

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas**

Fabiana Kalina Marques

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE  
NOVA GERAÇÃO PARA PESQUISA DE VARIANTES  
GENÉTICAS EM NEOPLASIAS MIELOIDES E RELAÇÃO  
COM O PROGNÓSTICO DA DOENÇA**

**Belo Horizonte**

**2023**

Fabiana Kalina Marques

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE  
NOVA GERAÇÃO PARA PESQUISA DE VARIANTES  
GENÉTICAS EM NEOPLASIAS MIELOIDES E RELAÇÃO  
COM O PROGNÓSTICO DA DOENÇA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

**Belo Horizonte**

**2023**

## Ficha catalográfica

M357v Marques, Fabiana Kalina.  
Validação e aplicação do sequenciamento de nova geração para pesquisa de variantes genéticas em neoplasias mieloides e relação com o prognóstico da doença [recurso eletrônico] / Fabiana Kalina Marques. – 2023.  
1 recurso eletrônico (141 f. : il.) : pdf

Orientador: Adriano de Paula Sabino.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Câncer – Teses. 2. DNA – Teses. 3. Variação – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.994

## Folha de aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

"VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PARA PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS EM NEOPLASIAS MIELOIDES E RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO DA DOENÇA"

FABIANA KALINA MARQUES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **três de março de dois mil e vinte e três**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**Luci Maria Sant'Anna Dusse**  
UFMG

**Karina Braga Gomes Borges**  
UFMG

**Renan Pedra de Souza**  
UFMG

**Ana Paula Lucas Mota**  
UFMG

**Adriano de Paula Sabino - Orientador**  
UFMG

Belo Horizonte, 03 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Renan Pedra de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 14:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2023, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 08/11/2023, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGACT 2092880 SEI 23072.208994/2023-67 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Luci Maria Sant Ana Dusse, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 19/11/2023, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 20/11/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2092880 e o código CRC 73021574.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha força em todos os momentos, e me conceder a sabedoria necessária para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, pelo exemplo, apoio e compreensão. Obrigada pela estrutura familiar que norteia minha vida, minhas escolhas e conquistas.

Ao professor Adriano Sabino, pela oportunidade e confiança. Obrigada pela orientação deste trabalho e importante contribuição para minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo apoio e oportunidade.

Ao Grupo Pardini, pela oportunidade e apoio, em especial à Danielle Zauli e ao Alessandro Ferreira. Obrigada pela confiança e incentivo constante.

Aos amigos do setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Pardini pelos ensinamentos, apoio e torcida.

Às minhas amigas, pela torcida, orações e compreensão. Agradeço em especial a minha querida amiga Feliciano Marinho pela parceria e importante colaboração.

Ao Dr. Sérgio Schusterschitz Araújo pela colaboração, disponibilidade e confiança.

Ao professor Enrico Colosimo, e seus alunos Mateus Alves e Lauren Cota pela contribuição nas análises estatísticas.

Aos funcionários do SAME-HC, em especial à Telma Santos, pela atenção e disponibilidade.

Aos pacientes e seus familiares, pela confiança.

## RESUMO

As neoplasias mieloides compreendem subtipos distintos de neoplasia hematológica, com características clínicas, genéticas e prognósticos diferentes. O conhecimento das bases genéticas das neoplasias mieloides tem aumentado rapidamente, sobretudo após o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração. Estudos demonstram que semelhanças genéticas entre doenças morfológicamente tão distintas estão associadas à presença de variantes recorrentes afetando vias celulares agrupadas em categorias funcionais. Desta forma, foi avaliado o desempenho analítico do painel OncoPrint<sup>TM</sup> Myeloid, que permite a pesquisa de variantes em 40 genes alvos, fusões gênicas envolvendo 29 genes *drivers* e análise de expressão relativa de cinco genes, por sequenciamento de nova geração. Dentre as 34 amostras clínicas sequenciadas, em 29 (85,2%) foi detectada pelo menos uma variante. Foram detectadas um total de 63 variantes: 33 variantes de nucleotídeo único, 24 indels e seis fusões gênicas. Os genes mais frequentemente mutados em nossa coorte foram *TET2*, *IDH2*, *FLT3* e *ASXL1*. Foi observada diferença na expressão gênica para os genes *BAALC* e *WT1* quando comparados os grupos de leucemia mieloide aguda, neoplasia mielodisplásica e neoplasia mieloproliferativa. Foi observada diferença na relação plaqueta-linfócitos quando comparados os três grupos. Foi observada diferença na sobrevida quanto à presença de variantes nos genes *FLT3* e *TP53*, e quanto ao número de variantes detectadas por amostra. O painel OncoPrint<sup>TM</sup> Myeloid demonstrou alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na detecção de variantes relevantes para a investigação das neoplasias mieloides. Este estudo demonstrou a relevância da avaliação do perfil molecular nas neoplasias mieloides por painéis de NGS para o diagnóstico e estratificação de risco destas doenças, sobretudo na leucemia mieloide aguda e neoplasia mielodisplásica. Estudos adicionais são necessários para melhor avaliar a relevância das análises de expressão dos genes avaliados, assim como das relações plaqueta-linfócito, neutrófilo-linfócito e monócito-linfócito para o diagnóstico e prognóstico das neoplasias mieloides.

Palavras-chave: neoplasias mieloides; sequenciamento de nova geração; variantes.

## ABSTRACT

Myeloid neoplasms comprise biologically distinct subtypes of hematologic malignancy, with different clinical, genetic, and design features. Knowledge of the genetic basis of NMs has increased rapidly, especially after the development of next-generation sequencing. Studies demonstrate that genetic similarities between morphologically distinct diseases are associated with the presence of recurrent variants affecting cellular pathways grouped into functional categories. In this way, the analytical performance of the OncoPrint™ Myeloid panel was evaluated, which allows the search for variants in 40 target genes, gene fusions involving 29 driver genes, and analysis of the relative expression of five genes, by next-generation sequencing. Among the 34 sequenced clinical samples, 29 (85.2%) identified at least one variant. A total of 63 variants were detected: 33 single nucleotide variants, 24 indels and six gene fusions. Our cohort's most frequently mutated genes were *TET2*, *IDH2*, *FLT3*, and *ASXL1*. There was a difference in gene expression for the *BAALC* and *WT1* genes when compared to the acute myeloid leukemia, myelodysplastic neoplasm, and myeloproliferative neoplasm groups. A difference was observed in the platelet-lymphocyte ratio when comparing the three groups. A difference in survival was observed in the cohort regarding variants in the *FLT3* and *TP53* genes and the number of variants detected per sample. The OncoPrint™ Myeloid panel demonstrated high sensitivity, specificity, and reproducibility in the detection of variants relevant to the investigation of myeloid neoplasms. This study demonstrated the relevance of molecular profiling in myeloid neoplasms by next-generation sequencing panels for the diagnosis and risk stratification of these diseases, especially in acute myeloid leukemia and myelodysplastic neoplasm. Additional studies in larger samples are needed to better evaluate the contribution of gene expression analyses and the platelet-lymphocyte, neutrophil-lymphocyte, and monocyte-lymphocyte ratios for the diagnosis and prognosis of myeloid neoplasms.

Keywords: myeloid neoplasms; next-generation sequencing; variants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mutação em JAK2 e ativação das vias de sinalização.....	26
Figura 2. Escore prognóstico IPSS-R e a estratificação de risco na SMD.....	41
Figura 3. Achados displásicos na SMD/NMP.....	45
Figura 4. Genes comumente mutados e vias celulares afetadas nas NMs.....	46
Figura 5. Metilação do DNA e desregulação do genoma.....	49
Figura 6. Receptor FLT3.....	50
Figura 7. Fluxo de trabalho do painel Oncomine™ Myeloid Assay.....	60
Figura 8. Esquema de combinação das amostras amplificadas.....	61
Figura 9. Visão geral do fluxo de análise de bioinformática para NGS.....	64
Quadro 1. Parâmetros de qualidade de corrida para o painel Oncomine Myeloid™ .....	65
Quadro 2. Parâmetros para chamada de variantes do painel Oncomine Myeloid™ .....	66



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação revisada da OMS para leucemias mieloides agudas.....	19
Tabela 2. Estratificação de risco genético para LMA European LeukemiaNET 2022.....	20
Tabela 3. Critérios diagnósticos da PV de acordo com a classificação da OMS.....	27
Tabela 4. Critérios diagnósticos para TE de acordo com a classificação da OMS.....	31
Tabela 5. Modelo IPSET revisado para estratificação de risco na TE.....	31
Tabela 6. Critérios da OMS para diagnóstico da MFP pré-fibrótica .....	34
Tabela 7. Critérios diagnóstico da OMS para MFP fibrótica.....	35
Tabela 8. Critérios da OMS para classificação da SMD.....	39
Tabela 9. Alterações citogenéticas recorrentes e prognosticamente relevantes na SMD.....	40
Tabela 10. Variantes do controle Seraseq™ Myeloid Mutation DNA Mix.....	56
Tabela 11. Variantes do controle Seraseq™ Myeloid Fusion RNA Mix.....	57
Tabela 12. Lista de genes alvo do painel Oncomine Myeloid™.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*ABL1 – ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*

Ala – alanina

*ALK – ALK receptor tyrosine kinase*

*AKT – AKT serine/threonine kinase 1*

Arg – arginina

Asn – asparagina

Asp – ácido aspártico

*ASXL1 – ASXL transcriptional regulator 1*

*BAALC – BAALC binder of MAP3K1 and KLF4*

*BCL2 – BCL2 apoptosis regulator*

*BCOR – BCL6 corepressor*

*BRAF – B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

CALR – calreticulina

*CBL – Cbl proto-oncogene*

*CCND1 – cyclin D1*

CCUS – citopenia clonal de significado indeterminado

*CEBPA – CCAAT enhancer binding protein alpha*

CHIP – hematopoiese clonal de potencial indeterminado

*CREBBP – CREB binding protein*

*CSF3R – colony stimulating factor 3 receptor*

Ct – cycle threshold

Cys – cisteína

cDNA – DNA complementar

DIPSS-Plus – *Dynamic International Prognostic Scoring System-Plus*

DNA – ácido ribonucleico

*DNMT3A – DNA methyltransferase 3 alpha*

*EGFR – epidermal growth factor receptor*

*EIF2B1 – eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha*

ELN – *European Leukemia Net*

EPO – eritropoetina

*ETV6 – ETS variant transcription factor 6*

*EZH2 – enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*

*FBXW2 – F-box and WD repeat domain-containing 2*

*FGFR1 – fibroblast growth factor receptor 1*

*FGFR2 – fibroblast growth factor receptor 2*

FISH – hibridização *in situ* fluorescente

*FLT3 – fms related receptor tyrosine kinase 3*

*FUS – FUS RNA binding protein*

*GATA2 – GATA binding protein 2*

GCSF – fator estimulador de colônia granulocítica

Gln – flutamina

Glu – ácido glutâmico

His – histidina

*HMGA2 – high mobility group AT-hook 2*

*HRAS – HRas proto-oncogene, GTPase*

ICUS – citopenia idiopática de significado indeterminado

*IDH1 – isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 1*

*IDH2 – isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 2*

IDUS – displasia idiopática de significado indeterminado

*IKZF1 – IKAROS family zinc finger 1*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPSS – *International Prognostic Scoring System*

IPSS-M – *International Prognostic Scoring System Molecular*

IPSS-R – *International Prognostic Scoring System Revised*

ITD – duplicação interna em tandem

*JAK2 – Janus kinase 2*

*KIT – KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*

*KMT2A – lysine methyltransferase 2A*

*KRAS – KRAS proto-oncogene, GTPase*

LMA – leucemia mieloide aguda

LMC – leucemia mieloide crônica

Leu – leucina

Lys – lisina

*MAPK/ERK – mitogen-activated protein kinase 1*

*MECOM – MDS1 and EVII complex locus*

*MET – MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*

MIPSS – *Mutation International Prognostic Scoring System*

MFP – mielofibrose primária

*MLLT3 – MLLT3 super elongation complex subunit*

*MLLT10 – MLLT10 histone lysine methyltransferase DOTIL cofactor*

MO – medula óssea

*MPL – MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor*

MPO – mieloperoxidase

*MYBL1 – MYB proto-oncogene like 1*

*MYC – MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*

*MYD88 – MYD88 innate immune signal transduction adaptor*

*MYH11 – myosin heavy chain 11*

*NF1 – neurofibromin 1*

*NGS – Next Generation Sequencing*

*NM – neoplasia mieloide*

*NMP – neoplasia mieloproliferativa*

*NPM1 – nucleophosmin 1*

*NRAS – NRAS proto-oncogene, GTPase*

*NTC – No Template Control*

*NTRK3 – neurotrophic receptor tyrosine kinase 3*

*NUP214 – nucleoporin 214*

*OMA – Oncomine Myeloid Assay*

*OMS – Organização Mundial de Saúde*

*pb – pares de bases*

*PCR – reação em cadeia da polimerase*

*PDGFRA – platelet derived growth factor receptor alpha*

*PDGFRB – platelet derived growth factor receptor beta*

*Phe - fenilalanina*

*PHF6 – PHD finger protein 6*

*pM – picomolar*

*Pro – prolina*

*PRPF8 – pre-mRNA processing factor 8*

*PSMB2 – proteasome 20S subunit beta 2*

*PTPN11 – protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*

*PUM1 – pumilio RNA binding family member 1*

PV – policitemia vera

qRT-PCR – transcrição reversa seguida de reação de PCR em tempo real quantitativa

*RARA – retinoic acid receptor alpha*

*RB1 – RB transcriptional corepressor 1*

*RBM15 – RNA binding motif protein 15*

RML – relação monócito-linfócito

RNA – ácido ribonucleico

RNL – relação neutrófilo-linfócito

RPL – relação plaqueta-linfócito

*RUNX1 – RUNX family transcription factor 1*

SA – sideroblasto em anel

Ser – serina

*SETBP1 – SET binding protein 1*

*SF3B1 – splicing factor 3b subunit 1*

*SH2B3 – SH2B adaptor protein 3*

*SMC1A – structural maintenance of chromosomes 1A*

SMD – neoplasia mielodisplásica

SMD/NMP – neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa

SNC – sistema nervoso central

SNV – *single nucleotide variant*

SP – sangue periférico

*SRSF2 – serine and arginine rich splicing factor 2*

*STAG2 – stromal antigen 2*

*TCF3 – transcription factor 3*

TCTH – transplante de células-tronco hematopoiéticas

TE – trombocitemia essencial

*TET2 – tet methylcytosine dioxygenase 2*

*TFE3 – transcription factor binding to IGHM enhancer 3*

Thr – treonina

TMO – transplante de medula óssea

*TP53 – tumor protein p53*

TPO – trombopoetina

*TRIM27 – tripartite motif containing 27*

*U2AF1 – U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*

WHO – *World Health Organization*

WPSS – *WHO Adapted Prognostic Scoring System*

*WT1 – WT1 transcription factor*

VAF – frequência do alelo variante

Val – valina

*ZRSR2 – zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	Leucemia Mieloide Aguda.....	17
2.2	Neoplasias Mieloproliferativas.....	21
2.2.1	Leucemia Mieloide Crônica.....	22
2.2.2	Policitemia Vera.....	24
2.2.3	Trombocitemia Essencial.....	28
2.2.4	Mielofibrose Primária.....	32
2.3	Neoplasia Mielodisplásica.....	37
2.4	Neoplasia Mielodisplásica/mieloproliferativa.....	44
2.5	Vias celulares afetadas nas neoplasias mieloides.....	46
2.6	Sequenciamento de Nova Geração.....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.1	Objetivo Geral.....	54
3.2	Objetivos Específicos.....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1	Casuística.....	55
4.1.1	Crterios de ilegibilidade.....	55
4.1.2	Fontes de informao.....	55
4.2	Amostras biolgicas.....	55
4.3	Controles comerciais.....	56
4.4	Extrao e quantificao de cidos nucleicos.....	57
4.5	Painel Oncomine <sup>TM</sup> Myeloid Research Assay.....	58
4.6	Sequenciamento de Nova Gerao.....	58
4.6.1	Sntese de cDNA.....	60
4.6.2	Construo de bibliotecas.....	60
4.6.3	Quantificao de bibliotecas por PCR em tempo real.....	62
4.6.4	Combinao de bibliotecas e sequenciamento.....	63
4.6.5	Anlise de bioinformtica.....	63
4.6	Anlises Estatsticas.....	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSO.....</b>	<b>67</b>



**CAPÍTULO I: Estudo de validação do painel Oncomine™ Myeloid para investigação de variantes somáticas nas neoplasias mieloides.....68**

1	Parâmetros de qualidade das corridas.....	68
2	Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia.....	70
3	Repetibilidade e reprodutibilidade.....	72
4	Limite de detecção.....	75
4.1	Limite de detecção para o ensaio de DNA.....	75
4.2	Limite de detecção para o ensaio de RNA.....	76
5	Análise de profundidade de cobertura.....	77
6	Confirmação de variantes.....	80
7	Conclusão.....	81

**CAPÍTULO II: Investigação de variantes somáticas nas neoplasias mieloides utilizando um painel de sequenciamento de nova geração.....82**

1	Pacientes e amostras.....	83
2	Anormalidades genéticas detectadas.....	86
3	Análise de expressão.....	97
4	Análise de sobrevida global.....	101
4.1	Análise de sobrevida de acordo com as variantes genéticas.....	101
4.2	Análise de sobrevida para genes de expressão.....	104
4.3	Análise de sobrevida para as razões RPL, RNL e RML.....	106
5	Conclusão.....	106
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leucemia é um grupo heterogêneo de cânceres hematológicos caracterizados pelo crescimento descontrolado e maligno de leucócitos ou seus precursores, no sangue ou na medula óssea (JULIUSSON; HOUGH, 2016). As leucemias são classificadas de acordo com a linhagem e o grau de diferenciação de suas células precursoras. As células precursoras podem ser de origem linfóide ou mieloide e se apresentar de forma diferenciada, levando às formas crônicas da doença, ou de forma imatura, que caracteriza as formas agudas da doença (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2018).

A desregulação da hematopoiese está associada com o desenvolvimento das neoplasias hematológicas. Evidências mostram que o microambiente da medula óssea, com sua rede dinâmica de diferentes tipos celulares que sustentam a hematopoiese, tem papel fundamental na iniciação, manutenção ou resultado das neoplasias mieloides (GALÁN-DIÉZ *et al.*, 2018). As neoplasias mieloides (NMs) são doenças clonais das células-tronco ou das células progenitoras hematopoiéticas resultantes de alterações genéticas que interferem na autorrenovação, proliferação e diferenciação celular (LINDSEY; EBERT, 2013). Elas compreendem subtipos biologicamente distintos e com características clínicas e prognósticos diferentes, compreendendo a leucemia mieloide aguda, as neoplasias mieloproliferativas, a neoplasia mielodisplásica e a neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa (MURATI *et al.*, 2012).

A biologia molecular tem papel importante na oncohematologia, especialmente nas NMs. Biomarcadores moleculares recentemente identificados trouxeram novas perspectivas quanto ao diagnóstico e prognóstico, fornecendo novos *insights* para a compreensão da patobiologia deste grupo de leucemias (ARBER *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que as alterações clonais nessas doenças estão associadas à presença de mutações somáticas adquiridas em diferentes estágios da hematopoiese (REITHER *et al.*, 2014). O conhecimento das bases genéticas das NMs tem aumentado rapidamente, sobretudo após o desenvolvimento e aplicação do sequenciamento de nova geração (NGS) (MAES *et al.*, 2017). Painéis multigênicos de NGS possibilitam uma visão ampla da heterogeneidade molecular das NMs, o que em longo prazo pode levar à redução nos gastos com internações e mudanças nos protocolos de tratamento. Entretanto, por se tratar de uma técnica de alto custo, este tipo de investigação ainda é inacessível aos pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), e mesmo a maioria dos pacientes atendidos em serviços particulares de saúde do Brasil. Estudos prospectivos, sobretudo no Brasil, ainda são necessários para melhor delineamento da

importância da informação genética para o diagnóstico, prognóstico, terapia personalizada ou mesmo a inclusão de pacientes em estudos clínicos. Neste contexto, este estudo tem como principal objetivo a investigação de variantes somáticas e fusões gênicas em pacientes com diagnóstico de NMs, relacionando-as com os dados clínico-laboratoriais e defecho clínico.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

A leucemia mieloide aguda (LMA) é um conjunto de doenças heterogêneas da medula óssea, devido à aquisição de alterações genéticas nas células progenitoras hematopoiéticas mieloides, que perturbam os mecanismos normais de autorrenovação, proliferação e diferenciação celular (PELCOVITS e NIROULA, 2020). A LMA é um dos tipos mais comuns de leucemia em adultos. Ela afeta principalmente adultos mais velhos e sua incidência aumenta à medida que a população envelhece. A idade média de um paciente com LMA é de 68 anos, mas é também a leucemia mais frequente em lactentes (INCA, 2020).

