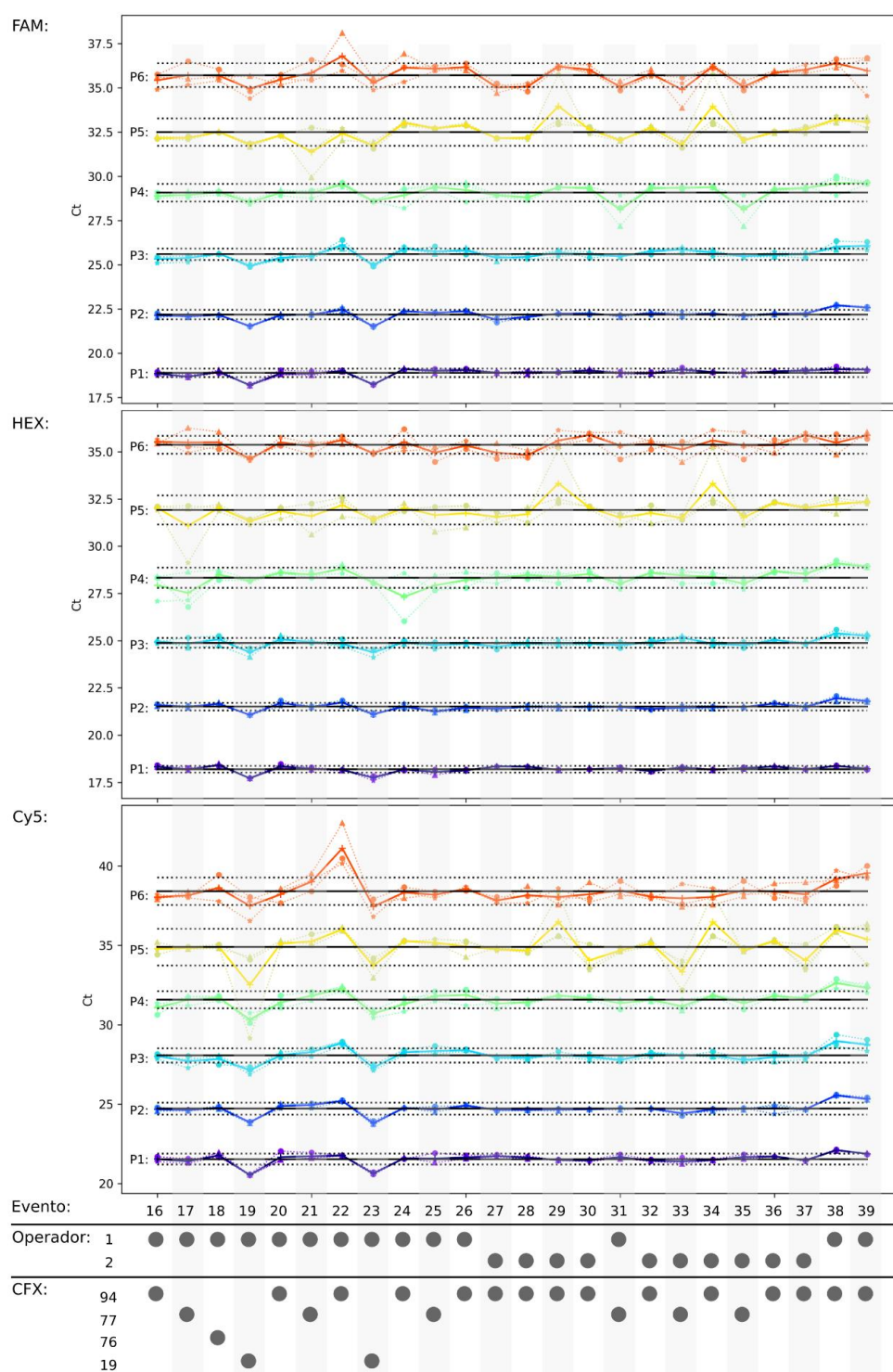


Figura 10: Gráfico representativo de 24 reações realizadas em triplicata da Curva Padrão. Os gráficos apresentam os valores de Ct para os diferentes alvos em função do experimento (números 16 a 39). A linha tracejada indica 1 vez o desvio padrão para cada ponto de diluição P1 a P6. Os operadores e os respectivos equipamentos (CFX) estão indicados com os círculos na parte inferior do gráfico.

As análises foram conduzidas em grupos de três reações, correspondendo ao número máximo de reações viáveis utilizando o volume disponível da diluição da curva padrão (100 µL), sem a necessidade de novo preparo.

O grupo 16 a 18: Na reação 16, uma das triplicatas do ponto P4 apresentou Ct menor que as demais para o alvo KREC - HEX. Na reação 17, o mesmo ponto apresentou Ct menor que a média esperada em duas réplicas, e uma das réplicas do ponto 5 foi pipetada incorretamente com o valor do ponto 4. Já na reação 18, não ocorreram falhas operacionais representativas, mesmo sendo realizadas em três equipamentos distintos: CFX 94, 77 e 77.

Grupo 19 a 21: Na reação 19, todos os fluoróforos apresentaram valores de Ct menores que o esperado, ficando em quase todos os pontos fora de 1 desvio padrão da média dos ensaios. Na reação 20, não foram observadas falhas operacionais ou diferenças representativas entre as réplicas, mantendo-se dentro do padrão de 1 desvio. Na reação 21, observou-se maior variabilidade de Ct entre as réplicas do alvo KREC - HEX.

Grupo 22 a 24: Na reação 22, houve maior variabilidade de Ct entre as réplicas do ponto 6 para os alvos TREC - FAM e Cy5 - RNaseP. Na reação 23, todos os fluoróforos apresentaram valores de Ct menores do que o esperado, ficando quase todos os pontos fora de 1 desvio padrão da média. Coincidentemente, a outra reação com esse mesmo comportamento foi realizada no CFX 19.

Grupo 25 a 27: Não foram observadas falhas operacionais ou diferenças representativas entre as réplicas, ficando dentro do padrão de 1 desvio.

Grupo 28 a 30: Na reação 29, ocorreu um erro operacional: uma das réplicas do ponto 5 não foi pipetada e, no seu lugar, foi pipetado o ponto 6.

Grupo 31 a 33: As reações 31 e 33 apresentaram maior variabilidade nos últimos pontos da curva, sendo realizadas no CFX 77.

Grupo 34 a 36: Na reação 34, ocorreu um erro operacional semelhante ao observado na reação 29, com troca entre os pontos 5 e 6. Na reação 35, foi observada maior variabilidade no ponto 4 para o alvo FAM - TREC.

Grupo 37 a 39: Neste grupo, houve troca do lote do conjunto de primers e sondas para todos os alvos. Nas reações 38 e 39, os valores de Ct dos pontos de curva ficaram mais altos, porém próximos ao valor de 1 desvio padrão.

As figuras a seguir retratam as curvas de amplificação das 24 rotinas analisadas. As amplificações dos alvos foram avaliadas em diferentes concentrações de DNA, variando de $2,6 \times 10^6$ a $2,6 \times 10^1$ cópias/ μ L. As curvas de amplificação apresentaram padrões consistentes, sem sinais de inibição ou formação de produtos inespecíficos. Os valores de Ct variaram conforme esperado com a diluição das amostras, mantendo a

proporção logarítmica predita pela curva padrão, exceto nas duas corridas mencionadas que apresentaram erros operacionais.

Na **Figura 11**, são apresentadas as curvas amplificações para cada ponto da curva padrão (P1 a P6). Não foi observado padrão de decaimento na eficiência calculada, que variou entre 98% e 102%, garantindo a confiabilidade do teste multiplex. A substituição do conjunto de primers e sondas resultou em um leve aumento nos valores de Ct, especialmente para os alvos TREC e KREC. Apesar disso, a linearidade e a eficiência do ensaio foram mantidas dentro dos padrões aceitáveis. O ajuste da concentração de primers e a otimização das condições de ciclagem minimizaram a variação, garantindo que as alterações não comprometessem a robustez do método.

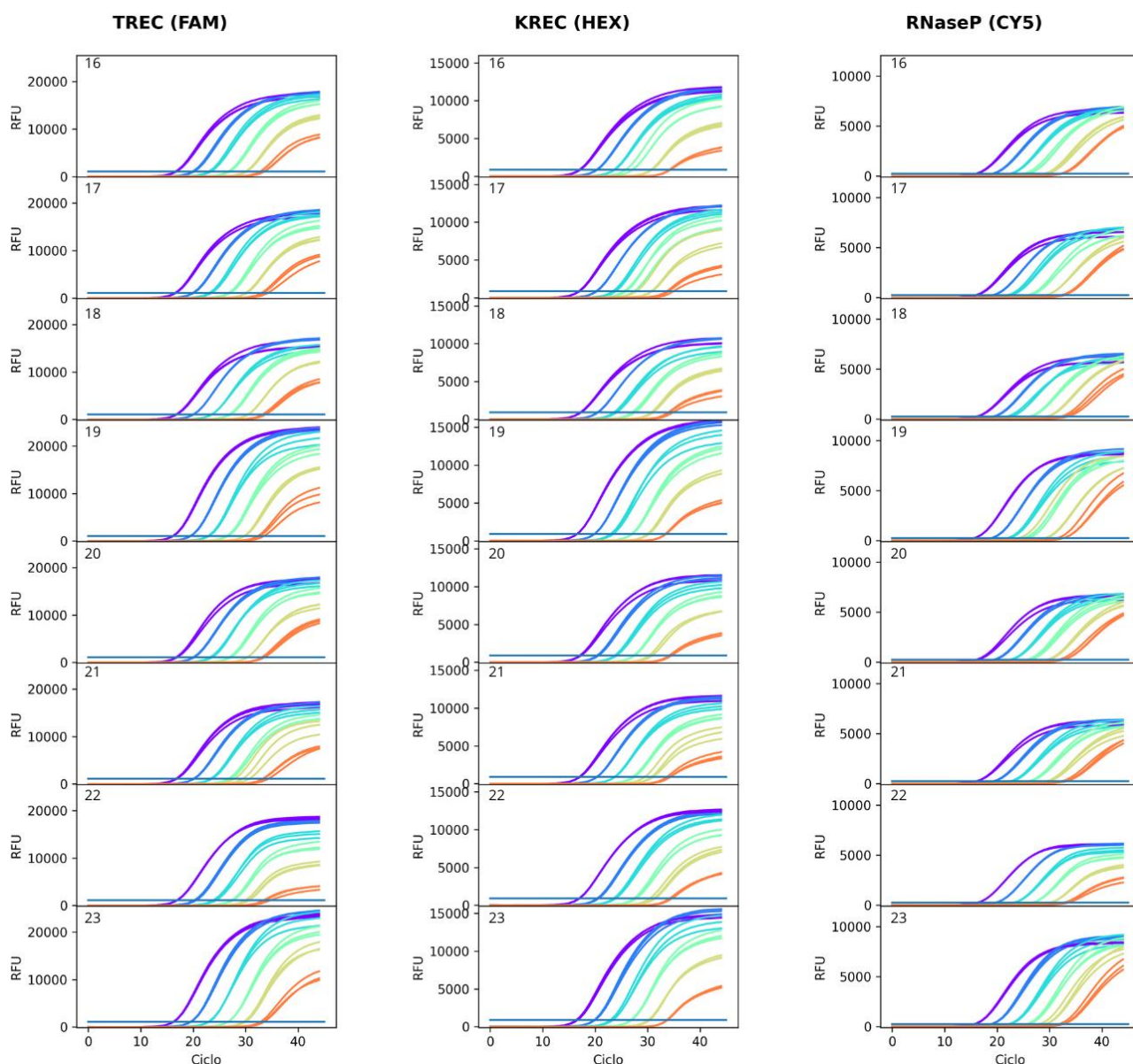


Figura 11: Perfil de amplificação para cada fluoróforo para as reações 16 a 23.

As reações 16 a 23 nas concentrações em $2,6 \times 10^6$, em roxo, $2,6 \times 10^5$ em azul escuro, $2,6 \times 10^4$ em azul claro, $2,6 \times 10^3$ em verde, $2,6 \times 10^2$ em bege e $2,6 \times 10^1$ em laranja.

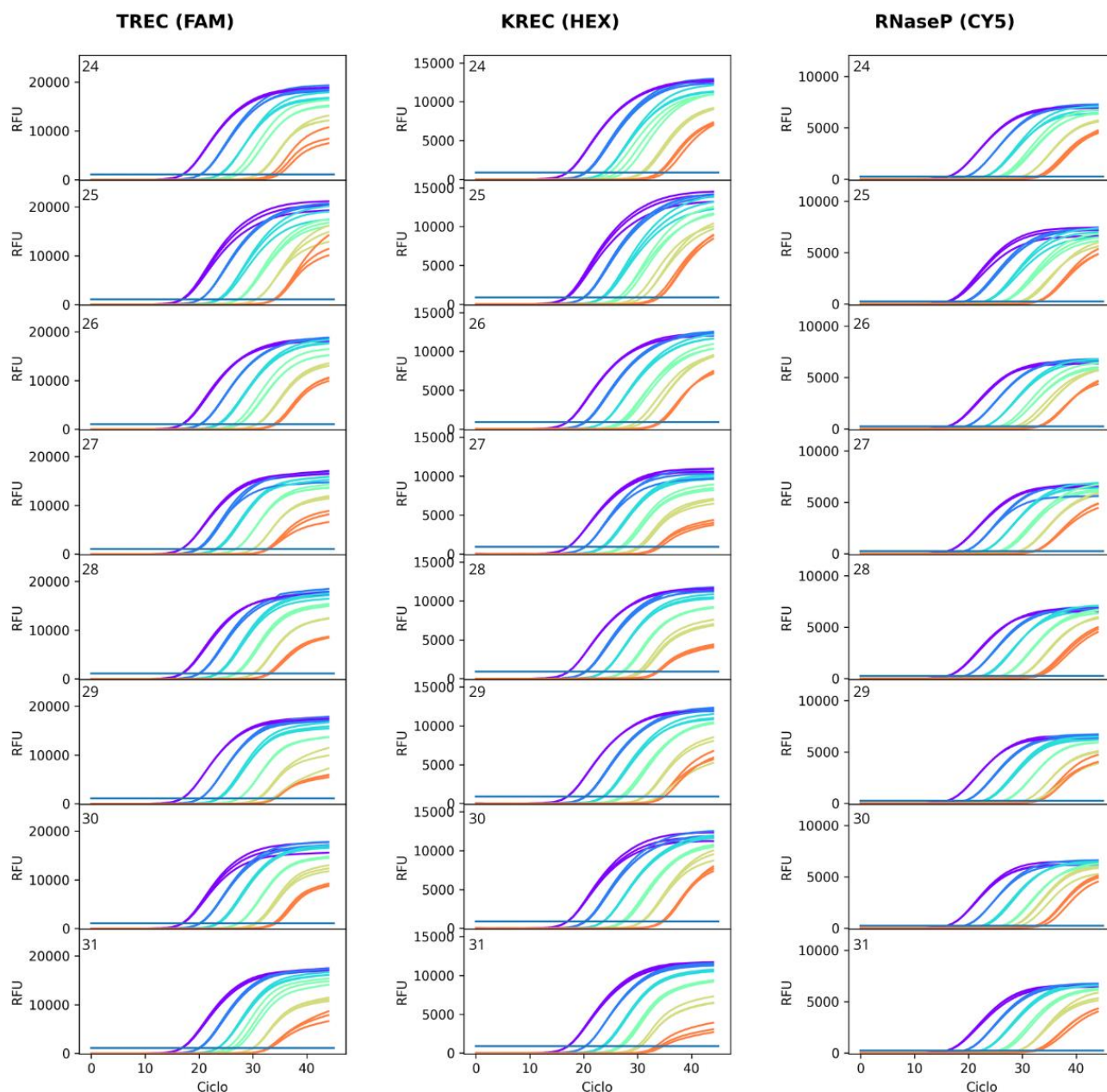


Figura 12: Perfil de amplificação para cada alvo para as reações de 24 a 31. Amplificações para cada alvo, das reações 24 a 31 nas concentrações em $2,6 \times 10^6$, em roxo, $2,6 \times 10^5$ em azul escuro, $2,6 \times 10^4$ em azul claro, $2,6 \times 10^3$ em verde, $2,6 \times 10^2$ em bege e $2,6 \times 10^1$ em laranja.

As análises comparativas entre equipamentos demonstraram que o CFX 19 apresentou maior valor fluorescência máxima atingida. No entanto, todos os equipamentos mantiveram a linearidade da curva padrão e eficiência satisfatória. Esses resultados evidenciam a flexibilidade do protocolo para diferentes plataformas de qPCR, garantindo sua aplicabilidade em distintos contextos laboratoriais.

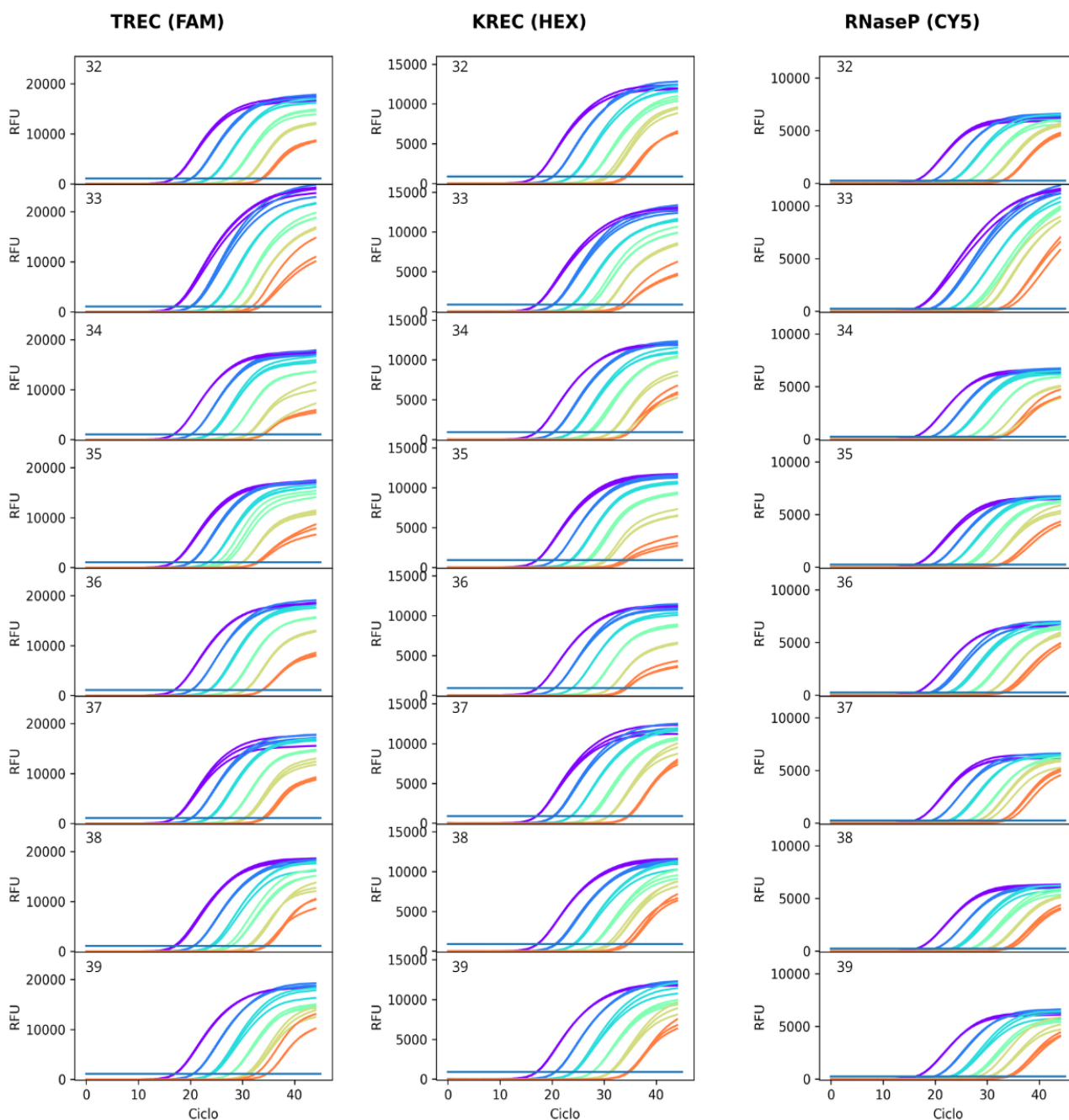


Figura 13: Perfil de amplificação para cada fluoróforo para reações de 32 a 39.