As alterações genéticas são muito frequentes na LMA, com relevância para diagnóstico, estratificação de risco e delineamento da terapia (PELCOVITS; NIROULA, 2020). Para um subconjunto dos casos de LMA podem ser identificados fatores causais, como quimioterapia prévia ou exposição a produtos químicos. Entretanto, a grande maioria os casos são desencadeados por alterações genéticas sem histórico de quimioterapia ou exposição a produtos químicos (GRIMWADE; IVEY, 2016).

Frequentemente, os pacientes com LMA apresentam sintomas como fraqueza e cansaço devido à anemia, sinais de sangramento mucoso pela plaquetopenia e febre devido à neutropenia (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). Alguns casos serão descobertos na rotina exames de sangue, enquanto outros podem apresentar sintomas relacionados a complicações, como infecção, sangramento ou coagulação intravascular disseminada (PELCOVITS; NIROULA, 2020). Em casos menos frequentes pode ser observado envolvimento de sítios extramedulares, como a infiltração de células leucêmicas na pele (cutis leucêmica) ou ainda infiltração no sistema nervoso central (SNC) (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Em 90% dos casos de LMA o hemograma evidencia anemia; a leucometria pode ser normal, aumentada ou diminuída, a plaquetopenia é habitual, podendo ou não haver blastos circulantes (NARAYANAN; WEINBERG, 2020). Análises da medula óssea são fundamentais para estabelecer o diagnóstico, classificação e avaliação de prognóstico. Na

avaliação morfológica, a medula óssea é geralmente hipercelular, com > 20% de blastos com características mieloides. Quanto à morfologia dos blastos é importante distinguir os diferentes tipos que se correlacionam com os subgrupos de LMA (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Na análise imunofenotípica multiparamétrica por citometria de fluxo, a combinação de mais de um marcador de células imaturas (CD34, CD117, HLA-DR e CD45 para células mieloides; e CD34, CD45 e nTdT para células linfoides) permite identificar e quantificar os blastos com alta reprodutibilidade e boa correlação com a morfologia. O acometimento da linhagem mieloide nas LMAs é confirmado pela detecção da mieloperoxidase intracitoplasmática (MPO) e marcadores monocíticos nos blastos, exceto nos casos de LMA com diferenciação mínima (BÉNÉ *et al.*, 2011) A identificação de antígenos de diferenciação leucocitária, na membrana e intracitoplasmática, possibilita detectar fenótipos mistos, aberrantes e acompanhar doença residual mínima. Fenótipos aberrantes são encontrados em pelo menos 75% das LMAs (VELLOSO *et al.*, 2011).

A análise citogenética convencional permanece mandatória na avaliação de suspeita de LMA. A análise do cariótipo permite identificar as alterações cromossômicas mais frequentes, como as translocações t(15;17), t(8;21), inversão inv(16) ou t(16;16) e rearranjos envolvendo o cromossomo 11q23. Entretanto, no caso de falha na análise citogenética ou cariótipo normal, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma opção para detectar rearranjos gênicos, como as fusões gênicas *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *KMT2A (MLL)*, rearranjos do gene *MECOM (EVII)*, ou deleções em 5q, 7q ou 17p (DONER *et al.*, 2017).

A edição mais recente da classificação da OMS para tumores hematolinfoides separou a LMA em dois grandes grupos: (1) LMA definida por anormalidades genéticas e (2) LMA definida por diferenciação (KHOURY *et al.*, 2022) (Tabela 1).

O *European LeukemiaNet* definiu uma classificação de risco baseada na presença de alterações citogenéticas e moleculares. Neste contexto, a LMA é classificada em pelo menos três grupos de risco: favorável, intermediário e adverso (DÖHNER *et al.*, 2022) (Tabela 2).

A detecção de alterações citogenéticas em pacientes com LMA para o diagnóstico, estratificação de risco e previsão de resultados clínicos é uma prática de rotina, (VOSBERG *et al.*, 2016; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2016) mas devido à heterogeneidade e complexidade da doença, existem discrepâncias na resposta à quimioterapia, duração da remissão e recidiva

entre os pacientes, mesmo que portadores das mesmas alterações citogenéticas (WANG *et al.*, 2020).

**Tabela 1 – Classificação da OMS 2022 para LMA**

<b>Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas definidoras</b>
Leucemia promielocítica aguda com fusão <i>PML::RARA</i>
Leucemia mieloide aguda com fusão <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucemia mieloide aguda com fusão <i>CBFB::MYH11</i>
Leucemia mieloide aguda com fusão <i>DEK::NUP214</i>
Leucemia mieloide aguda com fusão <i>RBM15::MRTFA (RBM15::MKL1)</i>
Leucemia mieloide aguda com fusão <i>BCR::ABL1</i>
Leucemia mieloide aguda com rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia mieloide aguda com rearranjo <i>MECOM</i>
Leucemia mieloide aguda com rearranjo <i>NUP98</i>
Leucemia mieloide aguda com mutação em <i>NPM1</i>
Leucemia mieloide aguda com mutação em <i>CEBPA</i>
Leucemia mieloide aguda relacionada à mielodisplasia
Leucemia mieloide aguda com outras alterações genéticas
<b>Leucemia mieloide aguda definida por diferenciação</b>
Leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima
Leucemia mieloide aguda sem maturação
Leucemia mieloide aguda com maturação
Leucemia basofílica aguda
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monocítica aguda
Leucemia eritroide aguda
Leucemia megacarioblástica aguda

O advento da técnica de NGS permitiu novos *insights* sobre a base molecular das NMs. Semelhante à maioria das neoplasias humanas, a LMA é uma doença complexa e dinâmica, caracterizada pela presença de múltiplas mutações drivers, clones coexistentes e evolução da doença ao longo do tempo (DONER *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Estratificação de risco genético para LMA

Categoria de risco	Anormalidade genética
Favorável	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(8;21)(q22;q22)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i></li> <li>• inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i></li> <li>• Mutação em <i>NPM1</i>, sem mutação <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• Mutação in frame em <i>CEBPA</i> (domínio bZIP)</li> </ul>
Intermediário	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutação em <i>NPM1</i> e <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• Mutação <i>FLT3-ITD</i>, sem mutação em <i>NPM1</i> (ausência de outras alterações de risco adverso)</li> <li>• t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i></li> <li>• outra alteração citogenética ou molecular não classificada como favorável ou adversa</li> </ul>
Adverso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i></li> <li>• t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i> rearranjado</li> <li>• t(9;22)(q34;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i></li> <li>• t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i></li> <li>• inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3), rearranjo em <i>GATA2</i> e <i>MECOM</i></li> <li>• t(3q26.2;v)/<i>MECOM</i> rearranjado</li> <li>• -5 ou del(5q); -7; -17/anormalidade em 17p</li> <li>• Cariótipo complexo, cariótipo com monossomia</li> <li>• Mutação em <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, e/ou <i>ZRSR2</i></li> <li>• Mutação em <i>TP53</i> (VAF <math>\geq</math> 10%)</li> </ul>

bZIP, *basic leucine zipper*; del, deleção; inv, inversão; ITD, duplicação interna em tandem; t, translocação; v, variável; VAF, frequência alélica variante.

A identificação de mutações de impacto prognóstico e terapêutico tem se tornado parte da investigação diagnóstica da LMA. Em adição à análise citogenética, marcadores moleculares podem ajudar a refinar grupos prognósticos, particularmente em pacientes com cariótipo normal. Estes marcadores incluem genes como *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *KIT*, *TP53*, *RUNX1* e *ASXL1* (O'DONNELL *et al.*, 2021).

Com exceção da LMA com t(9;22)(q34.1;q11.2) (fusão *BCR::ABL1*), todas as anormalidades genéticas recorrentes citadas na Tabela 1, são agora considerados para definição de diagnóstico de LMA se houver  $\geq 10\%$  de blastos na medula óssea ou sangue periférico. Para evitar potencial sobreposição com a leucemia mieloide crônica (LMC) em fase acelerada, o diagnóstico de LMA com *BCR::ABL1* ainda requer  $\geq 20\%$  de blastos na medula óssea ou sangue periférico (DÖHNER *et al.*, 2022; KHOURY *et al.*, 2022).

Na última década, houve avanços significativos no perfil genômico da LMA. Isto resultou em oportunidades para o desenvolvimento de terapias genomicamente definidas. Algumas das terapias como os inibidores *FLT3* e de isocitrato desidrogenase (*IDH*) 1 e 2 foram testados em ensaios clínicos e agora estão disponíveis como opção de tratamento para os pacientes que apresentam essas mutações (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

O tratamento da LMA é dividido em terapia inicial de indução e terapia pós-remissão (consolidação). Embora alcançar a remissão seja a primeira etapa para controlar a doença, é importante que os pacientes saiam da indução em condições de tolerar a próxima fase mais intensiva do tratamento e alcançar um controle durável da doença (O'DONNELL *et al.*, 2021). O objetivo da terapia de indução é alcançar a remissão completa, de preferência sem doença residual mensurável. As terapias de indução na LMA incluem 1) quimioterapia citotóxica com ou sem terapia alvo e 2) agentes hipometilantes com ou sem terapia alvo (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

## 2.2 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais da célula-tronco hematopoiética caracterizadas pela proliferação aumentada da série mieloide com maturação eficaz e consequente leucocitose, eritrocitose ou trombocitose no sangue periférico (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016; GRINFELD *et al.*, 2018; MCMULLIN; ANDERSON, 2020).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as NMPs nas seguintes entidades clínico-patológicas distintas: policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica, leucemia mielomonocítica juvenil e neoplasia mieloproliferativa não especificada (KHOURY *et al.*, 2022). Entretanto, a LMC, PV, TE e MFP são as entidades com maior destaque devido às suas prevalências.

A LMC é uma NMP distinta das demais pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultante da translocação t(9;22)(q34;q11.2) e fusão gênica *BCR::ABL1*. A PV, TE e

MFP são conhecidas como NMPs cromossomo Philadelphia (Ph) negativas (AZZATO; BAGG, 2014; BARBUI *et al.*, 2018). A etiologia dessas doenças ainda é pouco conhecida, mas a descoberta da mutação na proteína Janus Kinase 2 (JAK2 V617F) levou a um melhor entendimento das mesmas, modificando a abordagem diagnóstica e também a terapia (VINY; LEVINE, 2014).

O prognóstico na NMP é afetado principalmente pela idade, e evidências recentes sugerem contribuição adicional significativa de biomarcadores genéticos, incluindo mutações e cariótipo. As anormalidades citogenéticas são relativamente pouco frequentes em TE (<10%) e sua relevância prognóstica ainda não foi demonstrada. Na PV, a frequência do cariótipo anormal é de aproximadamente 20% e contribuição prognóstica independente foi demonstrada. Na MFP, um terço dos pacientes apresenta cariótipo anormal ao diagnóstico e anormalidades citogenéticas específicas não parecem afetar a sobrevida global e a sobrevida livre de leucemia (TEFFERI; PARDANANI, 2019).

Considerando o status mutacional, a PV, TE e MFP são caracterizadas principalmente pela presença de mutações drivers nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* (TEFFERI *et al.*, 2014, HELBIG, 2018). Entretanto, entre 10 a 15% dos casos de TE ou MFP essas mutações não estão presentes, sendo chamados de triplo negativos (TEFFERI *et al.*, 2010).

A hematopoiese clonal induzida por mutações somáticas nas células progenitoras mieloides, a hiperplasia medular e o risco aumentado de trombose são características compartilhadas entre as NMPs (SCHISCHLIK; KRALOVICS, 2017). Diversos estudos destacam mutações em genes adicionais não exclusivos das NMPs, mas prognosticamente relevantes, como por exemplo, os genes *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2*, *TET2* e *TP53* (DELIC *et al.*, 2016).

O diagnóstico e manejo dos pacientes com NMPs evoluiu muito desde a identificação das mutações drivers (*JAK2*, *MPL* e *CALR*) e o desenvolvimento de terapias alvo tem resultado em melhora significativa dos sintomas relacionados e na qualidade de vida dos pacientes (TEFFERI, 2016). Entretanto, certos aspectos do manejo clínico em relação ao diagnóstico e terapias adequadas direcionadas aos sintomas permanecem desafiadores para os hematologistas (STEIN *et al.*, 2015).

### **2.2.1 Leucemia Mieloide Crônica**

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença das células hematopoiéticas, caracterizada principalmente pela presença de uma translocação entre os longos braços dos



cromossomos 9 e 22, t(9;22)(q34;q11.2), dando origem ao cromossomo Philadelphia (Ph) e à fusão gênica *BCR::ABL1* (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). A fusão gênica *BCR::ABL1* desempenha um papel central na patogênese da LMC, com a expressão constitutiva de sua oncoproteína quimérica, levando à expansão clonal dessas células hematopoiéticas, que abrigam o gene de fusão. A translocação t(9;22) é observada em aproximadamente 95% de todos os casos de LMC, no entanto, rearranjos envolvendo três ou mais cromossomos podem ser observados aproximadamente em 5% dos casos (JAMIESON *et al.*, 2004). Quanto aos achados laboratoriais, a leucocitose é o principal achado (mediana de 100.000/ $\mu$ L). A contagem de plaquetas geralmente é normal ou elevada; a trombocitopenia sugere a presença de doença em estágio avançado, em vez de em fase crônica. O aumento de basófilos também é um achado característico (THOMPSON *et al.*, 2015)

Sua incidência foi estimada em 1 a 2 casos em 100.000 pessoas/ano, sendo mais frequente entre 40 a 60 anos de idade (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

A LMC caracteriza-se por o crescimento descontrolado de células mieloides em diferentes estágios de maturação. A LMC cursa em três fases: fase crônica, fase acelerada e fase blástica. Inicialmente, a fase crônica é o período no qual as manifestações descritas são mais proeminentes e podem ter durações de alguns anos. Em seguida, vem a fase acelerada, quando surge a resistência ao tratamento e a doença adquire um aspecto mais agressivo, com piora nos parâmetros do hemograma, 10 a 19% de blastos na medula óssea, e evolução clonal no cariótipo. Esta fase tem duração de média de 3 a 6 meses, progredindo para a fase blástica (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). A fase blástica que é caracterizada pelo aumento na porcentagem de blastos mieloides, linfoides ou misto-indiferenciados no sangue ou na medula óssea, sendo a crise blástica mieloide duas vezes mais frequente do que a linfóide. A maioria dos pacientes com LMC permanecem em fase crônica, mas, se não forem tratados, progredirão para a fase acelerada e depois para fase blástica. Entretanto, uma pequena fração de pacientes pode evoluir diretamente para fase blástica (MINCIACCHI, KUMAR E KRAUSE, 2021).

Os sintomas da LMC são inespecíficos, podendo incluir febre, fadiga e perda de peso, geralmente como resultado de anemia e esplenomegalia. Com a progressão da doença para a fase blástica, os sintomas podem se tornar mais graves e incluir dor óssea e sangramentos, por exemplo. No entanto, metade dos pacientes com LMC em fase crônica são assintomáticos, por vezes diagnosticados após exames de sangue de rotina (FADERL *et al.*, 2015).

Na LMC, a presença de alterações citogenéticas adicionais à translocação t(9;22) pode estar relacionada à evolução clonal. As anormalidades citogenéticas adicionais mais comuns observadas em pacientes com LMC são a trissomia do cromossomo 8, o isocromossomo 17 e presença de duplo cromossomo Ph (CORTES e O'DWYER, 2004). Outras alterações cromossômicas, como a deleção no cromossomo 7, a trissomia dos cromossomos 19, 21 e 17 são descritas em menos de 10% dos casos de evolução clonal (QUINTÁS-CARDAMA e CORTES, 2006).

Os inibidores de tirosina quinase (TKIs) são a base do tratamento da LMC e diversos fármacos estão disponíveis atualmente. O tratamento com TKIs resultou em uma melhora na sobrevida global até o ponto em que a expectativa de vida dos pacientes hoje é semelhante àquela da população em geral. Entretanto, uma pequena parcela dos pacientes falha na resposta ao tratamento (THOMPSON *et al.*, 2015).

Os fatores relacionados à transformação de LMC em fase blástica são pouco compreendidos. Anormalidades genéticas únicas, como a fusão *BCR::ABL1*, pode ser um alvo mais fácil para terapia, mas a heterogeneidade molecular apresenta uma situação terapêutica mais difícil, devendo contribuir para uma resposta ineficaz à terapia (BRANFORD *et al.*, 2019). Em 2018 Brandford *et al.* demonstraram que, além da fusão *BCR::ABL1*, variantes somáticas em genes de câncer estão presentes ao diagnóstico em um subconjunto significativo de pacientes, particularmente naqueles pacientes que, apesar da terapia com TKI, experimentam transformação precoce para fase blástica. Neste estudo, o gene *ASXL1* foi o mais frequentemente mutado ao diagnóstico, sendo que 67% dos pacientes evoluíram com crise blástica.

Os avanços nas tecnologias de sequenciamento têm auxiliado no manejo de diversas neoplasias, permitindo a incorporação de perfis de mutação somática ao diagnóstico, classificação, prognóstico e terapia. Uma área ainda pouco explorada nas pesquisas da LMC é análise genômica expandida para o diagnóstico, prognóstico e transformação da doença.

### **2.2.2 Policitemia Vera**

A Policitemia Vera (PV) é uma doença neoplásica clonal caracterizada pelo aumento do volume total de células vermelhas do sangue. Sua origem baseia-se em uma lesão da célula-tronco hematopoiética que leva à proliferação descontrolada dos eritrócitos, granulócitos e megacariócitos (HOFFBRAND; MOSS, 2018). Além disso, caracteriza-se pela predisposição a trombose, assim como a eventos hemorrágicos, uma variedade de sintomas e

risco de progressão para mielofibrose e/ou transformação para LMA ao longo do tempo (IURLO *et al.*, 2020). É importante destacar a panmielose que caracteriza a PV é independente da eritropoetina (hormônio regulador da eritropoiese fisiológica) (TEFFERI, 2015).

Dentre os sintomas clínicos da PV destacam-se o cansaço, tontura e cefaleia. O prurido pode ocorrer em aproximadamente 40% dos casos, geralmente após um banho quente, à noite ou após atividade física. Muitas vezes, o diagnóstico ocorre após complicações decorrentes de eventos trombóticos. No hemograma podem ser observadas elevação de hemoglobina e hematócrito, leucocitose e trombocitose. O mielograma é hiperplasmático com aumento evidente da série eritroide, embora possa haver hiperplasia dos demais setores (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016).

Sua incidência foi estimada em 2,3 - 2,8 por 100.000 pessoas/ano, com mediana de idade no diagnóstico de aproximadamente 60 anos e uma proporção homem/mulher de 1,2:1 (RUGGERI *et al.*, 2003).

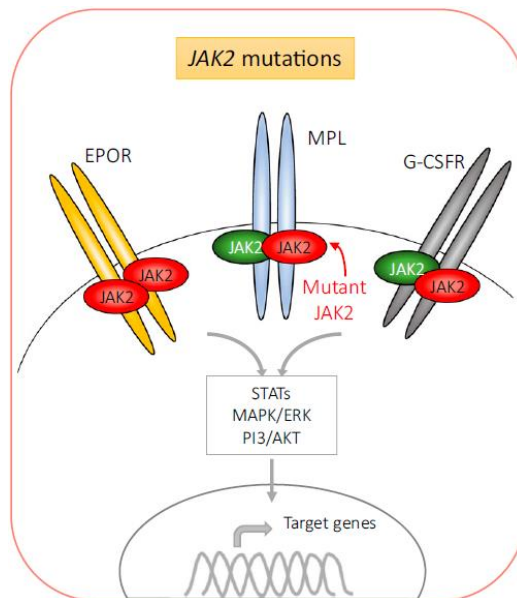
Em quase todos os pacientes com PV pode ser detectada a mutação no gene *JAK2* (Janus quinase 2; 9p24), sendo em aproximadamente 96% dos casos a mutação somática *JAK2V617F* no éxon 14 e em 3% mutações no éxon 12. O éxon 12 codifica os aminoácidos de 505 a 547, mas as mutações foram identificadas nos códons que abrangem os aminoácidos de 533 a 547 (PARDANANI *et al.*, 2007, VANNUCHI *et al.*, 2008). O *JAK2* está intimamente associado às porções citoplasmáticas dos receptores de citocinas hematopoiéticas importantes, como a eritropoietina (EPO), a trombopoietina (TPO) e o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Os receptores das citocinas são ativados pela ligação do ligante, as proteínas JAK consequentemente fosforilam umas às outras, o que atrai as proteínas STAT, que são, por sua vez, fosforiladas pelas JAKs. As STATs dimerizam e translocam para o núcleo, onde funcionam como um fator de transcrição para modular a expressão de genes-chave que regulam a proliferação, diferenciação ou sobrevivência celular. O gene *JAK2* selvagem ativa as vias de sinalização intracelular após a ligação do ligante; no entanto, quando mutado, torna-se constitutivamente ativo, levando à proliferação celular independente de citocinas subsequentes (Figura 1) (NANGALIA; GREEN, 2017; RUMI *et al.*, 2020). A PV com mutação de *JAK2* no éxon 12 é caracterizada por níveis significativamente mais altos de hemoglobina e contagens mais baixas de plaquetas e leucócitos se comparado à PV com mutação *JAK2 V617F*. Entretanto, ambas mutações estão

associadas a risco similar de trombose, transformação para mielofibrose ou leucemia e morte (PASSAMONTI *et al.*, 2011).

Anormalidades citogenéticas podem ser detectadas em 14 a 20% dos pacientes no diagnóstico inicial de PV (SEVER *et al.*, 2013), sendo a del(20q), +8, +9 e +1q as mais comumente relatadas (REILLY *et al.*, 2008; SWOLIN *et al.*, 2008; CERQUOZZI; TEFFERI, 2015). A baixa frequência de cariótipos anormais tornou o prognóstico de pacientes com PV, usando dados citogenéticos, um desafio. Embora alguns estudos não tenham mostrado uma relevância no prognóstico baseada nas alterações citogenéticas (SEVER *et al.*, 2013), outros reportaram um risco maior de progressão da doença e piora do desfecho clínico em pacientes com cariótipo alterado (DINGLI *et al.*, 2006, TEFFERI *et al.*, 2013).

Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou os critérios de diagnóstico da PV (Tabela 3). Em particular, os valores para hemoglobina e hematócrito foram ambos reduzidos para 16,5 g/dL e 49% para homens, e 16 g/dL e 48% para mulheres, respectivamente. O diagnóstico da PV requer todos os três critérios maiores ou os dois primeiros critérios maiores e o critério menor (ARBER *et al.*, 2016; IURLO *et al.*, 2020).

**Figura 1 – Mutações em *JAK2* e ativação das vias de sinalização**



O *JAK2* selvagem associa-se à porção citoplasmática de uma variedade de receptores, tais como trombopoetina (*MPL*), eritropoetina (*EPOR*), fator estimulador de colônia granulócito/macrófago (*G-CSFR*). O *JAK2* mutante permanece constitutivamente ativo, levando a aumento de proliferação e diferenciação eritroide, megacariocítica e granulocítica em menor nível (Modificado de NANGALIA; GREEN, 2017).

**Tabela 3 – Critérios diagnósticos para PV segundo a classificação OMS de 2016**

<b>Critérios maiores</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemoglobina &gt;16,5 g/dL para homens e 16,0 g/dL para mulheres, e/ou hematócrito &gt; 49% para homens e &gt; 48% em mulheres.</li> <li>2. Biópsia de medula óssea demonstrando hiper celularidade para a idade com panmielose (proliferação proeminente das séries eritroide, granulocítica e megacariocítica).</li> <li>3. Presença da mutação <i>JAK2</i> V617F ou da mutação no éxon 12.</li> </ol>
<b>Critério menor</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Níveis séricos de eritropoetina abaixo do valor da normalidade.</li> </ol>

Em um estudo com mais de 1.500 pacientes com PV, os fatores de risco para sobrevida incluíram idade avançada, leucocitose, trombose venosa e cariótipo anormal. Os fatores de risco para transformação leucêmica na PV incluem idade avançada, leucocitose e cariótipo anormal (TEFFERI *et al.*, 2013). Como os eventos trombóticos representam a principal causa de morbidade e mortalidade para pacientes com PV, com uma taxa registrada de mortes por eventos cardiovasculares e eventos trombóticos não fatais de 5,5% pacientes/ano (MARCHIOLI *et al.*, 2005), a estratificação do risco cardiovascular é de importância crucial para avaliar o prognóstico dos pacientes no momento do diagnóstico (IURLO *et al.*, 2020). Atualmente, os pacientes com PV são estratificados em duas classes de risco trombótico: (1) baixo risco, no caso de pacientes mais jovens (idade <60 anos) sem trombozes anteriores e (2) alto risco, no caso de pacientes com mais de 60 anos e/ou com complicações trombóticas anteriores (MARCHIOLI *et al.*, 2005, CHAUFFAILLE *et al.*, 2016).

Na ausência de agentes efetivos em modificar seu curso natural e impedir a progressão da doença, as estratégias de tratamento da PV têm se concentrado principalmente em minimizar o risco de complicações trombo-hemorrágicas que representam a principal causa de morbidade e mortalidade (SPIVAK, 2019). A flebotomia é a base da terapia PV, e a meta do hematócrito de 45% ou menos foi estabelecido por um ensaio randomizado dado o menor risco de eventos cardiovasculares relatados quando comparado com um hematócrito de 45% a 50%. O manejo típico inclui a combinação de flebotomia para reduzir o hematócrito para <45% e aspirina em baixa dose (MARCHIOLI *et al.*, 2013). A manutenção da contagem

de leucócitos e plaquetas é também um desafio do tratamento, uma vez que o risco de trombose mostrou ser aproximadamente quatro vezes maior em pacientes com contagens de leucócitos  $\geq 11 \times 10^9$  /L (BARBUI *et al.*, 2015). Para alcançar os níveis alvo de hematócrito e normalizar as contagens de leucócitos e plaquetas, o European LeukemiaNet (ELN), recomendou a adição de agentes citorreduzidores ao tratamento (BAROSI *et al.*, 2013).

Atualmente, a predição de sobrevida na PV baseia-se sobretudo em variáveis clínicas. Análises de sequenciamento de nova geração (NGS) podem elucidar o cenário molecular da PV para além das mutações *drivers* e identificar pacientes com risco de progressão mais rápida da doença. Um estudo de Tefferi *et al.* (2020) sugere que mutações no gene *SRSF2* afetam adversamente a sobrevida global na PV. Entretanto, são necessários mais estudos para definir outros genes de importância para a patogênese de PV além do *JAK2*.

### 2.2.3 Trombocitemia Essencial

A trombocitemia essencial (TE) é uma doença clonal originada da transformação neoplásica da célula progenitora hematopoiética com proliferação mieloide e elevação progressiva das três séries hematopoiéticas no sangue periférico, embora se caracterize pelo elevado número de plaquetas com hiperplasia megacariocítica (BOSE; VERSTOVSEK, 2019).

Dentre os sintomas clínicos da TE destacam-se cefaleia, síncope, dor torácica atípica, distúrbios visuais, queimação de mãos e pés associada a rubor e calor em aproximadamente 40% dos casos. Os eventos trombóticos são frequentemente observados, sobretudo em pacientes acima de 60 anos. Os fenômenos hemorrágicos acometem aproximadamente um quarto dos pacientes (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016).

No hemograma observa-se nível normal de hemoglobina, embora possa ocorrer anemia leve. Em dois terços dos casos pode ser observada leucocitose ( $>20.000/\text{mm}^3$ ). A contagem de plaquetas é superior a  $450.000/\text{mm}^3$  e podem ser observadas alterações morfológicas. Destaca-se a proliferação da linhagem megacariocítica com predomínio de células grandes, com citoplasma abundante e núcleo hiperlobulado. O mielograma é hiper celular com aumento evidente da série megacariocítica (HOFFBRAND; MOSS, 2018). A biópsia da medula óssea é essencial para o diagnóstico de TE e distinção de casos com MFP pré-fibrótica com um fenótipo de TE ou PV com nível inferior de hemoglobina. Na biópsia de medula, a celularidade é variável, podendo ser normal a discretamente hiper celular (KVASNICKA *et al.*, 2017).

A TE possui incidência anual de 0,2 a 2,27 casos a cada 100.000 habitantes, com sobrevida superior à PV, não devendo ser diferente da população saudável de mesmo sexo e idade (PASSAMONTI *et al.*, 2004). A proporção homem: mulher é de aproximadamente 1:2 e a mediana de idade dos pacientes é 60 anos. Entretanto, 20% dos pacientes com TE têm menos de 40 anos (MORA; PASSAMONTI, 2019). Em pacientes jovens, com idade <60 anos, a mediana de sobrevida ultrapassou 30 anos e o risco de progressão leucêmica ou fibrótica é baixo, estimado entre 2,1-5,3% e 4%-11%, respectivamente (CERQUOZZI; TEFFERI, 2015). Estudos já mostraram a importância da idade como fator de risco independente na TE (TEFFERI *et al.*, 2016). De uma forma geral, a expectativa de vida não parece ser comprometida na primeira década da doença, mas estudos longos de acompanhamento têm mostrado uma menor sobrevida dos pacientes com TE em relação a população geral. Além da idade, a leucocitose e o histórico de trombose constituem os dois outros importantes preditores de redução na sobrevida (GIRODON *et al.*, 2010; MONTANARO *et al.*, 2014).

Não há uma alteração cromossômica característica da TE. Alterações cromossômicas são observadas em cerca de 5% dos casos, sendo a trissomia dos cromossomos 8 e 9 as alterações mais frequentes. A avaliação precisa do impacto prognóstico do estudo citogenético na TE tem sido dificultada pela baixa incidência de cariótipo anormal nesta doença (GANGAT *et al.*, 2009).

Cerca de 90% dos casos de TE mostram um marcador molecular clonal, uma mutação *driver*. O espectro de mutações *drivers* na TE é mais diverso que na PV. A mutação *JAK2* V617F é detectada em 50-60% dos casos, a mutação dos genes da calreticulina (*CALR*) em 20-25% dos pacientes e no gene *MPL* (codifica o receptor da trombopoetina) em 3-15% (BOSE; VERSTOVSEK, 2019). O gene *JAK2* codifica para uma tirosina quinase intracelular que desempenha um papel essencial na hematopoese normal. Esta mutação de ganho de função é responsável por uma mieloproliferação aberrante independente de citocina via ativação da via JAK-STAT. O gene *MPL* localiza-se no cromossomo 1 (1p24) e codifica o receptor de trombopoetina (TORTOLANI *et al.*, 1995). A trombopoetina é um fator de crescimento que regula a produção de progenitores hematopoiéticos multipotentes e plaquetas. As mutações mais frequentes em *MPL* estão no éxon 10, com a maioria delas localizadas no códon 515 do triptofano (MA *et al.*, 2011). Além da mutação *MPLW515L*, reportada em 67% dos casos, várias outras substituições já foram descritas, como *W515K*, *W515R*, *W515A* e *W515G* (VANNUCCHI *et al.*, 2008, MA *et al.*, 2011). Outras mutações

são ainda menos frequentes, como aquelas que afetam a posição 505 e, as mutações não canônicas no éxon 4 recentemente descritas (CABAGNOLS *et al.*, 2016, MILOSEVIC *et al.*, 2016). As mutações em *MPL* são geralmente heterozigotas, mas podem tornar-se homozigotas durante a progressão da doença, mais frequentemente na substituição W515K (BEER *et al.*, 2008). O gene *CALR*, localizado no cromossomo 19 (19p13), codifica a calreticulina, uma chaperona multifuncional ligante de cálcio, localizada no lúmen do retículo endoplasmático. A calreticulina desempenha importante função na homeostase do cálcio, podendo regular uma variedade de funções celulares, como a diferenciação e maturação de megacariócitos e formação de plaquetas, transdução de sinal mediada por integrina, proliferação celular, apoptose, entre outras (ARAKI; KOMATSU, 2020). Mutações *CALR* encontradas em pacientes com NMP são geralmente mutações *frameshift* causadas por pequenas deleções ou inserções de nucleotídeos no éxon 9, o último éxon deste gene. As mutações *CALR* mais frequentes são uma deleção de 52 bp (tipo 1) e uma inserção de 5 bp (tipo 2) (KLAMPFL *et al.*, 2013, PIETRA *et al.*, 2016). A forma mutante da calreticulina é responsável pela exportação de MPL para superfície da célula, levando à ativação da via JAK-STAT independente de TPO (ARAKI *et al.*, 2016, CHACHOUA *et al.*, 2016). As NMPs com mutações em *CALR* apresentam características clínicas distintas (CAZZOLA *et al.*, 2014). Pacientes com TE e mutações em *CALR* têm contagens de plaquetas muito altas, mas risco relativamente baixo de trombose, inferior ao de pacientes com TE e *JAK2* mutante (RUMI *et al.*, 2014).

Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou os critérios de diagnóstico da TE (Tabela 4). O diagnóstico da TE requer todos os quatro critérios maiores ou três primeiros critérios maiores e um critério menor (ARBER *et al.*, 2016). Em um estudo com 867 pacientes com TE, a idade  $\geq 60$  anos, contagem de leucócitos  $\geq 11 \times 10^9/L$  e evento prévio de trombose foram significativamente associados a menor sobrevida (PASSAMONTI *et al.*, 2012). Baseado nesses achados, foi desenvolvido o modelo prognóstico IPSET (*International Prognostic Score for Thrombosis in Essential Thrombocythemia*) que estratificava os pacientes ao diagnóstico em três categorias de risco: baixo risco, risco intermediário e alto risco. A partir dos achados de estudos posteriores o escore IPSET passou por revisões (BARBUI *et al.*, 2012; BARBUI *et al.*, 2015) e foi desenvolvido o escore IPSET-trombose revisado que estratifica os pacientes em quatro diferentes grupos de risco: muito baixo risco, baixo risco, risco intermediário e alto risco (BARBUI *et al.*, 2015; BOSE,



VERSTOVSEK, 2019). Esta estratificação baseia-se na idade do paciente, histórico de trombose e presença da mutação *JAK2* V617F (Tabela 5).

**Tabela 4 – Critérios diagnósticos para TE segundo a classificação OMS de 2016**

<b>Critérios maiores</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Contagem de plaquetas <math>\geq 450 \times 10^9</math> /L.</li> <li>2. Biópsia de medula óssea mostrando principalmente proliferação megacariocítica com aumento de megacariócitos maduros de núcleos aumentados e hiperlobulados. Não há aumento significativo ou desvio à esquerda na granulopoiese de neutrófilos ou eritropoiese e raramente aumento de fibras de reticulina.</li> <li>3. Não atender os critérios da OMS para diagnóstico de LMC <i>BCR::ABL</i><sup>+</sup>, PV, MFP, SMD ou outras NMs.</li> <li>4. Presença de mutação em <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>.</li> </ol>
<b>Critério menor</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de um marcador clonal ou exclusão de trombocitose reativa.</li> </ol>

**Tabela 5 – Modelo IPSET revisado para estratificação de risco na TE**

<b>Risco</b>	<b>Critérios de classificação</b>
Muito baixo	Idade $\leq 60$ anos, <i>JAK2</i> selvagem e sem histórico de trombose
Baixo	Idade $\leq 60$ anos, <i>JAK</i> V617F <sup>+</sup> e sem histórico de trombose
Intermediário	Idade $> 60$ anos, <i>JAK</i> selvagem e sem histórico de trombose
Alto	Idade $> 60$ anos e <i>JAK</i> V617F <sup>+</sup> , ou histórico de trombose independentemente de outros fatores

Aproximadamente 10% dos casos não apresentam as mutações em *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, sendo chamados de triplo-negativos (MORA e PASSAMONTI, 2019). Em um estudo com análises de NGS, foram identificadas mutações somáticas em genes não *drivers* em mais de 50% dos pacientes com TE (TEFFERI *et al.*, 2015). Em um estudo semelhante os genes mais frequentemente mutados foram *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* e *SF3B1*. Não foi encontrada associação entre status mutacional *JAK2/MPL/CALR* e as mutações não *drivers*. A presença

de pelo menos uma mutação adversa nos genes *U2AF1*, *SRSF2*, *SH2B3*, *IDH2*, *SF3B1*, *TP53* e *RUNX1* está associada a inferior sobrevida global independentemente da idade e do cariótipo. Mutações nos genes *U2AF1* e *SF3B1* afetam a sobrevida livre de leucemia e livre de mielofibrose (TEFFERI *et al.*, 2016; TEFFERI *et al.*, 2020).

Apesar de recente progresso na compreensão da patogênese da TE, o manejo terapêutico dessa doença permaneceu praticamente inalterado nas últimas décadas. O tratamento tem se concentrado principalmente na redução do risco de complicações, especialmente na prevenção de eventos trombóticos ou hemorrágicos (MASAROVA; VERSTOVSEK, 2019). A terapia citorrredutora com hidroxiureia é recomendada para os pacientes com TE de alto risco, e usualmente recomendada para os casos de risco intermediário (BOSE; VERSTOVSEK, 2019). O acompanhamento e a aspirina de baixa dose são indicados para os casos de muito baixo risco e baixo risco, exceto quando for contraindicada. A aspirina é geralmente contraindicada na presença de doença de von Willebrand adquirida. Para os casos de risco intermediário e alto risco é indicada a associação de terapia citorrredutora e aspirina de baixa dose (BARBUI *et al.*, 2015). O desenvolvimento de drogas para TE apresenta vários desafios decorrentes de seu curso de doença relativamente benigno e prolongado. Até o momento, nenhuma terapia mostrou alteração efetiva e definitiva do comportamento da doença. Embora novos agentes estejam em desenvolvimento e espere-se que alguns deles ampliem as possibilidades de tratamento da TE, seu papel exato ainda precisa ser determinado (MARASAROVA; VERSTOVSEK, 2019).

#### **2.2.4 Mielofibrose Primária**

A mielofibrose primária (MFP) é uma doença clonal originada da transformação neoplásica da célula progenitora hematopoiética, caracterizada por proliferação anormal de megacariócitos e granulócitos na medula óssea, associada a estágios de fibrose reativa, hematopoese extramedular e expressão anormal de citocinas. A apresentação da doença é heterogênea, com 30% dos pacientes inicialmente assintomáticos (O'SULLIVAN; HARRISON, 2018; KHOURY *et al.*, 2022). A mielofibrose pode se apresentar como uma desordem de novo (mielofibrose primária) ou pode se desenvolver a partir da transformação de uma PV ou TE (MESA *et al.*, 2007). As manifestações clínicas da doença incluem anemia severa, hepatoesplenomegalia, fraqueza, fadiga, palpitação, perda de peso, sudorese noturna, febre, trombose, sangramento e outras (TEFFERI, 2000). A MFP cursa com duas fases, uma

inicial, proliferativa ou fase celular para evoluir para a fase fibrótica, com esgotamento total da medula óssea (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016).

A MFP é a menos frequente dentre as NMPs, com incidência de aproximadamente 1 caso para cada 100.000 habitantes/ano (HARRISON; MCLORNAN, 2014), afetando geralmente pacientes idosos, com mediana de idade no diagnóstico em torno de 65 anos (TEFFERI, 2010). Ao contrário de PV ou TE, há uma redução acentuada na expectativa de vida em pacientes com MFP em comparação com a população em geral (HULTCRANTZ *et al.*, 2012). Os óbitos devem-se à infecção e sangramento como resultado de insuficiência progressiva da medula óssea, trombose e leucemia aguda (CERVANTES *et al.*, 2008). Aproximadamente 10 a 20% dos casos evoluem para leucemia aguda (CHAUFFAILLE *et al.*, 2009).

O curso da doença é variável, com sobrevida média variando de meses a anos. Características clínicas e biológicas, como idade avançada, leucocitose, anemia, dependência de transfusão e a elevação de marcadores inflamatórios podem afetar o prognóstico em pacientes com MFP (ZHOU; FELLOW, 2014).

Os achados laboratoriais característicos incluem a morfologia do sangue periférico com presença de dacriócitos, eritroblastos, leucocitose com ou sem aumento de blastos circulantes, trombocitose ou trombocitopenia com megacariócitos circulantes. O aspirado de medula óssea pode produzir um aspirado 'seco' devido à presença de fibrose (GANGAT; TEFFERI, 2020), o que frequentemente inviabiliza a coleta de amostra para realização do mielograma e outros exames. De acordo com a classificação da OMS, a MFP é diferenciada em duas entidades clínicas: MF pré-fibrótica e MF fibrótica (ARBER *et al.*, 2016; KHOURY *et al.*, 2022). Na fase pré-fibrótica da doença observa-se hiper celularidade dos setores mieloides. A biópsia da medula óssea na fase pré-fibrótica é hiper celular, com aumento no número de neutrófilos e, frequentemente, redução na eritropoese. O diagnóstico da MFP pré-fibrótica requer presença dos três critérios maiores e pelo menos um critério menor (ARBER *et al.*, 2016) (Tabela 6). Na fase fibrótica, a celularidade da medula óssea diminui e as fibras reticulínicas e colagênicas se tornam mais evidentes (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). A biópsia de medula óssea com coloração para reticulina, os estudos citogenéticos e moleculares são muito importantes para estabelecer o diagnóstico da MFP (GANGAT; TEFFERI, 2020). O diagnóstico da MFP fibrótica requer presença dos três critérios maiores e pelo menos um critério menor (ARBER *et al.*, 2016) (Tabela 7).