As amplificações para cada fluoróforo das reações 34 a 39 nas concentrações em $2,6 \times 10^6$, em roxo, $2,6 \times 10^5$ em azul escuro, $2,6 \times 10^4$ em azul claro, $2,6 \times 10^3$ em verde, $2,6 \times 10^2$ em bege e $2,6 \times 10^1$ em laranja.

Nas últimas rodadas experimentais, a substituição do lote de primers e sondas resultou em um discreto aumento nos valores de Ct em determinados pontos da curva, sugerindo uma possível variação na eficiência de amplificação. Entretanto, essa alteração não comprometeu a linearidade do ensaio, que manteve um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99.

Limite de Detecção (LOD)

A determinação do Limite de Detecção (LOD) foi realizada utilizando os mesmos pontos de diluição dos plasmídeos empregados na construção da curva padrão (diluições 1/10) acrescido de pontos diluídos 1/2. Para a estimativa do LOD, foi aplicado o modelo estatístico de regressão probit, conforme recomendado pelas diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI EP17-A2), a fim de identificar a concentração com 95% de probabilidade de detecção.

A curva-padrão apresentou inclinação de 3,16 e coeficiente de determinação $R^2 = 0,9814$, indicando eficiência de amplificação. O limite de detecção (LOD) foi estimado em 7,88 cópias por reação, conforme demonstrado na **Tabela 8**. Após a aplicação do fator de conversão de 1,63, correspondente à diluição no preparo da amostra, obteve-se o valor de 12,84 cópias/ μ L de sangue. Esse limite foi calculado com 95% de confiança com base na análise Probit, que considera a frequência de detecção em diferentes concentrações conhecidas.

Após a aplicação do fator de conversão de 1,63, correspondente à diluição no preparo da amostra, obteve-se o valor de 12,80 cópias/ μ L de sangue. Esse limite foi calculado com 95% de confiança com base na análise Probit, que considera a frequência de detecção em diferentes concentrações conhecidas.

Tabela 8: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit

N	Concentração da amostra em Cópia/ μ L	Log da concentração	Número de resultados Detectados	Número de resultados Não Detectados	Número de resultados Detectados	Probit
1	147	2,38	3	0	100,00%	
2	73,41	2,08	3	0	100,00%	
3	36,71	1,78	3	0	100,00%	
4	18,35	1,47	23	0	100,00%	
5	9,18	1,17	38	1	97,44%	6,949111997
6	4,59	0,87	30	10	75,00%	5,67448975
7	2,29	0,57	19	16	54,29%	5,107634392
8	1,15	0,27	4	23	14,81%	3,955591205

A **Figura 14** apresenta a relação entre a concentração logarítmica do alvo ($\log_{10}$) e a probabilidade cumulativa de detecção (%), obtida a partir dos ensaios de diluição seriada. Observa-se uma tendência crescente de detecção conforme o aumento da concentração, com taxas superiores a 95% a partir de aproximadamente $\log 1,17$,

correspondente a 9,18 cópias por reação. Essa análise permitiu estimar o LOD com 95% de confiança em 6,94 cópias por reação, confirmando a sensibilidade do ensaio dentro dos critérios recomendados para métodos moleculares aplicados à triagem neonatal.

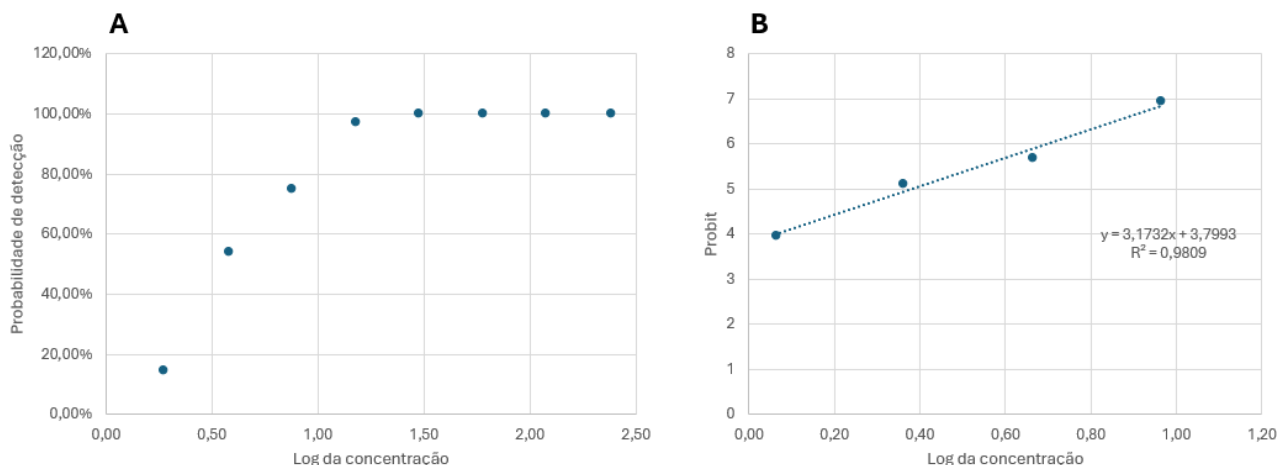


Figura 14:–Probabilidade de detecção versus Log da concentração e Regressão Probit TREC
 (A) Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração – TREC. O limite de detecção (LOD) foi estimado em 7,88 cópias por reação. (B) Regressão linear Probit do Alvo TREC para estimativa do limite de detecção (LOD) com 95% de confiança. A equação gerada ($y = 3,1732x + 3,7993$) apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,9809$.

A **Figura 14** apresenta ainda a regressão linear ajustada entre o logaritmo da concentração ($\log_{10}$) e os respectivos valores de Probit, utilizados para estimativa do limite de detecção (LOD) com 95% de confiança. A equação gerada ($y = 3,1732x + 3,7993$) apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,9809$, evidenciando forte correlação linear entre os pontos experimentais e o modelo estatístico. Essa relação confirma a robustez do método para estimar, com alta confiabilidade, a menor concentração detectável do ensaio.

Para o alvo KREC, com base nos dados revisados, a curva-padrão apresentou inclinação de 3,16 e coeficiente de determinação $R^2 = 0,981$, indicando alta eficiência de amplificação e ajuste do modelo. O limite de detecção (LOD) foi estimado em 7,85 cópias por reação, conforme demonstrado na **Tabela 9**. Após a aplicação do fator de conversão de 1,63, correspondente à diluição no preparo da amostra, obteve-se o valor de 12,79 cópias por μL de sangue. Esse limite foi calculado com 95% de confiança com base na análise Probit, que considera a frequência de detecção em diferentes concentrações conhecidas.

Tabela 9: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit

N	Concentração da amostra em Cópia/ μL	Log da concentração	Número de resultados Detectados	Número de resultados Não Detectados	Número de resultados Detectados	Probit
---	---	---------------------	---------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------	--------

1	146	2,38	3	0	100,00%	
2	73,12	2,08	3	0	100,00%	
3	36,56	1,78	3	0	100,00%	
4	18,28	1,47	23	0	100,00%	
5	9,14	1,17	39	1	97,50%	6,959963985
6	4,57	0,87	34	6	85,00%	6,036433389
7	2,29	0,57	25	15	62,50%	5,318639364
8	1,14	0,27	22	18	55,00%	5,125661347

A interseção da reta com o valor de probit de 6,64 resultou em um LOD de 7,88 cópias/reação, equivalente ao logaritmo de 0,895. Após aplicação do fator de conversão de 1,63, obteve-se o valor correspondente de 12,82 cópias/μL de sangue.

A **Figura 15** apresenta a relação entre a concentração logarítmica do alvo (log10) e a probabilidade cumulativa de detecção (%), obtida a partir dos ensaios de diluição seriada. Observa-se uma tendência crescente de detecção conforme o aumento da concentração, com taxas superiores a 95% a partir de aproximadamente log 1,17, correspondente a 9,14 cópias por reação. Essa análise permitiu estimar o LOD (Limit of Detection) com 95% de confiança em 6,64 cópias por reação, confirmando a sensibilidade do ensaio dentro dos critérios recomendados para métodos moleculares aplicados à triagem neonatal.

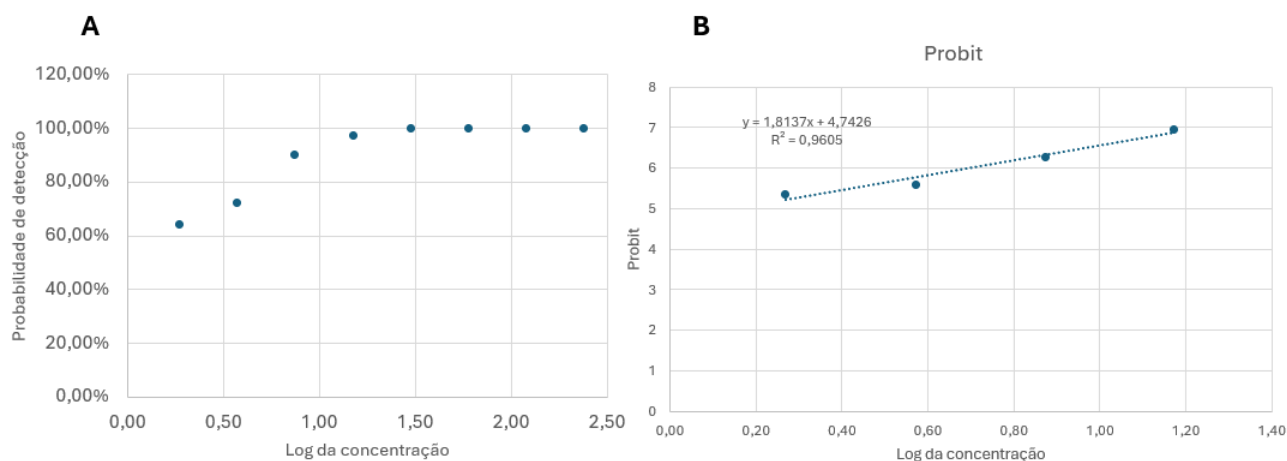


Figura 15: Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração KREC e Probit. (A) Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração – KREC. O limite de detecção (LOD) foi estimado em cópias por reação. (B) Regressão linear Probit do Alvo TREC para estimativa do limite de detecção (LOD) com 95% de confiança em 6,64 cópias por reação. A equação gerada ($y = 1,8137x + 4,7426$) apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,9605$.