**Tabela 6 – Critérios da OMS para diagnóstico da MFP pré-fibrótica**

<b>Mielofibrose primária pré-fibrótica</b>
<b>Critérios maiores</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de proliferação megacariocítica e atipia sem fibrose reticulínica &gt; grau 1, acompanhada por aumento da celularidade da MO ajustada à idade, proliferação granulocítica e, frequentemente diminuição da eritropoese.</li> <li>2. Não atender os critérios da OMS para LMC <i>BCR-ABL1+</i>, PV, TE, SMD ou outras NMs.</li> <li>3. Presença da mutação <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>, ou presença de outro marcador clonal, ou ausência de mielofibrose reativa.</li> </ol>
<b>Critérios menores</b>
<p>Presença de pelo menos um dos critérios abaixo, em duas determinações consecutivas.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anemia não atribuída a uma comorbidade</li> <li>2. Leucocitose <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li> <li>3. Esplenomegalia palpável</li> <li>4. Aumento de LDH acima do limite superior normal</li> </ol>

**LDH, desidrogenase láctica.**

Em 50 a 60% dos casos de MFP pode ser identificada a mutação do éxon 14 do gene *JAK2* (V617F), em 30% a mutação do gene da calreticulina (*CALR*), em menos de 10% dos casos a mutação em *MPL* e 9% são triplo negativos para estas mutações (TEFFERI *et al.*, 2018). Os casos triplos negativos têm um pior prognóstico e alta taxa de transformação leucêmica (ALSHEMMARI *et al.*, 2016).

O cariótipo de medula óssea é um teste importante na estratificação de risco da MFP, mas assim como na PV e TE não há uma alteração cromossômica exclusiva da doença. Embora a 30 a 70% dos pacientes com MFP apresentem cariótipo alterado (LIN *et al.*, 2020), apenas um número limitado de alterações cromossômicas parecem estar associadas a um pior prognóstico, em particular +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3) e rearranjos em 11q23 (IURLO *et al.*, 2020).

As decisões quanto ao tratamento na MFP são muitas vezes desafiadoras, particularmente no que diz respeito ao momento de opção por um transplante alogênico de MO ou participação em ensaios clínicos. Portanto, estratificação de risco precisa dos

pacientes quanto à sobrevida global e sobrevida livre de leucemia é crítica (GANGAT *et al.*, 2011). O *Dynamic International Prognostic Scoring System Plus* (DIPSS-Plus) para MFP considera os seguintes fatores de risco para prever a sobrevida: idade superior a 65 anos, hemoglobina inferior a 10 g/dL, contagem de leucócitos acima de  $25 \times 10^9/L$ , blastos circulantes  $\geq 1\%$ , necessidade de transfusão de hemácias, contagem de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$  e presença de cariótipo desfavorável (GANGAT *et al.*, 2011; TEFFERI, 2021). O DIPSS-Plus é estratificado em quatro categorias de risco baseadas nos oito fatores já mencionados: (1) baixo (sem fatores de risco), (2) intermediário-1 (presença de um fator de risco), (3) intermediário-2 (dois ou três fatores de risco) e (4) alto (quatro ou mais fatores de risco); com medianas de sobrevida de 15,4; 6,5; 2,9 e 1,3 anos, respectivamente (GANGAT *et al.*, 2011).

**Tabela 7 – Critérios da OMS para diagnóstico da MFP fibrótica**

<b>Mielofibrose primária fibrótica</b>
<b>Critérios maiores</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de proliferação megacariocítica e atipia, acompanhada por fibrose reticulínica e/ou colagênica grau 2 ou 3.</li> <li>2. Não atender os critérios da OMS para LMC <i>BCR::ABL1<sup>+</sup></i>, PV, TE, SMD ou outras NMs.</li> <li>3. Presença da mutação <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>, ou presença de outro marcador clonal, ou ausência de mielofibrose reativa.</li> </ol>
<b>Critérios menores</b>
<p>Presença de pelo menos 1 dos critérios abaixo, em duas determinações consecutivas.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anemia não atribuída a uma comorbidade</li> <li>2. Leucocitose <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li> <li>3. Esplenomegalia palpável</li> <li>4. Aumento de LDH acima do limite superior normal</li> <li>5. Leucoeritroblastose</li> </ol>
<b>LDH, desidrogenase láctica.</b>

Todas as ferramentas de avaliação prognóstica até então dependiam fortemente de parâmetros laboratoriais muito sujeitos a flutuações, especificamente valores de hemoglobina, em pacientes transfundidos (TEFFERI *et al.*, 2020). Isto foi superado pelos escores

prognósticos contemporâneos: *Mutation Enhanced Prognostic Scoring Systems* (MIPSS 70, MIPSS 70-plus e MIPSS 70-plus versão 2.0), que compreendem mutações com impacto no prognóstico, além dos parâmetros laboratoriais. Anormalidades de alto risco molecular incluem mutações em *ASXL1*, *EZH1*, *SRSF2* e *IDH1* com a adição de *U2AF1* no MIPSS 70-plus versão 2.0. Além disso, no MIPSS 70-plus versão 2.0, anemia e cariótipo foram cuidadosamente analisados e separados em categorias distintas. O *Genetically Inspired Prognostic Scoring System* (GIPSS) é uma ferramenta de avaliação prognóstica mais simples e prática para o médico, baseada em alterações citogenéticas e moleculares isoladas, como cariótipo desfavorável, *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1*, ausência de mutações *CALR* Tipo 1 (TEFFERI *et al.*, 2018).

A frequência de mutações inespecíficas não *drivers* é maior na MFP em comparação a PV e TE. Desde a publicação do DIPSS-plus, foram publicados vários estudos sugerindo informações prognósticas adicionais (TEFFERI *et al.*, 2021). Na MFP mutações não *drivers* com frequência de 10% ou mais incluem os genes *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2* e *U2AF1* (LASHO *et al.*, 2012, VANNUCHI *et al.*, 2013). Foi relatado que pacientes com MFP e perfil de mutação *CALR*<sup>+</sup>/*ASXL1*<sup>-</sup> têm maior sobrevida, em comparação com aqueles com *CALR*<sup>-</sup>/*ASXL1*<sup>+</sup>, enquanto *CALR*<sup>+</sup>/*ASXL1*<sup>+</sup> e *CALR*<sup>-</sup>/*ASXL1*<sup>-</sup> os pacientes estavam em uma categoria semelhante de risco intermediário (TEFFERI *et al.*, 2014). Além disso, estudos com NGS multigênicos identificaram mutações nos genes *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *SH2B3* e *CEBPA* associadas a efeito adverso na sobrevida global ou sobrevida livre de leucemia (TEFFERI *et al.*, 2016).

As terapias atualmente disponíveis são de benefício paliativo, sem capacidade de modificação da doença, com potencial para causar eventos adversos (GANGAT; TEFFERI, 2020). O único tratamento que atualmente é capaz de levar ao aumento da sobrevida ou tem potencial de cura na MFP é o transplante alogênico de células-tronco (TCTH). Infelizmente, o TCTH em MFP está atualmente associado a pelo menos 50% de taxa de mortes relacionadas ao transplante ou morbidade grave, independentemente da intensidade dos regimes de condicionamento usados (BALLEN *et al.*, 2010). A terapia de primeira linha para esplenomegalia associada a MFP é a hidroxiureia, eficaz na redução do tamanho do baço pela metade em aproximadamente 40% dos pacientes (MARTINEZ-TRILLOS *et al.*, 2010). A anemia sintomática relacionada a MFP é tratada com suporte transfusional além de medicamentos. Em termos de terapia, as opções são limitadas a agentes estimulantes da eritropoiese (se o nível de eritropoietina <500 UI), andrógenos, como o danazol e

combinações de talidomida ou lenalidomida com prednisona (TEFFERI, 2011). Uma terapia emergente para a anemia é o luspatercept, que se liga aos ligantes da superfamília TGF- $\beta$ , como fator de diferenciação de crescimento 11 (GDF11), diminuindo a sinalização de SMAD e intensificando a eritropoiese em estágio avançado (GERDS *et al.*, 2019). O tratamento da esplenomegalia sintomática pode ser alcançado com hidroxiureia ou inibidores *JAK2* aprovados (ruxolitinib ou fedratinib) (HARRISON *et al.*, 2017). A caracterização molecular da MFP aumentou substancialmente a avaliação de prognóstico; no entanto, o impacto das mutações concomitantes merece um estudo mais aprofundado. A busca por terapias que modifiquem o curso doença continua voltada para alvos além das vias de sinalização JAK-STAT, sozinhos ou em combinação com terapia com inibidor de JAK. Intervenção precoce com novos agentes ou o transplante alogênico em pacientes de MFP geneticamente de alto risco justifica esta exploração (TEFFERI *et al.*, 2020).

### 2.3 NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA

A classificação mais recente da OMS para as NMs introduziu o termo neoplasia mielodisplásica em substituição à síndrome mielodisplásica, mas permaneceu abreviada como SMD (KHOURY *et al.*, 2022). A SMD é um grupo heterogêneo de doenças das células precursoras hematopoiéticas com alteração na proliferação e maturação celular. Caracterizam-se por citopenias periféricas devido à hematopoese ineficaz, displasia morfológica e risco aumentado de transformação para leucemia aguda (VALENT *et al.*, 2017). A SMD acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, com idade superior a 60 anos, sendo a NM mais comum em idosos, com incidência média anual de até 75 por 100.000 pessoas (HAIDER *et al.*, 2017). A SMD pode ser primária ou secundária. Na SMD primária, a etiologia da doença está associada à exposição a produtos tóxicos à medula óssea, como os derivados de benzeno e pesticidas, por exemplo. A SMD secundária pode ocorrer em consequência de quimioterapia ou radioterapia. Algumas doenças podem conferir um maior risco de SMD, como por exemplo, a anemia de fanconi (HOFFBRAND; MOSS, *et al.*, 2018).

Há três pilares que suportam o diagnóstico de SMD: 1. Citopenia persistente e clinicamente inexplicada, 2. Displasia morfológica; e 3. Evidências de hematopoiese clonal por citogenética e/ou genética molecular (HASSERJIAN *et al.*, 2019).

Dentre os sintomas da SMD destacam-se a fraqueza e cansaço devido à anemia, às vezes dependente de transfusões, sangramento mucoso em função da plaquetopenia, e mais raramente a febre associada à neutropenia (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). Geralmente

suspeita-se de SMD na presença de citopenia em exame de rotina do sangue periférico, que desencadeia a avaliação da medula óssea. Na análise morfológica, a medula óssea em geral é hiper celular, com graus variáveis de displasia, com ou sem células sanguíneas imaturas (GIDARO *et al.*, 2016). A avaliação inicial inclui, além do exame do sangue periférico, o aspirado medular com reação de Perls, o estudo histopatológico da medula óssea com avaliação da trama de fibras reticulínicas, a análise citogenética e a citometria de fluxo (VASSALO; MAGALHAES, 2009).

Os diferentes subtipos de SMD foram agrupados em SMD definida por anormalidades genéticas e SMD morfológicamente definida (Tabela 8). Os critérios de classificação da OMS para SMD incluem a proporção de blastos na medula óssea e no sangue periférico, as alterações citogenéticas, e, a presença de mutações somáticas nos genes *SF3B1* e *TP53* (KHOURY *et al.*, 2022).

A SMD compreende um amplo espectro de fenótipos clínicos que variam desde pacientes assintomáticos, com citopenias leves e maior expectativa de vida, até aqueles sintomáticos, com citopenias graves e prognóstico reservado. Entretanto, pacientes com doenças semelhantes podem ter uma evolução diferente ao longo do tempo. Esta variabilidade pode ser um desafio para os médicos determinarem o momento ideal para iniciar o tratamento, a escolha do tratamento para seus pacientes e a melhor forma de aconselhá-los quanto ao prognóstico. As escolhas terapêuticas para pacientes de baixo risco se assemelham pouco às opções recomendadas para pacientes de alto risco. Em aproximadamente 45% dos casos de SMD pode ser identificada uma anormalidade citogenética recorrente (SCHANZ *et al.*, 2012, NYBAKKEN; BAGG, 2014). Diferentemente da LMA, as alterações de número de cópias, incluindo deleções cromossômicas e ampliações gênicas são mais comuns do que as translocações. Certos achados citogenéticos na SMD estão associados a mudanças no prognóstico e foram incorporados ao escore de prognóstico IPSS-R (GREENBERG *et al.*, 2012). O cariótipo complexo (mais de três alterações cromossômicas) e o cariótipo monossômico têm sido associados a um pior prognóstico (DELLA PORTA *et al.*, 2014; KOENECKE *et al.*, 2015) (Tabela 9).

Considerando os vários subtipos da doença, os achados citomorfológicos, imunofenotípicos, histológicos, citogenéticos e mutacionais se complementam para determinação do prognóstico, risco de transformação para LMA e resposta ao tratamento (CHAUFFAILLE *et al.*, 2016).



Tabela 8 – Critérios definidos pela OMS para classificação da SMD

Classificação	% blastos	Alterações citogenéticas	Mutações
<b>SMD definida por alterações genéticas</b>			
SMD com baixo % de blastos e deleção isolada em 5q (SMD-5q)	<5% na MO e <2% no SP	del(5q) isolada, ou com uma outra alteração que não seja del(5q) ou monossomia do cromossomo 7	
SMD com baixa % de blastos e mutação <i>SF3B1</i> <sup>a</sup> (SMD- <i>SF3B1</i> )	<20% na MO e no SP	Ausência de del(5q), monossomia do cromossomo 7 ou cariótipo complexo	<i>SF3B1</i>
SMD com inativação bialélica de <i>TP53</i> (SMD-bi <i>TP53</i> )		Usualmente cariótipo complexo	Duas ou mais mutações em <i>TP53</i> , ou uma mutação com evidência de perda número de cópias de <i>TP53</i>
<b>SMD morfológicamente definida</b>			
SMD com baixa % de blastos SMD hipoplásica	<5% na MO e <2% no SP		
SMD com aumento de blastos SMD-AB 1	5-9% na MO ou 2-4% no SP		
SMD-AB 2	10-19% na MO ou 5-19% no SP ou sideroblastos em anel		
SMD com fibrose	5-19% na MO; 2-19% no SP		

<sup>a</sup> A detecção de  $\geq 15\%$  de sideroblastos em anel deve substituir a mutação *SF3B1*, sendo aceitável a terminologia: SMD com baixa porcentagem de blastos e sideroblastos em anel. AB, aumento de blastos; bi, bialélica; del, deleção; MO, medula óssea; SP, sangue periférico.

**Tabela 9 – Alterações citogenéticas recorrentes de prognóstico relevante na SMD**

<b>Prognóstico</b>	<b>% Casos</b>	<b>Alteração citogenética</b>
<b>Muito bom</b>	3% - 4%	-Y, del(11q)
<b>Bom</b>	66% - 72%	normal, del(5q), del(12p), del(20q), duplo incluindo a del(5q)
<b>Intermediário</b>	13% - 19%	del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer outro clone simples ou duplo independente
<b>Pobre</b>	4% - 5%	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duplo incluindo -7/del(7q), complexo: três alterações citogenéticas
<b>Muito pobre</b>	7%	Complexo: mais que três alterações

del, deleção; inv, inversão; i, isocromossomo; p, braço curto; q, braço longo; t, translocação.

Foram desenvolvidos sistemas de escore prognóstico que incorporam fatores de risco relacionados à doença, características do paciente e achados citogenéticos para estratificar com mais precisão o risco de pacientes com SMD. Entretanto, essas ferramentas de avaliação de risco não incorporam formalmente as mutações somáticas que demonstraram associações prognósticas independentes capazes de refinar melhor a previsão de risco de doença. Os escores de prognóstico de SMD mais relevantes são o IPSS, WPSS e IPSS-R (HAIDER *et al.*, 2017). O WPSS (*WHO Prognostic Scoring System*) atribui pontuações de risco a subtipos baseadas na porcentagem de blastos na medula óssea, na presença de anormalidades citogenéticas e de anemia grave para determinar uma pontuação de risco total. Essas pontuações são então traduzidas em um dos cinco grupos de risco com diferenças significativas na mediana de sobrevida global e probabilidade de progressão para LMA. As vantagens do WPSS incluem sua facilidade de uso, ter sido validado em momentos diferentes do diagnóstico, tornando-o um sistema de pontuação dinâmico. Porém, sua maior desvantagem é o número limitado de anormalidades citogenéticas consideradas, tornando-o menos preciso para certos pacientes (VOSO *et al.*, 2013; DELLA PORTA *et al.*, 2015). O IPSS (*International Prognostic Scoring System*) assim como o WPSS é simples de usar, considerando a porcentagem de blastos na medula óssea, um pequeno número de

anormalidades citogenéticas a presença de citopenias como fatores de risco relevantes. Baseado na pontuação os pacientes são atribuídos a um dos quatro grupos de risco. Na prática, aqueles com risco IPSS baixo ou intermediário-1 são considerados como tendo SMD de baixo risco, enquanto aqueles com risco intermediário-2 ou alto risco IPSS são considerados de maior risco (GREENBERG *et al.*, 1997). O IPSS tem limitações importantes. Considera apenas a presença de citopenias e não sua gravidade, e supera o impacto da proporção de blastos em comparação com anormalidades citogenéticas. Isto pode levar a uma subestimação do risco em muitos pacientes de baixo risco com proporções normais de blastos (MITTELMAN *et al.*, 2010). O IPSS-R (*International Prognostic Scoring System Revised*) também possui as limitações do IPSS, mas a ele foram incorporadas melhorias que o levaram a ser considerado o padrão ouro atual para estratificação de risco na SMD (Figura 2) (HAIDER *et al.*, 2017).

**Figura 2 – Escore prognóstico IPSS-R e estratificação na SMD**

Grupos de risco citogenético	Alterações citogenéticas IPSS-R				
Muito bom	del(11q), -Y				
Bom	Normal, del(20q), del(5q) sozinha ou com uma outra alteração, del(12p)				
Intermediário	+8, del(7q), i(17q), +19, +21, qualquer alteração única ou dupla não listada, dois ou mais clones independentes				
Pobre	der(3q), -7, dupla alteração com del(7q), cariótipo complexo com três alterações				
Muito pobre	Cariótipo complexo com mais de três alterações				

Parâmetro IPSS-R	Categorias e escores associados				
	Muito bom	Bom	Intermediário	Pobre	Muito pobre
Grupo de risco citogenético	0	1	2	3	4
% de blastos na MO	≤ 2%	>2% - >5%	5% - 10%	>10%	
	0	1	2	3	
Hemoglobina (g/dL)	≥10	8 - <10	<8		
	0	1	1,5		
Contagem de plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	≥100	50 - <100	<50		
	0	0,5	1		
Contagem de neutrófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	≥0,8	<0,8			
	0	0,5			

Grupos de risco IPSS-R	Pontos	% de pacientes	Mediana de sobrevida (anos)	Tempo de 25% evoluir para LMA (anos)
Muito bom	≤ 1,5	19	8,8	NA
Bom	>1,5 - 3	38	5,3	10,8
Intermediário	>3 - 4,5	20	3	3,2
Pobre	>5 - 6	13	1,6	1,4
Muito pobre	>6	10	0,8	0,73

Os grupos de risco são definidos pelo somatório da pontuação de cada parâmetro. SMD com escore de risco de 3,5 ou inferior é considerada de baixo risco. SMD com escore de risco maior que 3,5 é de alto risco (Haider *et al.*, 2017). NA, não alcançado; del, deleção; i, isocromossomo; der, cromossomo derivado; q, braço longo.

Estudos com coortes distintas mostraram que mutações em *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* e *ASXL1* podem prever a redução na sobrevida global em modelos multivariados ajustados para o grupo de risco IPSS ou IPSS-R (BEJAR *et al.*, 2011; HAFERLACH *et al.*, 2014). Dentro do grupo de risco IPSS, uma mutação em um ou mais desses genes identificam pacientes cujo risco de sobrevida se assemelha aos dos pacientes no próximo mais alto grupo de risco IPSS. A curva de sobrevida para os pacientes com risco intermediário-1 e uma mutação adversa se assemelha a dos pacientes do grupo intermediário-2 do IPSS (BEJAR *et al.*, 2011). Quando aplicado a pacientes estratificados pelo IPSS-R, a presença de uma mutação em um ou mais desses cinco genes foi associada a menor sobrevida global para pacientes nos grupos de risco baixo e intermediário (HAFERLACH *et al.*, 2014). Sendo assim, a análise combinada dessas mutações aos escores de risco IPSS ou IPSS-R pode melhorar a estratificação de risco fornecida pelos escores individualmente (GREENBERG *et al.*, 2021). Mutações no gene *SF3B1* estão presentes em aproximadamente 20% dos casos de SMD associadas à morfologia com sideroblastos em anel, doença de baixo grau e melhor prognóstico (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2011). A investigação de mutações somáticas além de permitir um maior conhecimento sobre a biologia da SMD pode fornecer novos biomarcadores e alvos para terapia (HAIDER *et al.*, 2017). Recentemente, foi desenvolvido um modelo prognóstico clínico-molecular, o *Molecular International Prognostic Scoring System* (IPSS-M), um novo sistema prognóstico que considera parâmetros hematológicos, alterações citogenéticas e mutações somáticas em 31 genes. Este estudo mapeou pelo menos uma mutação em 94% dos pacientes com SMD. A análise multivariada identificou mutações em *FLT3*, *MLL*<sup>PTD</sup> e *TP53*<sup>multihit</sup> (múltiplas mutações em *TP53* ou mutação com perda de heterozigossidade) como os preditores moleculares mais relevantes de resultados adversos. O IPSS-M propõe seis categorias de risco: muito baixo, baixo, moderado baixo, moderado alto, alto e muito alto. Comparado com o IPSS-R, o IPSS-M melhorou a discriminação prognóstica em todos os desfechos clínicos e reestratificou 46% dos pacientes (BERNARD *et al.*, 2022).

Baseado na presença de mutações somáticas, alteração cromossômica clonal, displasia de medula e citopenias características, os pacientes podem ser classificados num espectro de desordens hematológicas indolentes. Estas desordens podem evoluir para SMD ou LMA. O espectro de desordens hematológicas indolentes compreende quatro grupos: citopenia idiopática de significado indeterminado (ICUS), displasia idiopática de significado desconhecido (IDUS), hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP) e citopenia clonal de significado incerto (CCUS). CHIP e CCUS são definidas pela presença de uma alteração cromossômica clonal (presente em  $\geq 2$  metáfases) e/ou uma mutação somática em

gene envolvido na hematopoiese (presente em frequência do alelo variante  $\geq 2\%$ ). A CCUS difere de CHIP pela presença de citopenia. Embora a CHIP seja uma condição pré-maligna benigna e tenha baixa probabilidade de progressão se comparada a outras condições pré-malignas, há um risco maior de doença hematológica subsequente comparada àqueles pacientes sem mutações somáticas (XIE *et al.*, 2015; JAISWAL *et al.*, 2014). Os genes mais frequentemente mutados associados a CHIP incluem *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *JAK2*, *PPM1D*, *TP53* e genes SF (GENOVESE *et al.*, 2014; JAISWAL *et al.*, 2014; STEENSMA *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2015).

As categorias de risco IPSS e IPSS-R são usadas no planejamento inicial da terapia. O manejo da SMD é geralmente complicado pela idade avançada dos pacientes e presença de outras comorbidades, pois influenciam muito na capacidade dos pacientes de tolerar formas intensivas de terapia (GREENBERG, 2000; GREENBERG *et al.*, 2021). Além disso, quando a doença progride para LMA, esses pacientes apresentam taxas de resposta mais baixas à terapia padrão do que os pacientes com LMA de novo (GREENBERG P, 2000). A natureza heterogênea das SMDs exige uma variedade complexa e personalizada de abordagens terapêuticas (CHESON *et al.*, 2000).

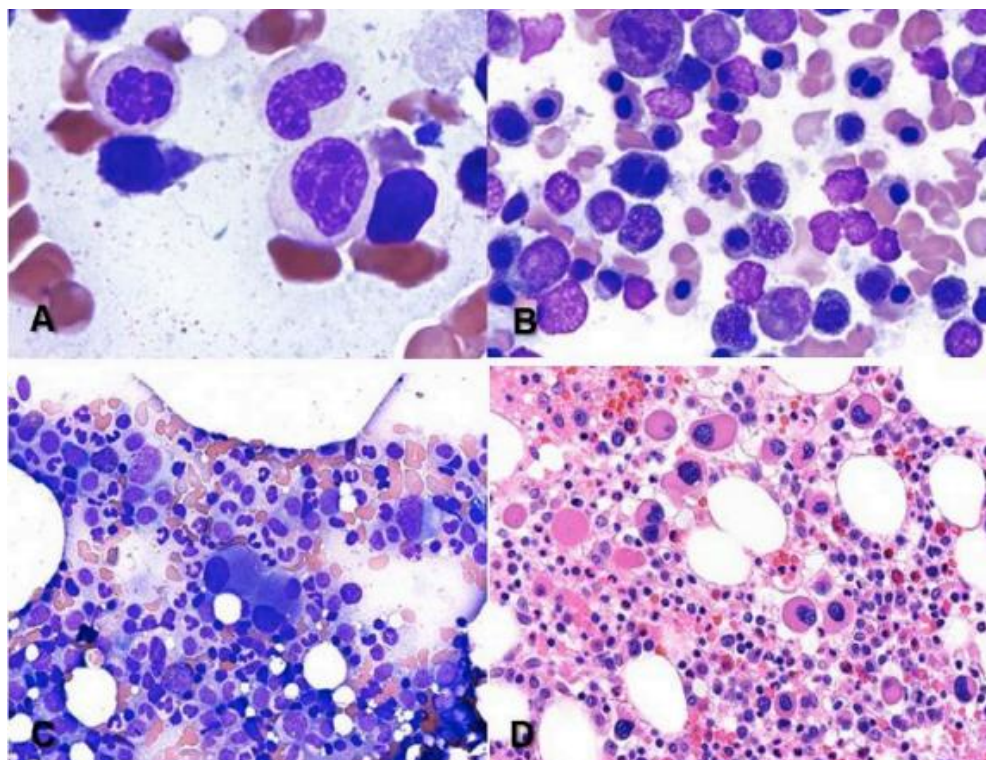
O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas continua sendo a única opção potencialmente curativa, mas que está disponível para um número restrito de pacientes aptos (PLATZBECKER, 2019). Estudos mostraram que as mutações somáticas também influenciam a probabilidade de recaída pós-transplante (BEJAR *et al.*, 2014). Para a maioria dos pacientes as estratégias de tratamento são não intensivas e adaptadas ao risco, variando desde quelação de ferro e administração de fatores de crescimento ao uso de lenalidomida e agentes hipometilantes (PLATZBECKER, 2019). A transfusão de hemácias para pacientes com anemia grave e transfusões de plaquetas em pacientes com plaquetopenia grave são a base da terapia da SMD (STEENSMA, 2018). Estas abordagens não são curativas, mas visam melhorar as citopenias e a qualidade de vida dos pacientes, além de serem uma tentativa de retardar a progressão da doença (PLATZBECKER, 2019). Para os pacientes de baixo risco com anemia sintomática, o tratamento com agentes estimulantes da eritropoiese ou a lenalidomida (especialmente nos casos de deleção no cromossomo 5q) podem melhorar os sintomas. Alguns pacientes de baixo risco podem ser candidatos à terapia imunossupressora, à agentes estimuladores da trombopoiese ou um agente hipometilante como azaticidina ou decitabina. Entre os pacientes de alto risco, os candidatos a transplante devem ser submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas o mais rápido possível, utilizando agentes hipometilantes como uma ponte para o transplante. Os pacientes não elegíveis ao transplante

devem iniciar a terapia com hipometilantes e continuar se tolerada, até a progressão da doença (STEENSMA, 2018). Na última década houve grande progresso na compreensão dos mecanismos moleculares complexos inerentes à SMD, porém este conhecimento ainda não se traduziu na aprovação de novas opções curativas de tratamento (PLATZBECKER, 2019).

## 2.4 NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA/MIELOPROLIFERATIVA

As neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP) são um grupo de neoplasias mieloides clonais que afetam as células-tronco hematopoéticas, caracterizadas pela presença simultânea de características mielodisplásicas e mieloproliferativas (ORAZI *et al.*, 2008). Assim como na SMD, as SMD/NMP são caracterizadas pela mielodisplasia e hematopoiese inefetiva em uma ou mais linhagens, resultando em citopenias no sangue periférico, mais comumente a anemia (SANGIORGIO *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo, observa-se na medula óssea o aumento da proliferação em uma ou mais linhagens hematopoiéticas, resultando principalmente em trombocitose e leucocitose no sangue periférico, além de esplenomegalia, características tipicamente associadas às NMPs (GARZA *et al.*, 2020). Como observado nas NMPs e mais raramente nas SMDs, nas SMD/NMP podem ser observadas alterações estromais da medula óssea na forma de fibrose de reticulina e colágeno. A porcentagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico é, por definição, < 20% do total de células nucleadas (SANGIORGIO *et al.*, 2020). A classificação franco-americana-britânica (FAB) para as neoplasias mieloides não incluiu uma categoria de sobreposição de SMD/NMP. Neste contexto, a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) foi inicialmente classificada como SMD em função de características como presença de displasia, citopenias e aumento variável de blastos (BENNET *et al.*, 1994). Na classificação da OMS em 2001, o grupo de SMD/NMP foi introduzido na classificação da OMS para NMs como uma categoria diagnóstica para reconhecer a existência de NMs com características clínicas e morfológicas que se sobrepõem entre a SMD e NMP (VARDIMAN *et al.*, 2009). A classificação da OMS mais recente incluiu dentro do grupo de SMD/NMP cinco entidades diagnósticas distintas: leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), SMD/NMP com neutrofilia, SMD/NMP com mutação em *SF3B1* e trombocitose, e SMD/NMP não especificada (ARBER *et al.*, 2016; KHOURY *et al.*, 2022). A avaliação da displasia em células eritroides e granulocíticas deve ser realizada em esfregaços de sangue e/ou medula óssea, enquanto a dismegacariopoiese é mais bem avaliada em biópsia de medula óssea (SANGIORGIO *et al.*, 2020) (Figura 3).

**Figura 3 – Achados displásicos na SMD/NMP**



(A) Disgranulopoiese definida pela presença de granulócitos hiposegmentados e não segmentados, e/ou com escassez de grânulos citoplasmáticos. (B) Diseritropoiese ilustrada pela multinucleação e fragmentação nuclear dos eritroblastos. (C, D) Dismegacariopoiese identificada pela presença de pequenos megacariócitos com núcleos não lobulados ou hipolobulados. A-C: aspirado medular, coloração Wright-Giemsa; D: biópsia de medula óssea, coloração hematoxilina/eosina (Sangiorgio *et al.*, 2020).

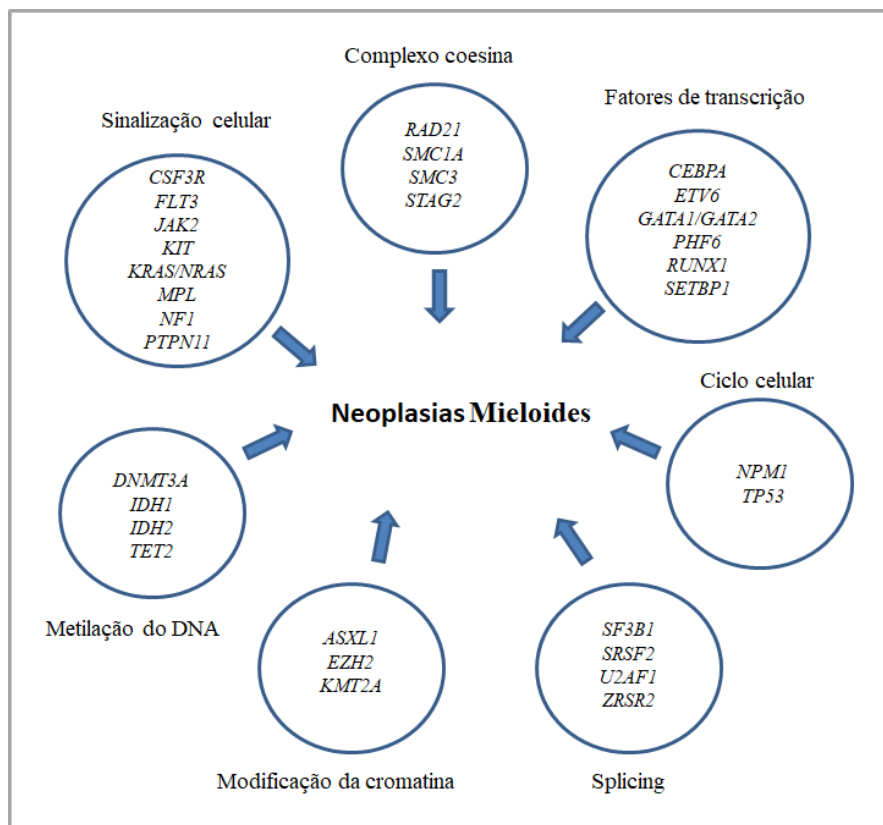
Na análise citogenética podem ser identificadas alterações cromossômicas em aproximadamente 70% dos pacientes. As alterações são semelhantes às observadas em outras NMs e não são definidoras da doença. Dentre as alterações destacam-se a trissomia do cromossomo 8, a monossomia do cromossomo 7 e as deleções nos braços longos dos cromossomos 7, 13 e 20 (TIU *et al.*, 2011). Na SMD/NMP, as características de sobreposição também são observadas em nível molecular. Em analogia à NMP, mutações que ativam a proliferação e as vias antiapoptóticas são frequentes e explicam o fenótipo mieloproliferativo; destacando as mutações que afetam a via JAK STAT (*JAK2*), via RAS (*NRAS*, *KRAS*), reguladores negativos das vias de sinalização (*PTPN11*, *CBL*, *NF1*) e receptores do fator de crescimento (*MPL*, *CSF3R*). Concomitantemente, também são observadas mutações em genes envolvidos em várias vias funcionais comumente afetadas em SMD; como metilação de DNA (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*), modificação de cromatina (*ASXL1*, *EZH2*) e splicing de

RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) (MUGHAL *et al.*, 2015). Ainda não foi identificada mutação específica do grupo SMD/NMP; exceto na LMMJ, causada por mutações em genes da via RAS. Portanto, o diagnóstico da SMD/NMP depende da estreita correlação entre dados clínicos e achados morfológicos com o apoio de testes moleculares; sempre que estiverem disponíveis (SANGIORGIO *et al.*, 2020).

## 2.5 VIAS CELULARES AFETADAS NAS NEOPLASIAS MIELOIDES

Estudos demonstram semelhanças genéticas entre as doenças morfológicamente tão distintas que constituem o grupo das NMs, sobretudo pela presença de mutações recorrentes afetando vias celulares agrupadas em categorias funcionais: (1) *splicing* de RNA, (2) transcrição, (3) regulação do ciclo celular, (4) regulação da metilação do DNA, (5) regulação da modificação de histonas, (6) sinalização celular e (7) complexo coesina (MATYNIA *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2017) (Figura 4). O conhecimento a respeito destas vias é de grande relevância, pois estas são alvos importantes para o desenvolvimento de terapias.

**Figura 4 – Genes comumente mutados nas NMs e vias celulares**



A presença de mutações somáticas recorrentes afetando diferentes vias celulares caracterizam as NMs (modificado de MATYNIA *et al.*, 2015).



**(1) Splicing de RNA:** Mutações em genes que codificam fatores de splicing de RNA estão entre as anormalidades genéticas mais frequentes em pacientes com todas as formas de NMs e vários tipos de distúrbios linfoproliferativos, indicando a relevância do splicing aberrante de RNA no desenvolvimento de condições hematopoiéticas clonais. O splicing de RNA é um processo enzimático pelo qual segmentos do RNA mensageiro precursor (pré-mRNA) são removidos, enquanto as extremidades restantes do RNA são ligadas, gerando sequências de RNA maduras. A grande maioria dos genes no genoma humano sofre splicing alternativo, sendo traduzidos em proteínas a partir de um único gene (MATYNIA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2021). Mutações em fatores de splicing de RNA causam alterações de splicing em todo o genoma, afetando importantes reguladores da hematopoese. Isoformas de mRNA originadas por fatores de *splicing* mutantes, podem por exemplo, abrigar um códon de terminação prematuro (RAHMAN *et al.*, 2020).

**(2) Regulação da transcrição:** A transcrição é um processo finamente regulado, que depende da formação de complexos proteína-DNA, chamados fatores de transcrição. Os fatores de transcrição de ligam a sequências específicas de DNA adjacentes aos genes que eles regulam, ativando ou bloqueando o recrutamento das RNAs polimerases, e conseqüentemente, a transcrição. Esta atividade regulatória controla a formação dos transcritos de RNA mensageiro (mRNA) (MATYNIA *et al.*, 2015). Os fatores de transcrição contribuem para a manutenção das células-tronco, diferenciação e maturação celular das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Mutações, translocações ou expressão aberrante dos fatores de transcrição podem levar à transformação maligna das células hematopoiéticas (TAKEI *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2021).

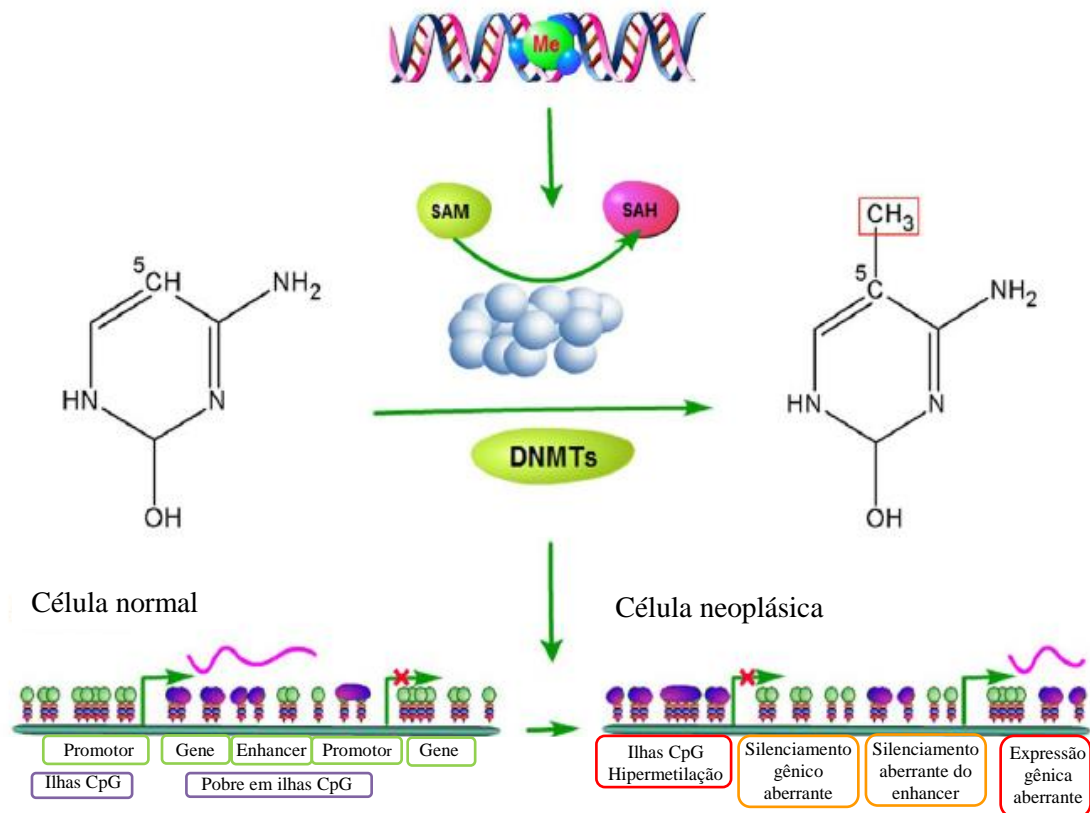
**(3) Regulação do ciclo celular:** A regulação do ciclo celular para a homeostase dos tecidos, e desta forma, mutações em genes que codificam proteínas envolvidas neste processo são encontradas nas neoplasias, incluindo as NMs. O *TP53* é o gene mais frequentemente mutado nos cânceres humanos. A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, é um supressor tumoral envolvido na resposta a danos ao DNA, estresse oxidativo e hiperproliferação celular (BOETTCHER *et al.*, 2019). A p53 ativada liga-se ao DNA e ativa vários genes, induzindo assim a parada do ciclo celular. A maioria das mutações no gene *TP53* ocorre no domínio de ligação ao DNA, abolindo a função da p53 selvagem, resultando maior sobrevivência celular, proliferação, migração e invasão (WELCH, 2018). O *NPM1* desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular e apoptose potencializando a resposta da p53 ao estresse. Há uma

ligação funcional entre integridade nucleolar e estabilidade de p53. NPM1 modula a resposta ao estresse interagindo diretamente com p53, estabilizando-o no nucleoplasma, promovendo parada de crescimento celular. Para manter a estabilidade genômica, NPM1 atua regulando a duplicação do centrôssomo durante o ciclo celular. Na fase de repouso, NPM1 liga-se aos centrôssomos não duplicados no citoplasma, garantindo a coordenação com a replicação do DNA e a duplicação do centrôssomo uma vez por ciclo celular (HEATH *et al.*, 2017).

**(4) Metilação do DNA:** A metilação do DNA (metilação das ilhas CpG) exerce um papel importante na diferenciação normal e proliferação das células-tronco hematopoiéticas. É um evento epigenético envolvido na regulação da expressão gênica. Já está bem estabelecido o envolvimento da metilação aberrante do DNA na patogênese de diversos cânceres, incluindo as NMs. A metilação do DNA controla a expressão gênica pela adição de um grupamento metil (CH<sub>3</sub>) na citosina que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeos CpG) pela ação de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), presente principalmente em regiões promotoras dos genes; impedindo a ligação de fatores de transcrição ao gene. O DNA metilado resulta no recrutamento de proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina, levando à formação de uma compacta e inativa heterocromatina (Figura 5). Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões chamadas ilhas CpG. Dentre os genes comumente mutados nesse grupo funcional destacam-se *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A* e *TET2*. A metilação aberrante do DNA pode ser revertida, e por isto tornou-se um alvo terapêutico importante (BENETATOS *et al.*, 2018; BLECUA *et al.*, 2020).