A **Figura 15** ainda, apresenta a regressão linear ajustada entre o logaritmo da concentração (log10) e os respectivos valores de Probit, utilizados para estimativa do limite de detecção (LOD) com 95% de confiança. A equação gerada ($y = 1,8137x + 4,7426$) apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,99605$, evidenciando forte correlação linear entre os pontos experimentais e o modelo estatístico. Essa relação confirma a

robustez do método para estimar, com alta confiabilidade, a menor concentração detectável do ensaio.

Para o alvo RNaseP, com base nos dados revisados, a análise de regressão Probit aplicada resultou em um limite de detecção (LOD) de 8,10 cópias por reação, correspondente ao logaritmo de concentração de 0,90. Após a aplicação do fator de conversão de 1,63, esse valor foi equivalente a 13,21 cópias/ μ L de sangue. Conforme demonstrado na curva-padrão para o RNaseP apresentou uma inclinação de 2,10 e um coeficiente de determinação $R^2 = 0,934$, indicando boa linearidade do modelo e desempenho consistente do ensaio, mesmo em concentrações próximas ao limite de detecção.

Tabela 10, a curva-padrão para o RNaseP apresentou uma inclinação de 2,10 e um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9346$, indicando boa linearidade do modelo e desempenho consistente do ensaio, mesmo em concentrações próximas ao limite de detecção.

Tabela 10: Relação de cópias por reação para determinação de LOD e cálculo Probit RNaseP

N	Concentração da amostra em Cópias/ μ L	Log da concentração	Número de resultados Detectados	Número de resultados Não Detectados	Número de resultados Detectados	Probit
1	148,35	2,17	3	0	100,00%	
2	74,18	1,87	3	0	100,00%	
3	37,09	1,57	3	0	100,00%	
4	18,54	1,27	23	0	100,00%	
5	9,27	0,97	39	1	97,50%	6,959963985
6	4,64	0,67	33	7	82,50%	5,934589291
7	2,32	0,37	22	13	62,86%	5,328072108
8	1,16	0,06	13	12	52,00%	5,050153583

A **Figura 16** apresenta a relação entre o logaritmo da concentração ($\log_{10}$) e a probabilidade de detecção (%) do alvo RNaseP, baseada nos resultados obtidos em diferentes diluições do material controle. Observa-se uma tendência crescente de detecção com o aumento da concentração, alcançando $\geq 95\%$ de positividade nas diluições com $\log \geq 0,90$. Esses dados sustentam a definição do limite de detecção (LOD) do ensaio em 8,10 cópias por reação, com base em análise Probit, como o menor ponto com probabilidade de detecção $\geq 95\%$.

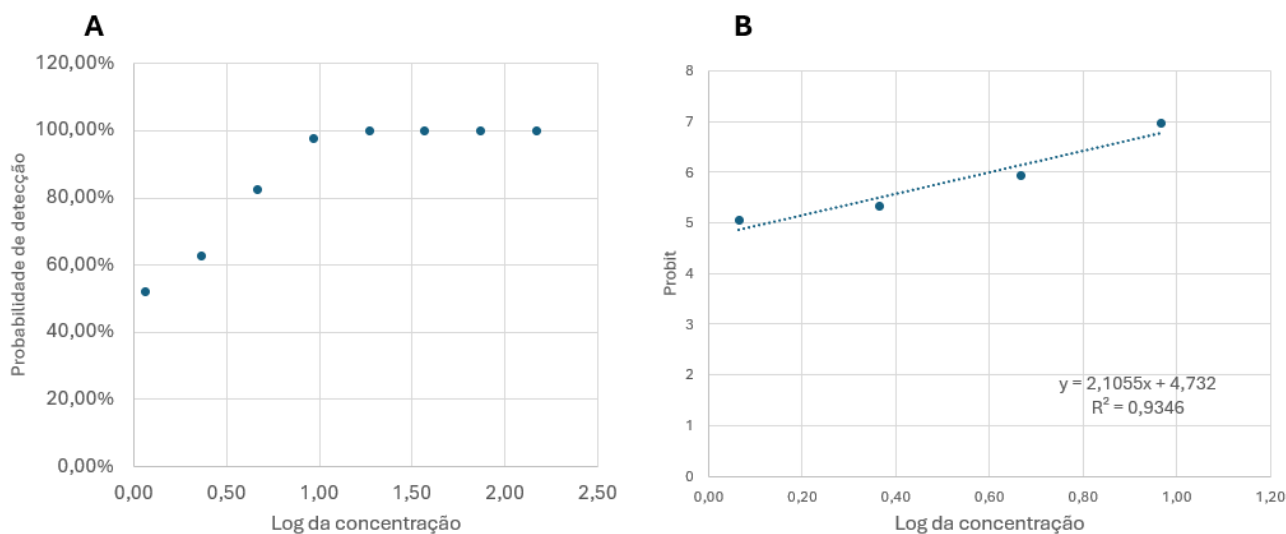


Figura 16: Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração e Regressão Probit para o alvo RNaseP.

(A) Curva de probabilidade de detecção em função do log da concentração – RNaseP. O limite de detecção (LOD) foi estimado em cópias por reação. (B) Regressão linear Probit para estimativa do limite de detecção (LOD) com 95% de confiança em 8,10 cópias por reação. A equação gerada ($y = 2,1055x + 4,732$) apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,9346$.

Na **Figura 16**, observa-se a regressão linear obtida na análise Probit para determinação do limite de detecção (LOD) do ensaio para o alvo RNaseP. A equação ajustada, $y = 2,1055x + 4,732$, exibiu um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9346$, indicando uma boa correlação entre os valores experimentais e o modelo teórico. A regressão foi construída a partir da frequência de detecção observada em diferentes concentrações do alvo, convertidas em escala logarítmica. Com base nessa equação, o valor de log da concentração correspondente ao Probit de 6,64485 (nível de 95% de confiança) foi de aproximadamente 0,90, o que define o LOD do ensaio em 8,10 cópias por reação. A precisão e a sensibilidade observadas confirmam que o RNaseP mantém estabilidade como controle interno mesmo em concentrações próximas ao limite de detecção.

As análises dos valores de Cts mostrou uma tendência linear esperada com a diluição das amostras. A variabilidade nos pontos 5G (equivalente a 2 cópias/reação) e 5H (equivalente a 1 cópia por reação) foi maior, com desvios padrões aumentados e coeficiente de variação superiores a 3%.

Além disso, observou-se uma maior dispersão nos valores de Ct nas repetições realizadas em equipamentos diferentes, embora a linearidade geral tenha sido preservada.

Com base nesses dados, o limite de detecção (LOD) do ensaio foi estabelecido em 13 cópias por uL de Sangue (equivalente a 8 cópias/reação), correspondente à menor concentração na qual $\geq 95\%$ das replicatas foram detectadas.

4.3. Limite de Quantificação (LOQ)

Para a determinação do Limite de Quantificação (LOQ) dos alvos TREC, KREC e RNaseP, foram utilizadas diluições seriadas de plasmídeos com concentrações entre aproximadamente 146 e 1 cópia por reação. Cada ponto foi testado com número crescente de replicatas nas baixas concentrações, visando avaliar com maior rigor a precisão e a taxa de detecção. O LOQ foi definido como a menor concentração que apresentou coeficiente de variação (CV%) $\leq 20\%$, taxa de positividade $\geq 95\%$ e recuperação entre 85% e 115% em relação ao valor esperado.

Para o alvo TREC, observamos na **Tabela 11** o ponto de 9,18 cópias/reação (15 cópias/ μL de sangue) apresentou CV de 0,70%, média de Ct 36,54, e 97,5% de positividade (39/40), com recuperação dentro do intervalo aceitável. Concentrações inferiores, como 4,59 cópias/reação, apresentaram queda acentuada na taxa de detecção (65%) e aumento do CV para 3,67%, inviabilizando a quantificação confiável.

Tabela 11: Definição de LOQ para o alvo TREC – FAM

Concentração (cópias/reação)	Concentração (cópias/ μL de Sangue)	Nº de réplicas	Nº de negativos	Nº de positivos	Taxa de Positividade (%)	MÉDIA Ct	Desvio Padrão Ct	CV (%) Ct
146,82	239	3	0	3	100	33,62	0,15	0,46
73,41	120	3	0	3	100	34,35	0,28	0,82
36,71	60	3	0	3	100	35,39	0,26	0,74
18,35	30	23	0	23	100	35,57	0,24	0,68
9,18	15	40	1	39	97,50	36,54	0,26	0,70
4,59	7	40	14	26	65,00	38,47	1,41	3,67
2,29	4	35	23	12	34,29	40,27	1,57	3,89
1,15	2	27	22	5	18,52	41,86	2,16	5,16

Para o alvo KREC, observamos na **Tabela 12** o ponto de 9,14 cópias/reação (15 cópias/ μL) apresentou CV de 1,73%, Ct médio de 37,11, e 97,50% de positividade (38/39), também com recuperação aceitável. A diluição subsequente apresentou queda na taxa de detecção (75%) e aumento do CV para 4,56%, fora dos limites considerados.

Tabela 12: Definição de LOQ para o alvo KREC-HEX

Concentração (cópias/reação)	Concentração (cópias/ μ L de Sangue)	Nº de réplicas	Nº de negativos	Nº de positivos	Taxa de Positividade (%)	MÉDIA Ct	Desvio Padrão Ct	CV (%) Ct
146,24	238	3	0	3	100,00	31,72	0,30	0,95
73,12	119	3	0	3	100,00	32,76	0,20	0,62
36,56	60	3	0	3	100,00	33,56	0,24	0,72
18,28	30	23	0	23	100,00	36,12	0,76	2,11
9,14	15	40	1	39	97,50	37,11	0,64	1,73
4,57	7	40	4	36	90,00	38,66	1,76	4,56
2,29	4	40	11	29	72,50	39,83	2,86	7,17
1,14	2	42	15	27	64,29	40,61	2,59	6,38

O alvo RNaseP referente a **Tabela 13**, que é o controle endógeno do ensaio, demonstrou LOQ em 9,27 cópias/reação (15 cópias/ μ L de sangue), com CV de 1,46%, média de Ct 36,13 e taxa de positividade de 97,5%.

Tabela 13: Definição de LOQ para o alvo RNaseP - Cy5

Concentração (cópias/reação)	Concentração (cópias/ μ L de Sangue)	Nº de réplicas	Nº de negativos	Nº de positivos	Taxa de Positividade (%)	MÉDIA Ct	Desvio Padrão Ct	CV (%) Ct
148,35	242	3	0	3	100,00	33,82	0,14	0,40
74,18	121	3	0	3	100,00	34,50	0,73	2,11
37,09	60	3	0	3	100,00	35,58	0,21	0,59
18,54	30	23	0	23	100,00	35,45	0,71	2,01
9,27	15	40	1	39	97,50	36,13	0,53	1,46
4,64	8	40	7	33	82,50	37,38	0,88	2,35
2,32	4	35	13	22	62,86	38,12	1,67	4,38
1,16	2	25	12	13	52,00	38,01	1,22	3,21

Assim como nos demais alvos, os pontos seguintes apresentaram maior variabilidade e menor sensibilidade. A comparação entre os CV% de cada ponto evidenciou que apenas os pontos em torno de 9 cópias por reação mantiveram precisão abaixo de 2% e taxa de positividade acima de 95%, com recuperação compatível com a esperada. Esses achados sustentam a definição do LOQ comum de 15 cópias/ μ L de sangue para os três alvos testados. Concentrações inferiores resultaram em perdas progressivas de sensibilidade.

4.4. Acurácia

A avaliação da acurácia do ensaio incluiu a análise de comparabilidade qualitativa entre os resultados obtidos no método em validação e os resultados de dois laboratórios: Apoio 1 e Apoio 2, o apoio 1 utiliza um método validado para quantificação de TREC em cópias/ μ L de sangue. Já o Apoio 2, utiliza para a comparação Cópias por 105 células.

Para o apoio 1, foram comparadas 57 amostras com valores quantitativos e interpretações qualitativas fornecidas pelo laboratório de apoio. Todas as 57 amostras apresentaram concordância na interpretação entre os dois métodos sem casos de discrepância para TREC conforme **Tabela 14**.

Tabela 14: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 1 - TREC

		Apoio 1		TOTAL
		Alterado	Normal	
EM TESTE	Alterado	2	0	2
	Normal	0	55	55
	TOTAL	2	55	57

A sensibilidade calculada do teste ficou em 100%, sendo possível detectar resultados alterados que condizerem nos dois métodos, bem como, a especificidade do teste ficou em 100%, onde os verdadeiros negativos também foram avaliados. O VPP (Valor Preditivo Positivo) que é a probabilidade de um resultado positivo ser verdadeiro, foi de 100% e o VPN (Valor Preditivo Negativo) que é probabilidade de um resultado negativo ser verdadeiro, foi de 100%, com isso, a acurácia para o alvo TREC no Apoio 1 foi de 100%. O índice Kappa, obteve o valor calculado de 1.

A análise comparativa para o alvo KREC seguiu o mesmo critério na **Tabela 15** foram incluídas 56 amostras, não foram encontrados entre as amostras testadas resultados alterados para o alvo KREC. Não sendo possível calcular a Sensibilidade do teste nem o valor preditivo positivo. Porém, a Especificidade do teste ficou em 100% vem como o Valor preditivo negativo. A acurácia calculada também foi de 100% e o índice Kappa de 1.

Tabela 15: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 1 – KREC

		Apoio 1		TOTAL
		Alterado	Normal	
EM TESTE	Alterado	0	0	0
	Normal	0	57	57
	TOTAL	0	57	57

Para o laboratório de Apoio 2, foram utilizadas amostras do banco de dados cedidas do laboratório de apoio que possuíam mais de 1 ano armazenadas no acervo. Com isso, 4 amostras (A4, A7, A9 e A10), foram excluídas dos cálculos, pois, a extração não apresentou resultados validos.

A sensibilidade calculada do teste ficou em 100%, para o alvo TREC, sendo possível detectar resultados alterados que condizerem nos dois métodos (15), bem como, a especificidade do teste ficou em 100% onde os verdadeiros negativos também foram

avaliados. A **Tabela 16** apresenta os dados obtidos. O VPP foi de 100% e o VPN foi de 100%, com isso, a acurácia para o alvo TREC no Apoio 1 foi de 100%. Com índice Kappa calculado de 1.

Tabela 16: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 2 – TREC

		Apoio 2		
		Alterado	Normal	TOTAL
EM TESTE	Alterado	15	0	15
	Normal	0	21	21
	TOTAL	15	22	36

A análise comparativa para o alvo KREC seguiu o mesmo critério na foram incluídas 56 sendo possível detectar resultados alterados que condizerem nos dois métodos (10), bem como, a especificidade do teste ficou em 100% onde os verdadeiros negativos também foram avaliados. A **Tabela 17** demonstra os cálculos realizados. O VPP foi de 100% e o VPN foi de 100%, com isso, a acurácia para o alvo TREC no Apoio 1 foi de 100%. Com índice Kappa calculado de 1.

Tabela 17: Cálculo de Acurácia Teste x Apoio 2 - KREC

		Apoio 2		
		Alterado	Normal	TOTAL
EM TESTE	Alterado	10	0	10
	Normal	0	26	26
	TOTAL	10	26	36

4.5.Comparação do teste em estudo com o kit comercial realizado no equipamento DT PRIME (DNA Technology) para o alvo TREC e KREC

Realizamos uma comparação qualitativa entre o teste em validação e o método comercial DT PRIME (DNA Technology), que utiliza quantificação normalizada em cópias por 10^5 leucócitos, com os seguintes critérios interpretativos: Normal: acima de 300 cópias/ 10^5 leucócitos Alterado: abaixo de 100 cópias/ 10^5 leucócitos (risco para imunodeficiência primária) conforme bula do produto.

No total, foram comparadas 84 amostras para a análise, porém duas delas foram retiradas dos cálculos realizados pois não apresentaram resultados válidos (A7, A9), totalizando 82 amostras. Vale destacar que o método DT PRIME utiliza três discos de 3 mm para a extração do DNA, enquanto o teste em validação utiliza apenas um disco, o que pode afetar diretamente a quantidade e qualidade do DNA extraído.

A análise comparativa para o alvo TREC incluiu as 82 sendo possível detectar resultados alterados que condizerem nos dois métodos (27), bem como, a especificidade

do teste ficou em 100% onde os verdadeiros negativos também foram avaliados. A **Tabela 18** demonstra os cálculos realizados. O VPP foi de 100% e o VPN foi de 100%, com isso, a acurácia para o alvo TREC no Apoio 1 foi de 100%. Com índice Kappa calculado de 1.

Tabela 18: Cálculo de Acurácia Teste x Kit comercial -TREC

		Kit Comercial DNA Technology		
		Alterado	Normal	TOTAL
EM TESTE	Alterado	27	0	27
	Normal	0	55	55
	TOTAL	27	55	82

Para o alvo KREC, a concordância qualitativa entre os métodos também foi 95%. A **Tabela 19** demonstra os cálculos realizados. O VPP foi de 100% e o VPN foi de 98%, com isso, a acurácia para o alvo KREC no teste comercial 1 foi de 98,78%. Com índice Kappa calculado de 0,96. Evidenciando uma discrepância entre o resultado esperado e o resultado obtido.

Tabela 19: Cálculo de Acurácia Teste x Kit comercial -KREC

		Kit Comercial DNA Technology		
		Alterado	Normal	TOTAL
EM TESTE	Alterado	18	1	18
	Normal	0	63	64
	TOTAL	18	64	82

4.6. Repetibilidade e Reprodutibilidade

A avaliação da repetibilidade do ensaio de qPCR foi realizada com três amostras processadas em diferentes momentos. No Dia 1, as amostras foram extraídas e processadas três vezes em um mesmo experimento. Nos Dias 2 e 3, as mesmas amostras foram extraídas novamente em ensaios distintos, com intervalos de três dias entre cada rodada. Esse desenho experimental visou verificar a consistência dos resultados intraensaio e entre diferentes execuções do protocolo.

As amostras selecionadas incluíram uma com resultado alterado para o marcador TREC, uma com resultado alterado para KREC, e uma terceira com perfil normal para ambos os alvos, além do controle interno RNaseP. Os valores médios de Ct apresentaram baixa variabilidade entre as replicatas, indicando elevada estabilidade analítica. Em todas as reações, os resultados qualitativos mostraram 100% de concordância, tanto nas análises realizadas em um único ensaio quanto entre os ensaios executados em dias distintos.

Para a avaliação da reprodutibilidade, uma amostra normal (98) foi utilizada do ponto de vista quantitativo. Foram realizadas 50 repetições do processo completo, desde a extração da amostra primária em papel filtro até a amplificação por qPCR, incluindo os alvos TREC, KREC e RNaseP. Os valores de Cq obtidos mostraram baixa variação entre as repetições, com coeficientes de variação (CV%) de 2,13% para TREC, 1,84% para KREC, e 1,40% para RNaseP. Os valores mínimos e máximos de Cq para cada alvo foram: TREC: 32,45 a 35,39; KREC: 33,14 a 35,49; e RNaseP: 24,34 a 25,69. Conforme a **Tabela 20**.

Tabela 20: Reprodutibilidade da amostra 98 em 50 extrações independentes

TREC			RNaseP			KREC		
	Cq	Cp/uL Sangue		Cq	Cp/uL Sangue		Cq	Cp/uL Sangue
Média	33,58	191,53	Média	25,03	17702,06	Média	34,24	138,29
Desvio Padrão	0,72	73,96	Desvio Padrão	0,35	4118,20	Desvio Padrão	0,63	52,66
CV (%)	2,13	38,62	CV (%)	1,40	23,26	CV (%)	1,84	38,08
Mínimo	32,45	55,08	Mínimo	24,34	11162,24	Mínimo	33,14	58,35
Máximo	35,39	359,25	Máximo	25,69	27286,20	Máximo	35,49	257,21

Esses resultados demonstram elevada reprodutibilidade do método em todas as etapas, desde a extração até a amplificação.