**(5) Modificação de histonas:** As histonas estão envolvidas na organização do DNA em regiões de euromatina ativa e heterocromatina inativa. Modificações pós-traducionais das histonas, como acetilação, metilação e ubiquitinação, alteram a compactação e estabilidade da cromatina. Estas modificações afetam o recrutamento de proteínas regulatórias, tais como os fatores de transcrição. A acetilação da lisina de histonas (H3K9, H3K9, H3K18 e H3K27) está associada com cromatina aberta e transcrição ativa. A metilação de histonas pode ativar (H3K4, H3K36 e H3K79) ou reprimir (H3K9, H3K27 e H4K20) a transcrição (MEDINA *et al.*, 2022). O gene *ASXL1* codifica uma proteína de ligação a cromatina que regula a expressão gênica por meio do complexo repressivo *polycomb 2* (PRC2). Mutações em *ASXL1* geralmente resultam em uma proteína truncada e perda da trimetilação da histona H3K27 mediada por PRC2 (PATEL *et al.*, 2017; MEDINA *et al.*, 2022).

**Figura 5 – Metilação do DNA e desregulação do genoma afetadas**

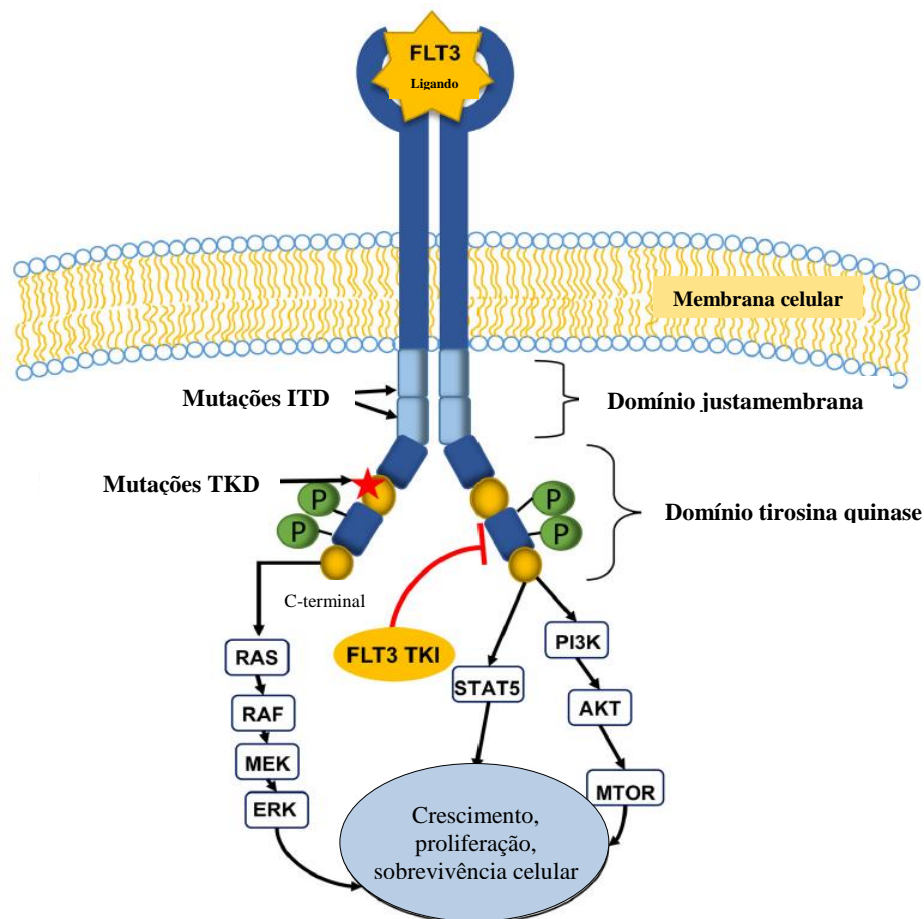


A metilação das citosinas nos dinucleotídeos CpG é catalisada por DNMTs. Nas células normais, ilhas CpG são associadas aos promotores dos genes e são resistentes à metilação do DNA. No entanto, as regiões pobres em ilhas CpG (exceto os enhancers), são tipicamente silenciadas por metilação. Nas células neoplásicas, as ilhas CpG estão propensas a hipermetilação, levando ao silenciamento gênico. A hipometilação de regiões intergênicas e promotores pobres em CpG contribuem para a instabilidade genômica e a expressão gênica aberrante. SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenohomocisteína. Círculo verde, CpG não metilado; círculo roxo, CpG metilado (modificado de LI *et al.*, 2017).

(6) **Sinalização celular:** A habilidade de resposta das células a estímulos fisiológicos diversos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, hormônios e à presença de patógenos é mediada pela interação de ligantes específicos aos seus receptores na superfície das células. A ligação de ligantes usualmente resulta em dimerização do receptor e ativação de tirosina quinases. A propagação do sinal da superfície celular para o núcleo envolve a formação de complexos macromoleculares e a ativação ou inativação de diversas enzimas. O resultado desta propagação de sinal é a modulação de expressão gênica, resultado em uma resposta celular. Nas células normais, este processo é finamente regulado devido ao envolvimento de sinais negativos ou inibitórios. Nas células tumorais, esse processo é perturbado por mutações gênicas que transmitem ativação inadequada da função enzimática. (MATYNIA *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2017). O gene *FLT3* codifica um receptor tirosina quinase expresso nas células

precursoras hematopoiéticas. Seu ligante, o FLT3 ligante (FL), induz a dimerização e ativação de sua atividade de tirosina quinase. A ativação do FLT3 leva à sua autofosforilação e ao início de várias cascatas de transdução de sinal. A sinalização é iniciada pelo recrutamento de moléculas de transdução de sinal através da ligação a resíduos de tirosina fosforilados específicos à região intracelular do FLT3. A ativação de FLT3 está associada à sobrevivência celular, proliferação e a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas (STIREWALT e RADICH, 2003). Ele atua em sinergia com outras proteínas para promover seus efeitos biológicos. Mutações em *FLT3* levam à sua ativação constitutiva e ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular, principalmente STAT5, MAPK e AKT, levando à proliferação celular e anti-apoptose (Figura 6) (DÖHNER *et al.*, 2017; KAZI e RÖNNSTRAND, 2019).

**Figura 6 – Receptor FLT3**



Após ligação do ligante o receptor FLT3 dimeriza e sofre mudança conformacional permitindo auto-fosforilação do receptor e ativação do mesmo. A ativação do receptor leva ao aumento da proliferação celular, redução da apoptose e diferenciação das células hematopoiéticas via cascatas de sinalização PI3K /AKT, MAPK / ERK e STAT (modificado de WEIS *et al.*, 2019).

(7) **Complexo coesina:** A coesina é um complexo proteico multimérico que consiste em quatro subunidades centrais (SMC1A, SMC3, RAD21, STAG2) que formam uma estrutura semelhante a um anel em torno do DNA. Este complexo regula a coesão das cromátides irmãs durante a divisão celular, reparo do DNA pós-replicação e a expressão gênica global (MATYNIA *et al.*, 2015, JANN e TOTHOVAZ, 2021). Estudos sugerem que as mutações da coesina observadas nas NMs levam ao desenvolvimento de um fenótipo semelhante ao das células-tronco, diferenciação hematopoiética prejudicada e progressão leucêmica. Os mecanismos pelos quais as mutações da coesina desencadeiam a expansão clonal e a progressão da doença ainda são pouco compreendidos (JANN e TOTHOVAZ, 2021).

## 2.6 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Os testes moleculares de rotina na investigação das NMs envolvem a triagem de vários genes de relevância para o diagnóstico, prognóstico e terapia. Isto implica na realização de um screening multigene utilizando diferentes metodologias, como o sequenciamento Sanger, reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (qPCR), transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), análise de fragmentos por eletroforese capilar, entre outras. Desta forma, a coordenação dos resultados de várias plataformas visando um diagnóstico integrado é um desafio.

Quase 25 anos após a descoberta da estrutura do DNA, foi desenvolvido o primeiro método de sequenciamento do DNA (HU *et al.*, 2021). O sequenciamento Sanger, desenvolvido em 1977 (SANGER *et al.*, 1977), consiste na conversão de uma molécula de DNA alvo em fita simples a ser utilizada como molde para síntese de fragmentos complementares a partir da adição nucleotídeos marcados. Estes fragmentos são separados por tamanho e analisados por eletroforese para determinar a sequência da região alvo. Denominado sequenciamento de “primeira geração”, o sequenciamento Sanger é uma metodologia limitada por seu baixo rendimento e alto custo (HU *et al.*, 2021). Na última década, os avanços nas tecnologias de sequenciamento revolucionaram a pesquisa em genômica (YIN *et al.*, 2021). O sequenciamento massivo paralelo (MPS, Massively Parallel Sequencing), mais comumente denominado sequenciamento de nova geração (NGS, Next-Generation Sequencing) ou sequenciamento de “segunda geração”, refere-se a um grupo de tecnologias capazes de sequenciar de forma massiva e simultânea milhões de fragmentos clonais curtos de DNA (~200 pb); associado a ferramentas de paralelização, automação e análise de dados, resultando em um aumento dramático na produção de dados de

sequenciamento (SABOUR *et al.*, 2017, SHAHSIAH *et al.*, 2017). O desenvolvimento do NGS possibilitou uma abordagem ampla nos estudos do genoma humano, incluindo sequenciamento completo do genoma, exoma e transcriptoma. No entanto, painéis multigenes são opções práticas na investigação de variantes genéticas (germinativas e somáticas); sendo o tipo de análise de NGS mais comumente usada na investigação genética das neoplasias. Estes painéis permitem a detecção simultânea de diferentes tipos de variantes, como: variantes de nucleotídeo único (SNVs), pequenas deleções e inserções (indels), alterações no número de cópias (CNVs) e fusões gênicas (JENNINGS *et al.*, 2017). Os painéis de NGS podem ser customizados para cobrir um ou mais genes completos, um ou mais éxons e/ou variantes específicas de determinados genes (*hotspots*).

O fluxo de execução de um protocolo de NGS é composto por três etapas: construção de biblioteca, enriquecimento das regiões alvo e sequenciamento. A construção da biblioteca refere-se ao processo de preparação do DNA e/ou RNA para o sequenciamento. Embora diferentes métodos de preparo de biblioteca estejam disponíveis, todos eles resultam na quebra do DNA em diferentes fragmentos e adição de adaptadores nas extremidades dos mesmos. Além dos adaptadores, são adicionados “códigos de barras moleculares” que permitem a combinação e sequenciamento de diferentes bibliotecas em uma mesma corrida. O enriquecimento pode ser realizado por hibridização com sequências complementares às regiões alvo (enriquecimento por captura) ou por amplificação (PCR). O enriquecimento por PCR é uma etapa combinada com a preparação de biblioteca, utilizando primers que selecionam as regiões de interesse. As duas principais plataformas de sequenciamento disponíveis empregam os métodos de sequenciamento por síntese (plataforma Illumina) e o sequenciamento baseado em semicondutores (Ion Torrent, ThermoFisher). Após a preparação da biblioteca, tanto o sequenciamento por síntese quanto por semicondutor exige a mobilização e amplificação clonal das bibliotecas a fim de gerar sinal suficiente para detecção pelo sequenciador (YIN *et al.*, 2021). A tecnologia Ion Torrent emprega uma emulsão de esferas para imobilização e amplificação clonal (PCR em emulsão), enquanto os sequenciadores Illumina utilizam uma *flow cell*. A *flow cell* e as esferas contêm sequências que hibridizam com parte dos adaptadores previamente ligados aos fragmentos de DNA na etapa de construção de biblioteca (YOHE *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2021).

A pesquisa de variantes somáticas necessita de uma maior profundidade de cobertura (capacidade de gerar várias leituras de um mesmo fragmento) das regiões sequenciadas, uma vez que estas variantes podem estar presentes em frequências alélicas baixas. As melhorias

nas tecnologias de sequenciamento proporcionaram redução no tempo e custo por amostra e aumento na profundidade de cobertura das regiões sequenciadas.

A utilização de um painel de NGS para análise confiável de amostras clínicas requer a avaliação do desempenho do mesmo. O Colégio Americano de Patologistas e a Associação de Patologia Molecular publicaram recomendações para validação de painéis de NGS em oncologia (JENNINGS *et al.*, 2017). A validação de painéis NGS para detecção de variantes somáticas requer pelo menos a avaliação da sensibilidade e especificidade do ensaio, reprodutibilidade/repetibilidade e limite de detecção (LOD). Nesta etapa de validação devem ser incluídas amostras referências e/ou controles comerciais contendo variantes diferentes, com frequências dos alelos variantes (VAF) conhecidas (JENNINGS *et al.*, 2017, PARK *et al.*, 2020).

A tecnologia NGS está agora separada em sequenciamento de “segunda geração” e sequenciamento de “terceira geração”. O sequenciamento de segunda geração refere-se às estratégias de alinhamento de leituras curtas (*reads* curtas), ou seja, para sequenciar longos trechos de DNA, as leituras precisam de montadas. Isto é um desafio para a identificação de variantes estruturais ou regiões de baixa complexidade (SABOUR *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2021). O sequenciamento de “terceira geração” refere-se ao sequenciamento baseado em uma única molécula de DNA (SABOUR *et al.*, 2017). Plataformas como a Pacific Biosciences (PacBio) ou Oxford Nanopore podem gerar leituras de comprimento maior que 10 kb, bem superior ao sequenciamento Sanger e ao sequenciamento de segunda geração. Estas tecnologias de leituras longas (*reads* longas) podem superar problemas no sequenciamento de regiões de baixa complexidade e a detecção de variantes estruturais (HU *et al.*, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Validar um painel multigênico de NGS e pesquisar variantes somáticas e fusões gênicas em pacientes com diagnóstico de neoplasias mieloides e relacionar com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Validar o painel Oncomine™ Myeloid para avaliação em pacientes com NMs;
- Pesquisar variantes de DNA, fusões gênicas e realizar análise de expressão gênica em pacientes com diagnóstico de NM pela metodologia de NGS utilizando o painel Oncomine™ Myeloid;
- Comparar as subcategorias de NMs quanto ao tipo e número de variantes observadas;
- Relacionar as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com os resultados obtidos;
- Calcular o escore prognóstico para os pacientes com SMD utilizando a calculadora IPSS molecular (IPSS-M);
- Determinar curvas de sobrevida considerando cada doença.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Estudo desenvolvido por meio de uma parceria entre o Laboratório de Hematologia Clínica e Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG e o setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Pardini.

### **4.1 Casuística**

Foi realizado um estudo prospectivo observacional do qual participaram 34 pacientes (idade maior ou igual a 18 anos) com diagnóstico de neoplasia mieloide atendidos no ambulatório Borges da Costa do Hospital das Clínicas da UFMG, entre novembro de 2019 a outubro de 2021. O diagnóstico de neoplasia mieloide foi estabelecido de acordo com os critérios de classificação revisados pela Organização Mundial da Saúde em 2016. Este estudo consiste em um subprojeto de um projeto maior registrado na Plataforma Brasil, CAAE – 02177612.0.0000.5149 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), sob número 34778, emenda 2015 número 1.030.401.

#### **4.1.1 Critérios de elegibilidade**

- Critérios de inclusão: foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de neoplasia mieloide e idade maior ou igual a 18 anos.
- Critérios de não inclusão: foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes com diagnóstico de neoplasias hematológicas não mieloides. Idade inferior a 18 anos.

#### **4.1.2 Fontes de informação**

Os prontuários dos pacientes foram utilizados para coleta de informações como idade, sexo, diagnóstico, histórico clínico, resultados de exames laboratoriais, evolução e desfecho. Quanto aos exames laboratoriais, foram coletados resultados de hemograma, mielograma, citogenética e testes moleculares.

### **4.2 Amostras biológicas**

Foram coletados de 2,0 a 5,0 mL de sangue periférico, em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (Vacutainer<sup>®</sup>, BD Diagnostics, EUA). As amostras de medula óssea foram coletadas por profissional médico no momento da coleta de amostra para exames de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Estas amostras foram coletadas em seringa e transferidas para tubo à vácuo (Vacutainer<sup>®</sup>, BD Diagnostics, EUA). Entre 2,0 a 5,0 mL do aspirado de medula óssea foram transferidos para tubos

contendo anticoagulante EDTA e separados para utilização neste estudo. As amostras foram mantidas refrigeradas até a execução da extração de DNA e RNA.

### 4.3 Controles comerciais

Para avaliação da performance do ensaio OncoPrint Myeloid foram utilizados os controles comerciais Seraseq™ Myeloid Mutation DNA Mix (SeraCare®, EUA) e Seraseq™ Myeloid Fusion RNA Mix (SeraCare®, EUA), ambos na concentração de 15 ng/μL. O controle de DNA é composto por 23 variantes (indels e SNVs) com frequências alélicas conhecidas (Tabela 10).

**Tabela 10 – Variantes de DNA do controle Seraseq™ Myeloid Mutation DNA Mix**

Genes	Variantes	VAF esperada
<i>ABL1</i>	c.944C>T	10%
<i>ASXL1</i>	c.1900_1922del23	10%
<i>ASXL1</i>	c.1934_1935insG	10%
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	10%
<i>CALR</i>	c.1092_1143del52	5%
<i>CBL</i>	c.1139T>C	10%
<i>CBL</i>	c.1259G>A	10%
<i>CEBPA</i>	c.939_940insAAG	15%
<i>CEBPA</i>	c.68_69insC	15%
<i>CSF3R</i>	c.1853C>T	5%
<i>FLT3</i>	dup chr13:28,608,250-28,608,277	10%
<i>FLT3</i>	c.2503G>T	10%
<i>FLT3</i>	c.1759_1800dup	5%
<i>IDH1</i>	c.394C>T	5%
<i>JAK2</i>	c.1624_1629delAATGAA	10%
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	5%
<i>MPL</i>	c.1544G>T	5%
<i>MYD88</i>	c.794T>C	10%
<i>NPM1</i>	c.863_864insTCTG	5%
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	5%
<i>SF3B1</i>	c.1998G>T	5%
<i>SRSF2</i>	c.284_307del24	5%
<i>U2AF1</i>	c.101C>T	10%

VAF, frequência do alelo variante; del, deleção; ins, inserção; dup, duplicação; chr, cromossomo.

De acordo com informação no manual do painel, o mesmo não detecta três variantes do controle comercial de DNA: *ASXLI* c.1900\_1922del23, *ASXLI* c. 1934\_1935insG e *CEBPA* c.68\_69insC. Tratam-se de variantes de relevância para SMD e LMA, localizadas em regiões com sequências repetitivas de um mesmo nucleotídeo (homopolímeros no gene *ASXLI*) e regiões ricas em sequências GC (gene *CEBPA*). Desta forma, estas variantes foram desconsideradas na avaliação de performance do painel. O controle de RNA é composto por nove fusões gênicas conhecidas e cobertas pelo painel (Tabela 11).

**Tabela 11 – Variantes de RNA do controle Seraseq™ Myeloid Fusion RNA Mix**

Fusões	Isoformas detectadas pelo painel
<i>MYST3::CREBBP</i>	<i>KAT6A::CREBBP.K17C2</i>
<i>ETV6::ABL1</i> (transcrito 1)	<i>ETV6::ABL1.E4A2</i>
<i>ETV6::ABL1</i> (transcrito 2)	<i>ETV6::ABL1.E5A2</i>
<i>PCMI::JAK2</i>	<i>PCMI::JAK2.P23J12.COSF1001</i>
<i>FIPIL1::PDGRFA</i>	<i>FIPIL1::PDGFRA.F11P12del45</i>
<i>TCF3::PBX1</i>	<i>TCF::PBX1.T16P3.COSF1489</i>
<i>BCR::ABL1</i>	<i>BCR::ABL1.B14A2.1</i>
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	<i>RUNX1::RUNX1T1.R3R3</i>
<i>PML::RARA</i>	<i>PML::RARA.P6del11ins133A3</i>

del, deleção; ins, inserção.

Foram preparadas bibliotecas de controles (DNA e RNA) em triplicata no mesmo dia, e sequenciadas na mesma corrida. Adicionalmente, foram preparadas três bibliotecas de controles (DNA e RNA) em dias diferentes, sequenciadas em corridas diferentes. Todas as bibliotecas foram preparadas utilizando os mesmos equipamentos e sequenciadas em um mesmo sequenciador. Os controles de DNA e RNA foram previamente diluídos em água ultrapura para as concentrações de 1,48 ng/μL e 2,5 ng/μL, respectivamente.