4.7. Estabilidade das Amostras em Papel Filtro

A análise dos valores de Ct e a quantificação absoluta dos alvos TREC, KREC e RNaseP demonstraram que, de maneira geral, as amostras mantiveram boa reprodutibilidade até 7 dias após a coleta, com a maioria das amostras apresentando estabilidade significativa.

O alvo RNaseP, utilizado como controle interno, mostrou-se consistente até o 13º dia, com amplificações detectadas em todas as réplicas avaliadas e raras variações nos valores de Ct. Isso sugere que a qualidade da extração e a preservação geral da amostra são mantidas por pelo menos duas semanas em condições ambientais controladas.

Em contraste, os alvos TREC e KREC demonstraram maior sensibilidade à degradação nas amostras analisadas. Observou-se um aumento na variabilidade entre replicatas nos dias 7 e 10. Mais especificamente, a partir da terceira replicata (dia 10), houve uma queda na amplificação do TREC em amostras de baixa carga, com algumas delas deixando de amplificar completamente na quinta replicata (dia D13). Essa perda de amplificação é relevante e pode impactar significativamente a interpretação clínica,

especialmente em triagens para imunodeficiências, onde a detecção de baixos níveis desses marcadores é crítica.

Na **Figura 17**, com base nos cálculos realizados, as porcentagens estimadas de estabilidade para os dias analisados foram registradas e indicarão a confiabilidade do método ao longo do tempo. O alvo RNaseP, utilizado como controle interno, mostrou-se consistente até o 13º dia, com amplificações em todas as réplicas avaliadas e poucas variações nos valores de Ct. Isso indica que a qualidade da extração e a preservação geral da amostra são mantidas por pelo menos duas semanas em condições ambientais controladas.

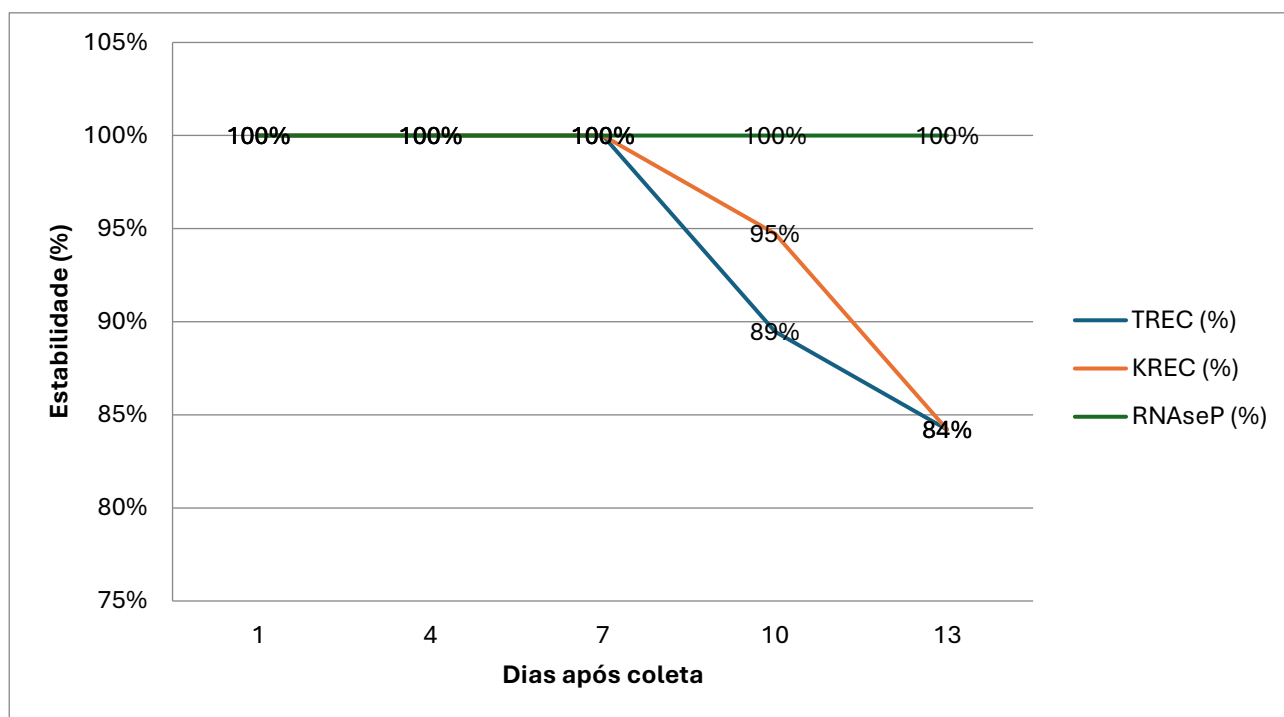


Figura 17: Estabilidade dos Alvos (%) x Dias após Coleta. O gráfico aponta que as amostras não apresentaram discrepâncias dos resultados até o sétimo dia de coletadas, onde, a interpretação dos resultados qualitativamente não sofreu alteração, a partir do décimo dia, temos o decaimento da estabilidade do teste.

Dessa forma, os resultados indicam que o intervalo ideal para análise molecular em amostras DBS é de até 7 dias após a coleta, garantindo confiabilidade diagnóstica. Reações realizadas entre 10 e 13 dias devem ser interpretadas com cautela, especialmente quando os valores estiverem próximos ao limite de detecção. A presença de RNaseP estável pode auxiliar na validação de amostras nessas condições, mas a repetição ou nova coleta pode ser necessária em casos de resultados limítrofes.

5. DISCUSSÃO

A elaboração e a análise das curvas padrão, juntamente com a avaliação da eficiência do ensaio, foram fundamentais para validar tanto a linearidade quanto a eficiência do experimento de qPCR multiplex. Os resultados mostraram que, mesmo diante de diferentes condições experimentais, como variações em equipamentos, operadores e lotes de reagentes, o método manteve um desempenho constante. As curvas padrão demonstraram o comportamento logarítmico esperado, apresentando eficiências entre 98% e 102%, o que evidencia a robustez do protocolo frente a variações operacionais comuns. Bustin et al. 2009, ao estabelecerem as diretrizes do MIQE, indicam que a eficiência da PCR deve ser avaliada por meio de curvas de calibração, ressaltando que a amplificação ideal deve ocorrer entre 90% e 110% para assegurar a robustez da reação.

A capacidade do método de manter um desempenho confiável, apesar de flutuações em equipamentos, operadores e lotes de reagentes, é crucial. O MIQE, destaca a relevância de controlar essas variáveis para garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, a linearidade das curvas, que deve abranger uma ampla faixa de concentrações, é uma característica que deve ser relatada em conformidade com as diretrizes.

Erros pontuais, como os identificados nas reações 29 e 34 e relacionados a pipetagens imprecisas, foram rapidamente detectados por meio de análises gráficas e estatísticas, resultando em sua exclusão da avaliação final. Essa estratégia ressalta a necessidade de um controle de qualidade rigoroso, conforme recomendado pelas diretrizes do MIQE (Bustin et al., 2009).

As variações de desempenho observadas entre os diferentes termocicladores, especialmente o modelo CFX 19, não comprometeram a eficiência nem a linearidade das curvas. Essas pequenas discrepâncias, atribuídas a diferenças no sistema óptico, permanecem dentro dos limites aceitáveis e ilustram a aplicabilidade do ensaio em diferentes plataformas laboratoriais (CLSI, 2012).

A troca do conjunto de primers e sondas, embora tenha modificado os valores absolutos de Ct, não afetou a eficiência do ensaio, que permaneceu dentro dos parâmetros recomendados. Bustin et al. 2009, discute a importância de manter a eficiência do ensaio, que deve ser rigorosamente avaliada, e menciona que a variação de primers pode impactar a reprodutibilidade, porém o método demonstrou robustez em sua

aplicação, permitindo sua utilização contínua em ambientes laboratoriais. O estudo de Marinova et al. 2022, demonstrou que o método TREC/KREC possuía 100% de sensibilidade para a identificação de casos de SCID quando as amostras de DBS foram coletadas ao nascimento. Esta eficácia ressalta que, apesar da mudança de primers, o método pode ainda ser robusto e confiável para a detecção de condições imunológicas críticas em recém-nascidos

A análise dos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) confirmou a alta sensibilidade e reprodutibilidade do método. Os resultados de quantificação mostraram eficácia a partir de 15 cópias/ μ L de sangue, com uma taxa de positividade superior a 95%. Seguindo as recomendações do CLSI (2012) para a verificação das capacidades de detecção, a análise de regressão probit permitiu a determinação do LOD entre 7,86 e 8,10 cópias por reação, que corresponde a 12,82 a 13,21 cópias/ μ L de sangue. Este rigor estatístico é refletido pelo coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95, reiterando a confiabilidade do modelo estatístico empregado no estudo.

A validação de ensaios de triagem neonatal para imunodeficiências primárias é crucial para garantir um diagnóstico e tratamento precoces. Os resultados obtidos demonstram a eficácia do método de triagem por TREC e KREC, mas é essencial considerar a variabilidade nos níveis desses marcadores, uma vez que isso pode impactar significativamente a interpretação dos resultados. Dasouki et al. 2020, ressaltam que diferentes tipos de Imunodeficiências primárias, apresentam perfis distintos de TREC e KREC, onde alguns pacientes com déficit imunológico grave podem apresentar níveis muito baixos. Essa variabilidade pode dificultar a identificação de casos, especialmente em recém-nascidos com condições intermediárias, sugerindo que a abordagem para a triagem neonatal deve levar em conta esses contextos clínicos e imunológicos.

A validação do ensaio que envolve três alvos distintos TREC, KREC e RNaseP aliada ao desempenho coerente entre eles, fortalece a confiabilidade do protocolo utilizado. Haskologlu et al. 2024, destacam que um desempenho robusto nas medições de TREC é crucial para a triagem neonatal de síndromes imunológicas, e esses achados corroboram a eficácia da inclusão de múltiplos alvos, como KREC e RNaseP, para aumentar a precisão diagnóstica. Estudos anteriores, como os realizados por Sottini et al. 2010, também confirmaram a validade da TREC e KREC na triagem neonatal, evidenciando alta sensibilidade (acima de 95%) e especificidade, o que reforça a relevância dos resultados encontrados. De acordo com Dasouki et al. 2020, a utilização de um protocolo de multiplex para análise de TREC e KREC, juntamente com controles

rigorosos, garantiu a confiabilidade dos dados obtidos em uma coorte significativa de pacientes.

A análise dos coeficientes de variação (CV%) em diferentes concentrações revelou que as diluições em torno de 9 cópias por reação apresentaram CV inferior a 2% e uma taxa de positividade superior a 95%. Este resultado é importante, pois exprime a precisão necessária para determinar o limite de quantificação (LOQ). A definição do LOQ de 15 cópias/ μ L de sangue para os três alvos analisados é suportada pelo conceito de que valores de referência consistentes são fundamentais em triagens laboratoriais, conforme discutido por Haskologlu et al. 2024, onde o cut-off de 15 cópias/ μ L foi associado a detecções eficazes de condições imunológicas.

Para avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade, foram realizadas três replicatas biológicas em um mesmo ensaio, além de duas replicatas adicionais executadas em dias diferentes, com um intervalo de três dias. Os resultados mostraram uma alta consistência tanto intraensaio quanto entre as execuções, com desvios mínimos nos valores de Ct para os três alvos. Haskologlu et al. 2024, enfatizaram a importância da repetibilidade em medições de TREC para garantir resultados confiáveis na triagem neonatal.

A concordância qualitativa dos resultados obtidos através do método em validação com aqueles apresentados por dois laboratórios de apoio foi superior a 95% para TREC e KREC, mesmo com o uso de metodologias distintas. O Laboratório de Apoio 1 expressou a quantificação em cópias/ μ L, enquanto o Laboratório de Apoio 2 utilizou a normalização por 10^5 células. Essa alta taxa de concordância, como indicado por Haskologlu et al. 2024, sugere que diferentes abordagens podem ser comparáveis, reforçando a versatilidade dos métodos de teste.

Quatro amostras do Laboratório de Apoio 2, armazenadas por mais de um ano, foram descartadas devido à falta de amplificação válida. Os estudos anteriores, sugerem que o armazenamento prolongado pode comprometer a integridade do DNA em amostras de sangue seco, conforme relatado por Adam et al. 2015 e corroborado por George et al. 2016, que destacam a importância da qualidade do papel filtro com sangue seco para evitar resultados falso-negativos. George et al. 2016, enfatizam que a qualidade das amostras é fundamental, uma vez que amostras mal manipuladas ou de baixa qualidade podem impactar significativamente os resultados das triagens, aumentando o risco de diagnósticos errôneos. Além disso, o estudo de Dasouki et al. 2020, observa que amostras armazenadas por longos períodos podem afetar a precisão das medições, uma

preocupação que se alinha com nossas observações sobre a deterioração do DNA em amostras durante o armazenamento prolongado.

A comparação com o kit comercial da DNA Technology revelou uma concordância qualitativa de 100% para o alvo TREC, indicando que ambos os métodos são eficazes para a detecção desta métrica essencial na triagem neonatal para síndromes imunológicas. No entanto, a discrepância observada para o KREC (98,5%) pode ser atribuída à diferença na quantidade de amostra primária utilizada em cada metodologia. Haskologlu et al. 2024, esclarecem que as variações nas amostras podem ser influenciadas por diversos fatores, como volume de sangue coletado e as condições de armazenamento, que podem impactar a integridade do DNA e a recuperação do alvo durante a extração.

De fato, enquanto o método comercial utiliza três discos de 3,2 mm para a extração, o teste em validação se baseia apenas em um disco, o que levanta preocupações sobre a quantidade de amostra disponível e seu impacto na variabilidade dos resultados, especialmente para alvos críticos como o TREC e KREC. Embora a metodologia de validação tenha demonstrado consistência em termos de resultados, a limitação da área de amostra pode ser uma variável determinante na precisão e confiabilidade das medições. Essa questão é corroborada por Sottini et al. (2010) e Comeau et al. (2010), que apontam como a coleta, transporte e processamento inadequado de amostras de sangue seco podem afetar a quantidade de DNA recuperado, resultando em dados imprecisos. Dessa forma, é essencial considerar que, para obter resultados confiáveis, a escolha da metodologia e a otimização do volume de amostra devem ser cuidadosamente avaliadas.

A normalização dos resultados utilizando unidades diferentes, como cópias por μL de sangue versus 10^5 leucócitos, pode complicar comparações quantitativas diretas. Contudo, como enfatizado por Haskologlu et al. 2024, essa discrepância nas unidades pode ser mitigada mediante padronização adequada nas técnicas laboratoriais, assegurando que, apesar das variações, a análise qualitativa permaneça robusta. A importância da padronização é crítica para a interpretação de dados na triagem neonatal, pois com uma abordagem bem definida, a análise qualitativa dos resultados pode ser confiável, independentemente das variações nas metodologias de extração utilizadas.

Além disso, a pesquisa de Marinova et al. 2022, indicou que os níveis de TREC mostraram correlações significativas com a contagem de células T CD4⁺ e com a totalidade de células T, o que sugere que a interpretação dos resultados deve levar em

consideração características demográficas e clínicas, como idade gestacional e peso ao nascer. Isso sugere que, enquanto a metodologia pode ser eficiente, a reprodutibilidade dos resultados pode ser impactada por fatores externos, que devem ser monitorados cuidadosamente.

As discrepâncias entre métodos, como discutido, são uma consideração fundamental no contexto da triagem neonatal, uma vez que o impacto sobre a eficácia diagnóstica pode variar conforme as condições de coleta e processamento. A estabilidade do DNA em papel filtro dos alvos foi avaliada por meio de cinco replicatas biológicas por amostra, submetidas a extrações e análises em diferentes dias (1, 4, 7, 10 e 13 após a coleta). Os valores de Ct e as quantificações permaneceram estáveis até o sétimo dia, com coeficientes de variação (CV%) inferiores a 20%. No décimo dia, observou-se um aumento na variabilidade, especialmente para TREC e KREC em amostras com baixa carga.

A utilização do RNaseP como controle endógeno na quantificação de TREC e KREC representou uma abordagem pertinente no estudo de Haskologlu et al. 2024. A amplificação consistente do RNaseP até o 13º dia e sua baixa variabilidade entre as reações, como relatado, reflete não apenas a abundância relativa do gene, mas também sua estabilidade frente à degradação. A estabilidade é crucial, pois assegura que os resultados obtidos sejam confiáveis e reprodutíveis, permitindo comparações eficazes entre diferentes amostras e condições, um aspecto reforçado por George et al. 2016.

Apesar disso, a vulnerabilidade de marcadores como TREC e KREC à degradação ao longo do tempo, conforme corroborado por Comeau et al. 2010, ressalta uma limitação significativa nos testes moleculares. A recomendação de realizar os testes preferencialmente até o sétimo dia após a coleta é um aspecto crucial que deve ser rigorosamente seguido. Essa consideração é especialmente relevante em triagens neonatais, onde a precisão é fundamental para o diagnóstico precoce e intervenções oportunas em casos de condições como SCID e XLA. Os achados de Haskologlu et al. 2024, também refletem essa urgência, pois a detecção precoce de TREC em neonatos pode resultar em tratamento imediato, incluindo opções curativas como a terapia genética, conforme discutido em seu estudo.

É importante enfatizar as limitações do qPCR como um teste de triagem, sem valor diagnóstico isolado. Embora seu elevado valor preditivo negativo e sensibilidade, conforme discutido por Kwan et al. 2014 e Puck 2015, justifiquem seu uso na identificação precoce de distúrbios na maturação linfocitária, a interpretação dos resultados deve

sempre ser contextualizada dentro de uma avaliação clínica mais abrangente. Haskologlu et al. 2024, também advertem sobre a necessidade de um seguimento diagnóstico confirmatório em casos com resultados anormais.

A contribuição dos biomarcadores TREC e KREC para a detecção de imunodeficiências congênitas graves, como SCID e XLA, é amplamente difundida. A expansão do uso clínico deste teste de triagem precisa de esforços direcionados para tornar os métodos mais acessíveis, através da redução de custos e simplificação dos protocolos de extração, como sugerido por Kwan & Puck 2015 e Kanegae et al. 2016. Essas iniciativas são cruciais para aumentar a aceitação e a implementação dos testes em diferentes sistemas de saúde, garantindo que mais neonatos possam ser beneficiados com diagnósticos precoces e intervenções eficazes. Uma das propostas é ampliar seu uso para monitorar distúrbios imunológicos secundários, como infecções por HIV, o que é citado também por Haskologlu et al. 2024 sobre a versatilidade dos testes de triagem.

6. CONCLUSÃO

O diagnóstico precoce de imunodeficiências primárias, especialmente aquelas que afetam a maturação linfocitária, como a Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) e a Agamaglobulinemia Ligada ao X (XLA), é fundamental para o manejo clínico adequado e o aumento da sobrevivência de recém-nascidos e outros pacientes imunocomprometidos. A padronização de um ensaio de qPCR para quantificação de TREC e KREC, com sensibilidade suficiente para detectar baixos níveis desses marcadores em sangue seco em papel filtro, representa um avanço relevante na triagem neonatal e no monitoramento imunológico.

A estratégia proposta neste estudo contribui para tornar o processo diagnóstico mais acessível, ao empregar reagentes e protocolos compatíveis com a realidade de laboratórios de diagnóstico e apoio, sem comprometer a confiabilidade analítica. Os resultados obtidos sugerem que a metodologia validada é adequada para aplicação em larga escala, com potencial para internalização em rotinas laboratoriais públicas e privadas, com impacto positivo sobre o custo-benefício do processo diagnóstico.

Embora os participantes não obtenham benefícios diretos, sua participação permitiu o desenvolvimento e refinamento de uma metodologia promissora, com aplicação futura no diagnóstico precoce e na vigilância de imunodeficiências.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como continuidade a este estudo, propõe-se a ampliação do número de amostras avaliadas, incluindo recém-nascidos e crianças de diferentes faixas etárias da primeira infância. Essa abordagem permitirá a construção de valores de referência mais robustos e específicos por idade, fundamentais para uma interpretação clínica mais precisa dos níveis de TREC e KREC. Além disso, a aplicação da metodologia validada em grupos de pacientes com imunodeficiências secundárias, como indivíduos vivendo com HIV, poderá contribuir para a monitorização imunológica e avaliação da reconstituição linfocitária em diferentes contextos clínicos.