#### 4.4 Extração e quantificação de ácidos nucleicos

O DNA genômico e RNA total foram extraídos utilizando o kit All Prep DNA/RNA QIAamp® Mini Kit (QIAGEN). Trata-se de um kit para extração simultânea de DNA genômico e RNA total a partir de uma única amostra. As amostras foram equilibradas a temperatura ambiente (15 a 25°C) e transferidas para um tubo cônico tipo de 14 mL. Foi acrescentada à amostra um volume de solução de lise de hemácias até completar 13 mL,

seguido de incubação por 5 minutos, centrifugação a 500g por 6 minutos e descarte do sobrenadante. Esta incubação com solução de lise foi repetida uma vez. Posteriormente, o pellet de células foi homogeneizado em 10 mL de solução PBS e centrifugado a 500g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado até o volume de 1 mL. A partir deste volume foi realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. A extração de DNA e RNA foi realizada a partir de 4 a 5 milhões de células conforme recomendações do fabricante.

As amostras de DNA e RNA foram quantificadas em fluorômetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific), utilizando os kits Qubit 1X dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific) e Qubit RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. A pureza das amostras de DNA e RNA foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C e as amostras de RNA em freezer a -80°C.

#### 4.5 Painel Oncomine™ Myeloid Research Assay

O painel Oncomine™ Myeloid Research Assay (OMA) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) é um painel comercial desenhado para interrogar 40 genes alvos em amostra de DNA, sendo 23 mutações pontuais (*hotspot*) e 17 genes completos; e fusões gênicas envolvendo 29 genes *drivers*. Além disso, pode ser avaliada a expressão dos genes *BAALC*, *MECOM*, *MYC*, *SMCIA* e *WT1*, em relação à expressão de cinco genes controles (Tabela 12). Para a pesquisa de fusões gênicas e a análise de expressão são utilizadas amostras de RNA. O painel completo é composto por três *pools* de primers, sendo dois *pools* de DNA e um *pool* de RNA.

#### 4.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Bibliotecas de DNA e RNA preparadas a partir de 34 amostras clínicas e dos controles comerciais (DNA e RNA) foram sequenciados na plataforma Ion S5™ (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. A **Figura 7** resume o fluxo de trabalho do painel Oncomine™ Myeloid Research Assay (OMA; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

O RNA total foi submetido a reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. O DNA genômico e o cDNA foram amplificados para as regiões de interesse investigadas no painel. Os amplicons foram parcialmente digeridos, seguido da ligação de adaptadores em ambas as extremidades. As bibliotecas foram purificadas através de *beads* magnéticas, quantificadas por PCR em tempo real (qPCR), diluídas a 25 picomolar e combinadas de

maneira equimolar na proporção de 80:20 (DNA:RNA). Em seguida, as bibliotecas foram amplificadas por PCR em emulsão e carregadas nos chips de sequenciamento. A PCR em emulsão e o carregamento dos chips foram realizados de forma automatizada no Ion Chef™.

**Tabela 12 – Lista de genes alvo do painel**

<b>Genes hot spots</b>	<b>Genes completos</b>	<b>Genes de fusão</b>	<b>Expressão</b>
<i>ABL1</i> (4-9)	<i>ASXL1</i>	<i>ABL1</i>	<i>BAALC</i>
<i>BRAF</i> (1-4, 6,8, 11, 15, 17, 18)	<i>BCOR</i>	<i>ALK</i>	<i>MECOM</i>
<i>CBL</i> (8,9)	<i>CALR</i>	<i>BCL2</i>	<i>MYC</i>
<i>CSF3R</i> (14, 17, 18)	<i>CEBPA</i>	<i>BRAF</i>	<i>SMC1A</i>
<i>DNMT3A</i> (11-23)	<i>ETV6</i>	<i>CCND1</i>	<i>WT1</i>
<i>FLT3</i> (8, 11, 13-16, 20, 23, 24)	<i>EZH2</i>	<i>CREBBP</i>	
<i>GATA2</i> (4,5)	<i>IKZF1</i>	<i>EGFR</i>	
<i>HRAS</i> (2,3)	<i>NF1</i>	<i>ETV6</i>	<b>Controles*</b>
<i>IDH1</i> (4)	<i>PHF6</i>	<i>FGFR1</i>	<i>EIF2B1</i>
<i>IDH2</i> (4)	<i>PRPF8</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FBXW2</i>
<i>JAK2</i> (12-15)	<i>RB1</i>	<i>FUS</i>	<i>PSMB2</i>
<i>KRAS</i> (1,2, 8-11, 13, 17)	<i>RUNX1</i>	<i>HMGA2</i>	<i>PUM1</i>
<i>KIT</i> (1,2, 8-11, 13, 17)	<i>SH2B3</i>	<i>JAK2</i>	<i>TRIM27</i>
<i>MPL</i> (3, 4, 10, 12)	<i>STAG2</i>	<i>KMT2A</i>	
<i>MYD88</i> (2-5)	<i>TET2</i>	<i>MECOM</i>	
<i>NPM1</i> (11)	<i>TP53</i>	<i>MET</i>	
<i>NRAS</i> (4)	<i>ZRSR2</i>	<i>MLLT3</i>	
<i>PTPN11</i> (3, 12, 13)		<i>MLLT10</i>	
<i>SETBP1</i> (4)		<i>MYBL1</i>	
<i>SF3B1</i> (14-21)		<i>MYH11</i>	
<i>SRSF2</i> (1)		<i>NTRK3</i>	
<i>U2AF1</i> (2, 6)		<i>NUP214</i>	
<i>WT1</i> (7, 9)		<i>PDGFRA</i>	
		<i>PDGFRB</i>	
		<i>RARA</i>	
		<i>RBM15</i>	
		<i>RUNX1</i>	
		<i>TCF3</i>	
		<i>TFE3</i>	

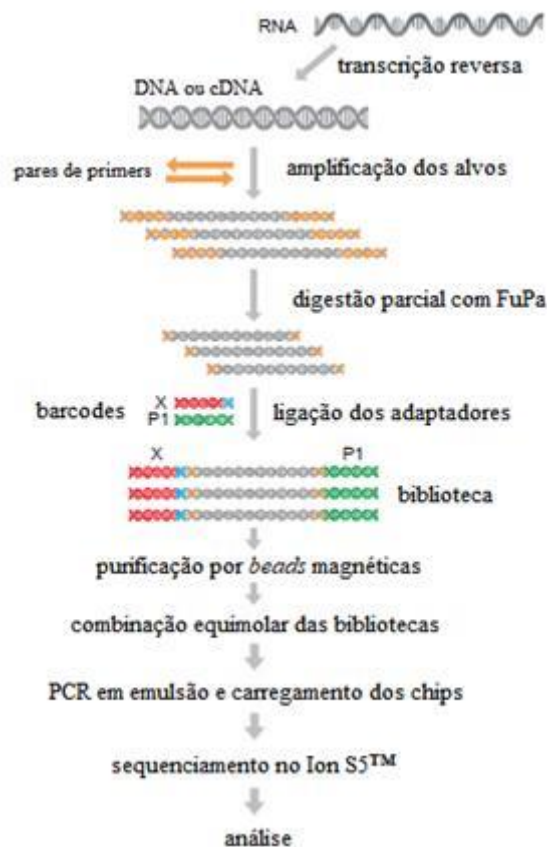
**Genes hot spots:** os números entre parênteses indicam os éxons cobertos pelo sequenciamento.

**\*Genes utilizados como controles de expressão, não relacionados a neoplasias hematológicas.**

#### 4.6.1 Síntese de cDNA

O RNA extraído das amostras clínicas e o controle Seraseq™ Myeloid Fusion RNA Mix foram previamente diluídos para a concentração de 2,5 ng/μL. Em seguida foram tratados com enzima DNase e submetidas a reação de transcrição reversa (RT-PCR) para síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific). As reações foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 50°C por 10 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific).

**Figura 7 – Fluxo de trabalho do painel Oncomine™ Myeloid Research**



Modificado de Oncomine Myeloid Research Assay User Guide, MAN0016113, revision G.0 (ThermoFisher Scientific).

#### 4.6.2 Construção de bibliotecas

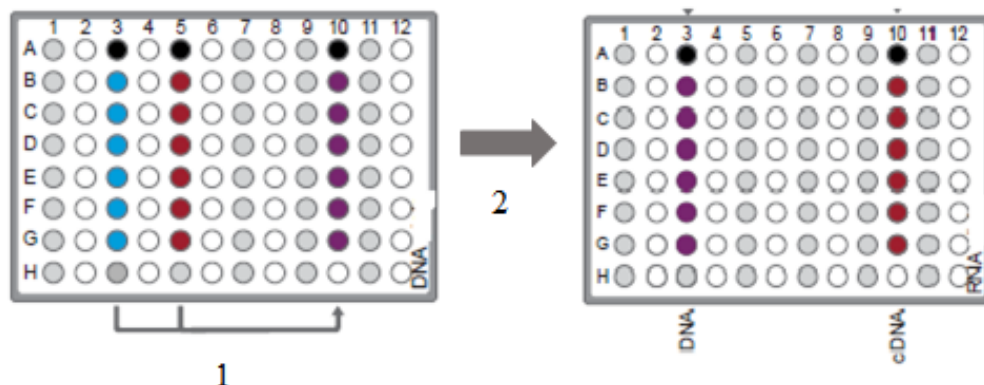
As bibliotecas foram construídas utilizando-se o kit Ion AmpliSeq™ Library Kit (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Além das bibliotecas de DNA e RNA das 34 amostras clínicas, também foram construídas bibliotecas dos controles

comerciais Seraseq™ Myeloid Mutation DNA Mix (SeraCare®, EUA) e Seraseq™ Myeloid Fusion RNA Mix (SeraCare®, EUA).

O DNA extraído das amostras clínicas e o controle Seraseq™ Myeloid Mutation DNA foram diluídos para uma concentração de 1,48 ng/μL. Para a construção das bibliotecas de DNA é necessário um input de 20 ng de amostra (10 ng/pool). Para a construção das bibliotecas de amostras e controle de RNA é necessário um input de 10 ng de amostra.

As reações de amplificação foram preparadas separadamente para cada pool de *primers*. Para amplificação do cDNA foram utilizados 4 μl do 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix, 4 μl do 5X Oncomine™ Myeloid RNA Panel (pool de primers das fusões e genes de expressão), 4 μl do cDNA para cada reação e 8 μl de água livre de nucleases completando um volume final de reação de 20 μl. As reações foram incubadas a 99°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 98°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Toda reação deve conter um branco de amostra, o NTC (*no template control*). Para cada amostra de DNA foi preparado um mix contendo 4,5 μl do 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix e 13,5 μl de DNA a 1,48 ng/μL para um volume final de reação de 18 μl. Para cada amostra este volume foi dividido em duas colunas da placa de PCR, sendo 8 μl para o pool 1 e 8 μl o pool 2. Em cada poço da coluna pool 1 foi adicionado 2 μl do pool 1 AmpliSeq™ Myeloid DNA Panel (pool de primers de DNA), e em cada poço da coluna pool 2 foram adicionados 2 μl do pool 2 AmpliSeq™ Myeloid DNA Panel (pool de primers de DNA), totalizando um volume final de 10 μl de reação por pool. Cada coluna deve conter um branco de amostra, o NTC (*no template control*). As reações foram incubadas a 99°C por 2 minutos, seguido de 13 ciclos de 99°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após amplificação, as reações dos pools 1 e 2 foram combinadas e transferidas para a mesma placa de reação do cDNA amplificado (Figura 8).

**Figura 8 – Esquema de combinação das amostras amplificadas**



(1) Combinação das reações dos pools 1 e 2 de DNA e (2) Transferência para a placa de cDNA.

Em seguida, os amplicons foram parcialmente digeridos com a adição de 2 µl da enzima FuPa, seguido de incubação a 50°C por 10 minutos, 55°C por 10 minutos e 60°C por 20 minutos. Para o sequenciamento de múltiplas bibliotecas simultaneamente, cada amostra deve ter uma identificação molecular diferente (barcode), para reconhecimento e análise individual. Para isto, 2 µl de barcodes Ion Xpress™ foram previamente diluídos em 2 µl do adaptador Ion P1 e 4 µl de água livre de nucleases. Após diluição dos barcodes, as reações de ligação dos adaptadores foram preparadas em um volume final de 30 µl, contendo 22 µl da reação de digestão, 4 µl de Switch Solution, 2 µl do barcode Ion Xpress™ (Thermo Fisher Scientific) de interesse diluído e 2 µl de DNA ligase. As amostras de DNA e RNA de mesmo paciente devem receber barcodes diferentes. A reação foi incubada a 22°C por 30 minutos, 68°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos. Todas as incubações foram realizadas em termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific). Após ligação dos barcodes e adaptadores, as bibliotecas foram purificadas com o uso de *beads* magnéticas. 45 µl de beads Agencourt™ AMPure™ XP (Beckman Coulter) foram adicionadas a reação. As amostras foram homogeneizadas por pipetagem e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. A placa foi então incubada em uma rack magnética DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Fisher Scientific) por 2 minutos ou até a solução ficar clara. Os sobrenadantes foram descartados e em seguida adicionados 150 µl de etanol 70% recém preparado. A placa foi movida na rack magnética em duas posições para lavagem das *beads*. O sobrenadante foi novamente descartado e um novo ciclo de lavagem foi realizado. As amostras permaneceram na rack magnética por 5 minutos para secagem. A placa foi retirada da rack magnética e foram adicionados 50 µl de solução Low TE para eluição das bibliotecas. A mistura foi homogeneizada por pipetagem e incubada a temperatura ambiente por, no mínimo 2 minutos, para dissolução completa das *beads* magnéticas. A placa foi novamente incubada na rack magnética por, no mínimo, 2 minutos. Aproximadamente 45 µl do eluato (biblioteca) foram transferidos para tubos de 1,5 mL e armazenados em freezer a -20°C para uso posterior.

#### **4.6.3 Quantificação das bibliotecas por PCR em Tempo Real**

As bibliotecas de DNA e RNA foram quantificadas por PCR em Tempo Real utilizando o kit Ion Library TaqMan® Quantitation (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. As bibliotecas de DNA e RNA foram diluídas a 1:100 e 1:1000, respectivamente. Foi preparada uma curva de diluição seriada a 1:10 a partir do controle de *Escherichia coli* DH10B na concentração inicial de 6,8 picomolar (pM). As reações de quantificação, incluindo o controle negativo (NTC), foram preparadas em triplicata, em



microplacas MicroAmp<sup>®</sup> Fast 96-Well de 0,1 mL (Thermo Fisher Scientific), com volume final de 20 µl, contendo 1X TaqMan<sup>®</sup> MasterMix, 1X Ion TaqMan<sup>®</sup> Assay e 9 µl das bibliotecas diluídas a 1:100 e 1:1000. As placas foram seladas com MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesine Film (Thermo Fisher Scientific) e as quantificações foram realizadas na plataforma Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) com a seguinte ciclagem: 50°C por 2 minutos, 95°C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Os dados das leituras da fluorescência (FAM) de cada amostra foram plotados a cada ciclo gerando um valor de Ct (*cycle threshold*). Os valores de Ct das bibliotecas foram interpolados contra os valores de Ct da curva-padrão através do cálculo da quantificação relativa. Baseado na quantificação de cada amostra, as bibliotecas de DNA e RNA foram diluídas para uma concentração final de 25 picomolar (pM).

#### 4.6.4 Combinação das bibliotecas e Sequenciamento

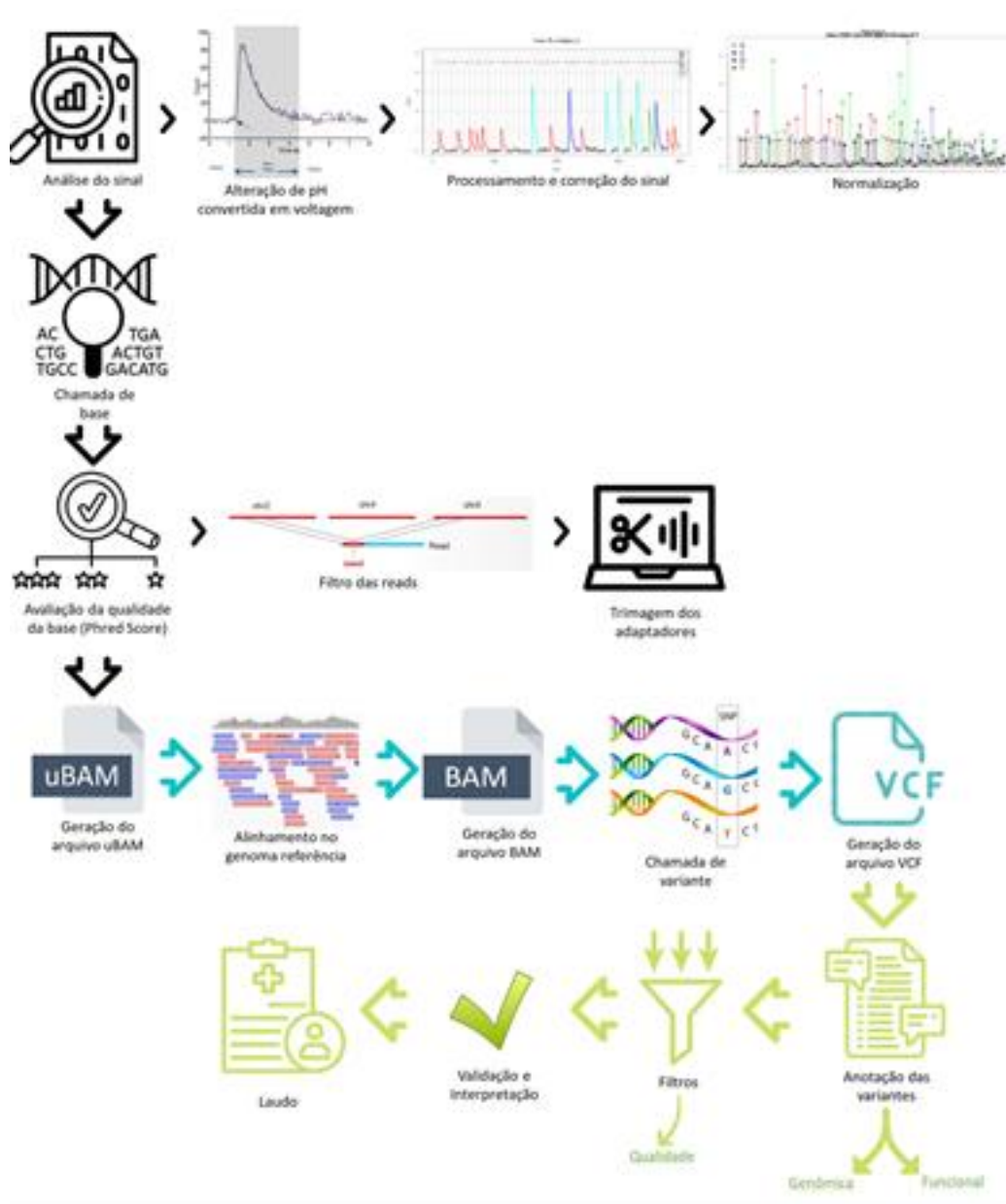
As bibliotecas de DNA e RNA de amostra foram combinadas na proporção de 80:20 (DNA:RNA) e divididas em dois *pools* para carregamento em dois chips. As bibliotecas foram carregadas em chips Ion 520<sup>™</sup> (quatro amostras) ou Ion 530<sup>™</sup> (12 amostras) (Thermo Fisher Scientific), respeitando a capacidade de cada um quanto ao número de amostras. Em cada chip foi incluída uma biblioteca da reação de branco (NTC, *no template control*). Cada *pool* foi submetido à amplificação por PCR em emulsão e carregamento nos *chips* Ion 520<sup>™</sup> ou Ion 530<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific) no equipamento Ion Chef<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific), utilizando o kit Ion 510<sup>™</sup> & Ion 520<sup>™</sup> & Ion 530<sup>™</sup> – Chef, conforme recomendações do fabricante. As corridas foram programadas usando o software Torrent Suíte versão 5.10.0 (Thermo Fisher Scientific). Após carregamento, os chips foram sequenciados na plataforma Ion S5<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante.

#### 4.6.5 Análise de bioinformática

Os dados brutos do sequenciamento foram gerados, coletados e processados usando a plataforma um *pipeline* específico da Plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). A Figura 9 resume as etapas de uma análise de bioinformática para NGS. O alinhamento de seqüências no genoma referência hg19 e a chamada de base foram realizadas pelo software Torrent Suíte 5.10.0 (Thermo Fisher Scientific). A identificação e anotação de variantes foram realizadas usando o software Ion Reporter 5.18.0 (Workflow, OncoPrint Myeloid Research-530-DNA and Fusions-Single Sample) (Thermo Fisher Scientific). Os dados de profundidade

de cobertura foram gerados usando o plugin coverageAnalysis versão 5.10.0 (Thermo Fisher Scientific). Para chamada de variantes *FLT3*-ITD foi utilizado o plugin Myeloid *FLT3* LongITD.

**Figura 9 – Visão geral do fluxo da análise de bioinformática para NGS**



A análise é subdividida em análise primária, secundária e terciária. A análise de dados primários consiste na detecção e análise de dados brutos. Então, na análise secundária, as *reads* são alinhadas contra o genoma referência e a chamada de variantes é realizada. A última etapa é a análise terciária, que inclui a anotação e filtragem das variantes, visualização de dados e geração de relatórios. BAM, binary alignment map; uBAM, unmapped BAM; VCF, variant call format.