Espera-se também que novos estudos explorem a integração desse protocolo a painéis moleculares ampliados, incluindo outros marcadores de imunidade, para promover uma abordagem diagnóstica mais abrangente e sensível, alinhada às necessidades de triagem neonatal ampliada e vigilância imunológica populacional.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbas, A K. **Imunologia Celular e Molecular**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. 1 recurso online. ISBN 9788595158924.

Adam, B. W. et al. The stability of dried blood spots for molecular testing. **Clinical Biochemistry**, v. 48, pag. 1217 - 1222, 2015. doi: [10.1074/mcp.RA117.000015](https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000015)

Aggarwal, V., Banday, A. Z., Jindal, A. K., Das, J., Rawat, A. Novel Primary Immunodeficiency Disorders: A Decade of Progress. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 717-726, 2021. doi: [10.3389/fimmu.2020.625753](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.625753)

BRAGID, **Grupo Brasileiro de Imunodeficiências**; Site: www.bragid.org.br Acesso em: 09/04/2025.

BIO-RAD. qPCR Assay Optimization and Validation Guide. **Bio-Rad Laboratories**, 2021.

Bustin, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009. Doi: [10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797)

Baker M.W. Et Al. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, New York. Vol.: 24. n.3, p. 522-527. 03/2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.04.007>

Barreiros, L.A. **Investigação genético-molecular de pacientes com imunodeficiência combinada grave**. 2018. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: doi:10.11606/D.42.2019.tde-26042019-133029

Borte, S., vD, U., F, A., W, N., J, M., W, J., Sack, U., PH, Q., B, M., & H, L. (2012). Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. **Blood**, 119(11), 2552–2555. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371021>

Bousfiha, A., J, L., & P, C. (2021). Epidemiological, molecular, and clinical features of primary immunodeficiencies in 2021. **Journal of Clinical Immunology**, 41(6), 1077-1098. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-00995-6>

Bousfiha, A. et al. Primary immunodeficiency diseases: An update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 54, 2013. Doi: [10.3389/fimmu.2014.00162](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00162)

Bousfiha, A., J, L., & P, C. (2023). The 2022 Update of the IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. **Journal of Clinical Immunology**. 42(7):1508-1520. 10/ 2022.doi: [10.1007/s10875-022-01352-z](https://doi.org/10.1007/s10875-022-01352-z)

Bousfiha, A., et al. (2018). A comprehensive update on the classification of primary immunodeficiencies. **Journal of Clinical Immunology**, 38(5), 625-644. <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0547-x>

CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP17-A2, 2012.

Condino-Neto, A.; T.V; A.L; N.S; J,T,C. Imunodeficiências primárias: da clínica à genética. **Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar de São João**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2015.

Chiarini, M., Z, C., S, F., S, A., B, D., C, L., & I, L. (2013). T-cell Receptor and K-deleting Recombination Excision Circles in Newborn Screening of T- and B-cell Defects: Review of the Literature and Future Challenges. *Journal of public health research*, 2(1), 9–16. <https://doi.org/10.4081/jphr.2013.e3>

Conley, M. E., N, L. D., & E, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. **Clinical Immunology**, 135(2), 176–184. 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.08.010>

Cirillo, E., G, G., G, V., D'A, R., G, F., R, R., ... & P, C. Severe combined immunodeficiency - recent advances in molecular biology, diagnosis, and treatment. *Journal of the World Allergy Organization*, 8(1), 26. 2015 DOI: <https://10.1186/s40413-015-0078-1>

Comeau, A. M., Hale, J. E., Pai, S. Y., Bonilla, F. A., N, L. D., P, M. S., M, H. C., Cooper, E. R., DM, A., S, I., & Eaton, R. B. (2010). Guidelines for implementation of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(Suppl 2), S273–S281. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9103-9>

Dasouki M, J A, AD G, E F, A AM, AS B, A R, A H, A I, AMH, H A. TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. **Clin Exp Immunol**. 2020 Oct;202(1):60-71. doi: 10.1111/cei.13484. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32691468; PMCID: PMC7488118

Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., & Koup, R. A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396(6712), 690–695. <https://doi.org/10.1038/25374>

Duan L, Mukherjee E. Janeway's Immunobiology, Ninth Edition. **Yale Journal of Biology and Medicine**. 2016 Sep 30;89(3):424–5. PMCID: PMC5045153

Notarangelo L. D. (2010). Primary immunodeficiencies. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S182–S194. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.053>

George,R. S, J M, Effect of Dried Blood Spot Quality on Newborn Screening Analyte Concentrations and Recommendations for Minimum Acceptance Criteria for Sample Analysis, **Clinical Chemistry**, Volume 62, Issue 3, 1 March 2016, Pages 466–475, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.247668>

Gaspar, H. B., Aiuti, A., Porta, F., Candotti, F., Hershfield, M. S., & Notarangelo, L. D. (2009). How I treat ADA deficiency. *Blood*, 114(17), 3524–3532. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-189209>

Giblett, E. R., A, J. E., C, F., P, B., & M, H. J. (1972). Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. **The Lancet**, 300(7786), 1067-1069. DOI: 10.1016/S0140-6736(72)91600-7

Haskologlu, S., K, S., T, L. S., Aksoy, F. E., B, D., O, D. A., I, C., B, K., E, S., A, D., C, S., G, S. N., K, S., C, D., R, I., T, B., D, F., T, I., & I, A. (2024). Newborn screening for SCID: the very first prospective pilot study from Türkiye. *Frontiers in immunology*, 15, 1384195. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384195>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. **Genome research**, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Jyonouchi, S. J, A.M. P, J. S, K.E. Immunodeficiencies Associated with Abnormal Newborn Screening for T Cell and B Cell Lymphopenia. **Journal of Clinical Immunology**. Nova York, v.37, p.363-74. 03/2017.. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0388-4>

Kanegae, M.P. B, L.A., M, J.T. H, S.M. G, L.M. A,A.L. G.R. H, S.M. DG, R.S.W. G, A.L. S, A.M.N. B, N. CC, B.T. CN, A. (2016). Neonatal screening for severe combined immunodeficiency in Brazil. *Jornal de pediatria*, 92(4), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2015.10.006>

Kanegae, M. P. P. Et al. Triagem neonatal de imunodeficiências graves combinadas por meio de trecs e krecs: segundo estudo piloto no brasil. *Revista Paulista de Pediatria*. São Paulo, 2017, vol.35, n.1, pp.25-32.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1984-0462>

Kwan A, A RS, C R, et al. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States. **JAMA**. 2014;312(7):729–738. <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1896983>

Kwan, A., & Puck, J. M. (2015). History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Seminars in Perinatology*, 39(3), 194–205. DOI: 10.1053/j.semperi.2015.03.004

Kwan, A., et al. (2014). Newborn screening for severe combined immunodeficiency in the United States: experience of the first 6 years. *The Journal of Pediatrics*, 164(5), 1088-1094. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.12.050>

Lynch, H. E., & S, G. D. (2013). Molecular measurement of T cell receptor excision circles. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 979, 147–159. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_12

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Mazhar M, Waseem M. Agamaglobulinemia. [Atualizado em 3 de julho de 2023]. Em: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publicado em 01/2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555941>

Medova, V., H, I., L, N., et al.,. (2022). The importance of defining the age-specific TREC/KREC levels for detection of various inborn errors of immunity in pediatric and adult patients. **Clinical immunology** (Orlando, Fla.), 245, 109155.

Mazzucchelli, J.T. B, C. C, G.G. Condino-Neto, A.A. C, et al. (2014) Severe combined immunodeficiency in Brazil: management, prognosis, and BCG-associated complications. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, 24(3), 184–191

Meehana, C.A. Bo B.C; D, J; C, B. T; Condino-Neto, A; W. In Time: Importância e implicações globais da triagem neonatal para a imunodeficiência grave combinada. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo v. 36.p. 388-400.. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2018;36;4;00020>

Ochs, H. D., & Hitzig, W. H. (2012). History of primary immunodeficiency diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 12(6), 577–587. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835923a6>

Prince, B., K. L., P. M., R. S.,(2020) Incidence of Primary Immunodeficiency Disorders at a Tertiary Care Immunology Clinic *Jornal allergy clinical immunology*. V.145 n2 p.31

Picard, C., BG, H., et.al., (2018). International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. **Journal of clinical immunology**, 38(1), 96–128. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0464-9>

Puck J. M. (2007). Severe combined immunodeficiency: new advances in diagnosis and treatment. *Immunologic research*, 38(1-3), 64–67. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0029-8>

Puck J. M.. (2007). SCID Newborn Screening: What Else Should We Know? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 120(4), 760–768. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.08.041

Puck, J. M. (2022). Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. **Immunological Reviews**, 310(1), 31-39

Puck, J. M. (2023). "Neonatal Screening for Severe Combined Immunodeficiency: History and New Frontiers". **Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice**.

Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., & Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of clinical laboratory analysis*, 23(3), 145–151. <https://doi.org/10.1002/jcla.20307>

Slatter MA, Gennery AR. Advances in the treatment of severe combined immunodeficiency. **Clinical immunology**. 2022 Sep;242:109084. doi: 10.1016/j.clim.2022.109084 . Epub 2022 Aug 5. PMID: 35940359.

Puck J.M. Development of Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Vol.:115 n.2. p. 391-398. 03/2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.012>

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Triagem Neonatal: ampliação e desafios no Brasil.** Documento Científico. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/OS19657C_DocCient_TriagemNeonatal.pdf. Acesso em: 18 outubro de 2024.

Santos, M.N. Febre reumática: quantificação de fragmentos circulares excisados pelo rearranjo do receptor da célula T em linfócitos T de sangue periférico. Orientador: Guglielmi, Luiza Guilherme. 2014. Folhas; 63. **Dissertação (Mestrado) – Medicina, Alergia e Imunopatologia, USP, São Paulo,**
2013.<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-17012014-114913/pt-br.php>

Sottini, A., Ghidini, C., Zanotti, C., Chiarini, M., Caimi, L., Lanfranchi, A., Moratto, D., Porta, F., & Imberti, L. (2010). Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 136(2), 217–227.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.04.005>

Touzot, F., Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., & Cavazzana, M. (2014). Gene therapy for inherited immunodeficiency. **Expert opinion on biological therapy**, 14(6), 789–798.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2014.895811>