Previamente à análise dos resultados do sequenciamento, foram avaliados parâmetros de qualidade para cada corrida de sequenciamento. Os valores esperados para estes parâmetros conforme preconizado pelo fabricante do painel estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1 – Parâmetros de qualidade de corrida para o painel Oncomine**

	<b>Parâmetros</b>	<b>Threshold (chips 520 e 530)</b>
<b>AMOSTRAS</b>	Carregamento do chip	>30%
	Total de <i>reads</i> (Chip 530)	15.000.000
	Total de <i>reads</i> (Chip 520)	4.000.000
	<i>Reads</i> usáveis	>30%
	Policlonalidade	≤30%
	Dímeros de primers	≤1%
	Leitura de baixa qualidade	≤20%
	Bases alinhadas na sequência referência	≥90%
	Acurácia bruta média por base em uma read	>99%
	Total de <i>reads</i> mapeadas (DNA)	>400.000
	Total de <i>reads</i> mapeadas no painel de fusões (RNA)	>5.000
	<i>Reads</i> mapeadas na região alvo	>90%
	Tamanho médio das <i>reads</i> (DNA)	>75 bp
	Tamanho médio das <i>reads</i> (RNA)	>60 bp
	Uniformidade	>80%
	Cobertura de bases alvo em 100x	>90%
Cobertura de bases alvo em 500x	>80%	
<b>NTC</b>	Profundidade média de cobertura (DNA)	>875
	Profundidade média de cobertura (DNA - NTC)	<30
	Tamanho médio das <i>reads</i> (DNA - NTC)	<75 bp
	Tamanho médio das <i>reads</i> (RNA - NTC)	<60 bp
	Total de <i>reads</i> mapeadas no painel de fusões (RNA - NTC)	<5.000

Os parâmetros para chamada de variantes do painel Oncomine Myeloid™ configurados no software de análise Ion Reporter estão descritos no Quadro 2. Todas as variantes detectadas foram conferidas individualmente utilizando o software IGV (Integrative Genomics Viwer) (<https://igv.org/>).

**Quadro 2 – Parâmetros para chamada de variantes do painel OncoPrint™**

<b>Parâmetros</b>		<b>Threshold</b>
<b>HOTSPOT</b>	Cobertura mínima por fita	2
	Phred score mínimo da variante	Q08
	Profundidade mínima de cobertura da região	15
	Frequência alélica mínima	3,0%
<b>SNV</b>	Cobertura mínima por fita	3
	Phred score mínimo da variante	Q10
	Profundidade mínima de cobertura da região	20
	Frequência alélica mínima	2,5%
<b>INDEL</b>	Cobertura mínima por fita	3
	Phred score mínimo da variante	Q30
	Profundidade mínima de cobertura	20
	Frequência alélica mínima	2,5%
<b>FUSÕES</b>	Mínimo de reads mapeadas no painel de fusão	>5.000
	Mínimo de reads contadas por alvo	20
	Mínimo de reads para fusões non-target	250
	Mínimo de reads para genes controles	15
	Mínimo de reads para genes de expressão	15
	Mínimo de reads para isoformas variantes	20

Phred score, medida da acurácia na identificação de uma base na análise de sequenciamento; Phred score Q08, probabilidade de 1 base errada a cada 10 identificadas; Phred score Q10, probabilidade de 1 base errada a cada 10 identificadas; Phred score Q30, probabilidade de 1 base errada a cada 1000 identificadas; fusões non-target, novas combinações de genes drivers e genes partners.

#### 4.7 Análises Estatísticas

Valores de média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo, e frequência foram utilizados na estatística descritiva dos dados. A distribuição das variáveis foi medida pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U foram utilizados na análise de dados quantitativos independentes não paramétricos. A análise de correlação de Spearman foi utilizada na análise de correlação. O método de Kaplan-Meier foi utilizado nas análises de sobrevida global e o teste de long-rank para as comparações entre os grupos. Os softwares GraphPad Prism 8.1.1 e R-Studio foram utilizados nas análises. O valor  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida em dois capítulos os quais representam uma possibilidade de organização dos resultados para escrita de dois artigos.

**Capítulo I:** Estudo de validação do painel Oncomine™ Myeloid para investigação de variantes somáticas nas neoplasias mieloides.

Este capítulo relata o processo de validação do painel Oncomine™ Myeloid para investigação de variantes de DNA (40 genes) e fusões gênicas (RNA) envolvendo 29 genes *drivers* de fusão. Este painel cobre um amplo espectro de genes relacionados às principais neoplasias mieloides. Neste contexto foram utilizados controles comerciais de DNA e RNA abrangendo variantes previamente caracterizadas e comumente associadas às neoplasias mieloides.

**Capítulo II:** Investigação de variantes somáticas nas neoplasias mieloides utilizando um painel de sequenciamento de nova geração.

Este capítulo apresenta os resultados de análises NGS utilizando um painel multigênico para investigação de variantes somáticas em amostras de 34 pacientes com diagnóstico de neoplasias mieloides, bem como seu impacto no desfecho clínico. O diagnóstico e avaliação de prognóstico nas neoplasias mieloides integram múltiplas abordagens clínicas e laboratoriais, dada a heterogeneidade clínica deste grupo de neoplasia hematológica. Estudos de genômica têm mostrado que as neoplasias mieloides também são caracterizadas pela heterogeneidade molecular, bem como seu impacto no diagnóstico e prognóstico.

## CAPÍTULO I

### ESTUDO DE VALIDAÇÃO DO PAINEL ONCOMINE™ MYELOID PARA INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES SOMÁTICAS NAS NEOPLASIAS MIELOIDES.

As neoplasias mieloides (NMs) são um grupo bastante heterogêneo de neoplasia hematológica, incluindo a leucemia mieloide aguda (LMA), a neoplasia mielodisplásica (SMD), a neoplasias mieloproliferativas (NMPs) e as neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. As NMs são caracterizadas pela presença de uma variedade de alterações citogenéticas e moleculares, que demandam a disponibilidade de diferentes técnicas laboratoriais e expressivo volume de amostra biológica para a investigação das mesmas. As classificações mais recentes da Organização Mundial da Saúde para as NMs têm estabelecido a importância das alterações citogenéticas e moleculares para o diagnóstico e prognóstico deste grupo de neoplasia hematológica (ARBER *et al.*, 2016; KHOURY *et al.*, 2022). Uma vez que as técnicas citogenéticas e moleculares convencionais são insuficientes para a investigação dos diversos tipos de variantes genéticas que caracterizam as NMs, os painéis de sequenciamento de nova geração (NGS) podem ser o método de escolha para uma investigação mais ampla destas variantes, a partir de uma única coleta de amostra. Dada a relevância que os painéis de NGS tem demonstrado para o diagnóstico, prognóstico e terapia para diversas neoplasias, associações importantes como a AMP (*Association for Molecular Pathology*) e CAP (*College of American Pathologists*) publicaram recomendações para a validação de painéis de NGS (JENNINGS *et al.*, 2017). Neste contexto, o presente estudo avaliou o desempenho analítico do painel OncoPrint Myeloid™ (ThermoFisher) para pesquisa de variantes em 40 genes (17 genes completos e 23 genes hotspot), juntamente com um painel de 29 genes *drivers* de fusão (e seus mais de 600 parceiros), abrangendo um amplo espectro de genes relacionados com as principais NMs.

#### 1 Parâmetros de qualidade das corridas

Considerando um total de 70 bibliotecas sequenciadas, as corridas apresentaram boa qualidade, com todos os parâmetros atendendo aos valores preconizados pelo fabricante do painel (Tabela 1). Esta análise incluiu todos os chips sequenciados, com bibliotecas preparadas a partir de amostras clínicas e controles comerciais. A porcentagem média de carregamento dos chips de aproximadamente 90%.

**Tabela 1 – Parâmetros gerais de qualidade das corridas**

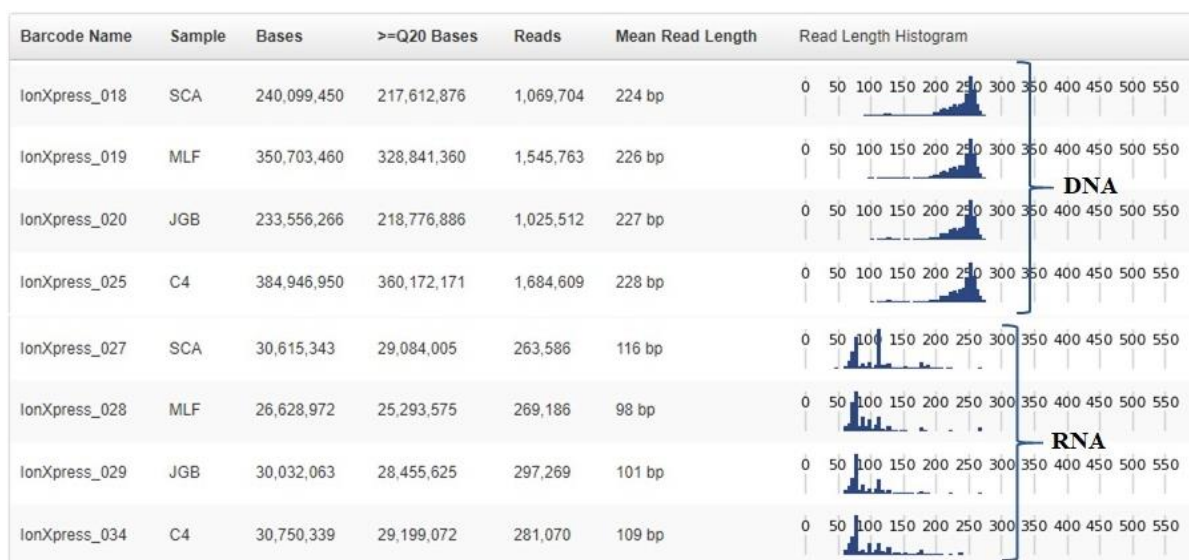
Chip	Tipo	Nº amostras	Nº total de <i>reads</i>	% <i>reads</i> usáveis	Policlonalidade (%)	% bases alinhadas na referência	Acurácia (%)
1	520	4	6.673.838	62	25	99,9	99,4
2	520	4	6.802.131	65	23	99,9	99,5
3	530	13	23.333.491	69	23	99,9	99,5
4	530	13	23.747.915	69	23	99,9	99,6
5	530	13	21.561.263	64	27	99,9	99,6
6	530	13	21.372.172	66	27	99,9	99,5
7	530	10	20.390.337	61	26	99,9	99,6

Todas as amostras apresentaram altas taxas de mapeamento total (mapeadas no genoma), profundidade de cobertura e uniformidade. Foram geradas em média 1,5 milhões de *reads* mapeadas por amostra, sendo 96,9% das sequências alinhadas com o painel. A profundidade média de cobertura por base foi de aproximadamente 3.000 vezes e por gene de aproximadamente 2.000 vezes. A uniformidade média de cobertura foi de 96,6% (Tabela 2).

**Tabela 2 – Parâmetros gerais de qualidade relacionados à cobertura**

Chip	Tipo	Nº amostras	Nº médio de <i>reads</i> mapeadas	% Média de <i>reads</i> mapeadas no painel	Profundidade média de cobertura	Uniformidade média (%)
1	520	4	1.315.665	97,32	2544	95,35
2	520	4	1.394.162	96,65	2642	95,89
3	530	13	1.613.244	97,27	3075	96,91
4	530	13	1.826.887	97,60	3551	97,14
5	530	13	1.537.385	97,50	2976	97,27
6	530	13	1.527.230	94,93	2899	97,35
7	530	10	1.778.200	96,70	3372	97,19

O tamanho das *reads* variou de 223 a 231 pb ( $227 \pm 2$  pb) para amostras de DNA e de 88 a 124 pb ( $104 \pm 7$  pb) para amostras de RNA, respectivamente. Estes perfis são compatíveis com o esperado para o painel mieloide, sendo indicativo da boa qualidade e integridade das amostras (Figura 1).

**Figura 1 – Perfil característico das amostras de DNA e RNA para o painel**

**Fonte: Software Torrent Suíte v.5.10.1.**

## **2 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia.**

A avaliação foi realizada considerando o sequenciamento de oito bibliotecas dos controles comerciais Seraseq (DNA e RNA). Para o ensaio de DNA as análises foram realizadas considerando 20 dentre as 23 variantes do controle comercial, sendo 13 variantes de nucleotídeo único (SNV) e sete indels. Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foram realizados considerando todas as variantes (global), apenas as variantes do tipo indels e apenas as indels hotspot (Tabela 3). Para o ensaio de RNA foi determinada apenas sensibilidade, pois não foi possível determinar o número de verdadeiros negativos. Todas as nove fusões gênicas do controle de RNA foram detectadas no sequenciamento das oito bibliotecas de RNA (72 verdadeiros positivos), ou seja, não houve falsos negativos. Isto equivale a uma sensibilidade de 100% para o ensaio de fusões gênicas. Não foram detectados falsos positivos nas análises de sequenciamento das bibliotecas de RNA.



**Tabela 3 – Valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia calculados para o painel Oncomine™ Myeloid.**

	Global	SNV	Indel	Indel hotspot
Sensibilidade = $VP/(VP+FN)$	98%	100%	95%	93%
Especificidade = $VN/(VN+FP)$	100%	100%	100%	100%
VPP = $VP/(VP + FP)$	94%	100%	84%	79%
VPN = $VN/(VN+FN)$	100%	100%	100%	100%
Acurácia = $VP+VN / Total$	100%	100%	100%	100%

**SNV, variante de nucleotídeo único; VP, verdadeiros positivos; VN, verdadeiros negativos; FP, falso positivos; FN, falso negativos.**

**VP: variantes do controle comercial chamadas pelo software Ion Reporter.**

**VN: corresponde a todas as regiões do arquivo bed target (*browser extensible data*) do painel exceto aquelas do controle comercial.**

**FP: variantes chamadas pelo Ion Reporter, mas não esperadas para o controle Seraseq.**

**FN: variantes do controle Seraseq não chamadas pelo software Ion Reporter.**

Os valores de sensibilidade e especificidade são semelhantes aos demonstrados em outros estudos com mesmo painel (LEVY *et al.*, 2019; FERRONE *et al.*, 2021).

Foram excluídas desta análise as variantes *CEBPA* c.68\_69insG, *ASXLI* c.1900\_1922del23 e *ASXLI* c.1934\_1935insG, não detectadas pelo painel, segundo informação do fabricante. Esta é uma limitação conhecida da tecnologia Ion Torrent para chamada no sequenciamento de regiões de longos homopolímeros, como acontece em algumas regiões do gene *ASXLI*. A variante *ASXLI* c.1934\_1935insG, por exemplo, é uma inserção de uma base guanina (G) em uma sequência de oito repetições desta base. Esta variante não foi detectada em nenhuma dentre as oito bibliotecas sequenciadas. Entretanto, a deleção *ASXLI* c.1900\_1922del23 foi detectada em seis dentre as oito bibliotecas sequenciadas. Os dados de sequenciamento destas bibliotecas também foram analisados nas versões 5.10 e 5.16. Na versão 5.16 do Ion repórter a variante *ASXLI* c.1900\_1922del23 também foi detectada em seis dentre as oito bibliotecas sequenciadas, mas a na versão 5.10 esta variante não foi detectada em nenhuma biblioteca. Isto indica uma melhoria no software de análise comparando os resultados das análises na versão 5.10 em relação às duas versões mais recentes do Ion Reporter. A variante *CEBPA* c.68\_69insG foi detectada em quatro dentre as oito bibliotecas sequenciadas. Trata-se de uma inserção de uma base guanina (G) em região rica em repetições de bases GC. O desenvolvimento de ensaios robustos para sequenciamento e detecção de variantes no gene *CEBPA* é dificultada pelo alto conteúdo de GC deste gene

(75% na região codificadora). Isto implica em desafios técnicos associados à amplificação das regiões alvo, assim como a identificação e chamada correta de variantes pelos softwares de análise (BEHDAD *et al.*, 2015).

### 3 Repetibilidade e reprodutibilidade do ensaio

Para avaliação da repetibilidade, bibliotecas dos controles Seraseq de DNA e RNA foram construídas em triplicada e sequenciadas no mesmo chip. A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada a partir da construção três bibliotecas dos controles Seraseq de DNA e RNA construídas em dias 3 diferentes e sequenciadas em chips diferentes. A construção das bibliotecas, amplificação clonal/carregamento do chip e o sequenciamento foram realizados nos mesmos equipamentos.

Todas as nove variantes do controle de RNA foram detectadas em triplicata, ou seja, apresentou 100% de repetibilidade e reprodutibilidade.

Para o ensaio do painel de DNA as análises basearam-se na frequência do alelo variante (VAF) de cada variante do controle Seraseq detectada, pelo menos em duplicata. Foram calculados a média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) para a VAF de cada variantes. Desta análise foram excluídas as três variantes do controle de detecção limitada (*CEBPA* c.68\_69insG, *ASXLI* c.1900\_1922del23 e *ASXLI* c.1934\_1935insG).

O ensaio de DNA apresentou 95% de repetibilidade, uma vez que 19 dentre as 20 variantes do controle foram detectadas em triplicata (Tabela 4). A variante *SRSF2* c.284\_307del24 foi detectada em duplicata. Além de tratar-se de uma deleção grande e com VAF no limite de detecção esperado para um ensaio de NGS (5%), a variante está localizada numa região rica em dinucleotídeos GC. Esta variante não passou pelos critérios de qualidade do filtro de chamada de variantes (indel hotspot) do software de análise. Na replicata C1 foi identificada uma desproporção dos alelos mutados entre as fitas forward e reverse. Existe uma proporção máxima esperada de alelos oriundos da mesma fita (Strand Bias). Para uma variante hotspot esse valor é 0,96 e a replicata C1, por exemplo, apresentou uma proporção de 0,99; valor superior ao máximo aceitável. Outra métrica relacionada ao viés de fita, é o Strand Bias Pval, que estima se o viés de fita é estatisticamente significativo contra a hipótese nula de não existir viés. Nesse caso, o valor mínimo esperado é 1 e a replicata C1 ficou abaixo com 0,049. Quando estes parâmetros atendem aos pontos de corte configurados no filtro de chamada de variantes, contribuem para a confiança de que uma determinada variante é real, sobretudo quando o VAF da mesma é baixa, como no caso da variante *SRSF2*

c.284\_307del24. Para os ensaios de repetibilidade os valores CV para a VAF variaram de 4,9 a 22,5%.

**Tabela 4 – Repetibilidade para variantes de DNA**

Genes	Variantes	VAF esperada	VAF_1	VAF_2	VAF_3	Média	DP	CV
<i>ABL1</i>	c.944C>T	10%	9,8	8,9	10,1	9,6	0,6	6,5
<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i> c.1799T>A	10%	9,1	10,3	10,0	9,8	0,6	6,4
<i>CALR</i>	c.1092_1143del52	5%	3,6	4,0	5,4	4,3	1,0	22,5
<i>CBL</i>	c.1139T>C	10%	9,0	9,9	9,3	9,4	0,5	4,9
<i>CBL</i>	c.1259G>A	10%	11,2	10,2	9,3	10,2	1,0	9,3
<i>CEBPA</i>	c.939_940insAAG	15%	14,8	13,8	11,4	13,4	1,8	13,2
<i>CSF3R</i>	c.1853C>T	5%	5,9	6,2	4,0	5,4	1,2	22,4
<i>FLT3</i>	dup chr13:28,608,250-28,608,277	10%	8,8	12,2	9,0	10,0	1,9	18,9
<i>FLT3</i>	c.2503G>T	10%	10,8	8,1	12,4	10,4	2,2	20,9
<i>FLT3</i>	c.1759_1800dup	5%	5,0	4,4	4,2	4,5	0,4	9,4
<i>IDH1</i>	c.394C>T	5%	4,8	4,9	4,1	4,6	0,5	10,1
<i>JAK2</i>	c.1624_1629delAATGAA	10%	7,1	7,6	6,6	7,1	0,5	7,1
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	5%	5,4	5,7	6,9	6,0	0,8	12,9
<i>MPL</i>	c.1544G>T	5%	5,5	4,3	5,3	5,0	0,6	12,7
<i>MYD88</i>	c.794T>C	10%	10,0	9,3	11,5	10,2	1,1	11,2
<i>NPM1</i>	c.863_864insTCTG	5%	5,3	4,2	5,0	4,9	0,6	11,9
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	5%	6,9	5,5	6,0	6,1	0,7	11,5
<i>SF3B1</i>	c.1998G>T	5%	4,5	4,6	5,4	4,8	0,5	10,9
<i>SRSF2</i>	c.284_307del24	5%	nd	8,1	7,4	7,8	0,5	6,0
<i>U2AF1</i>	c.101C>T	10%	7,9	7,5	6,4	7,3	0,8	10,6

chr, cromossomo; CV, coeficiente de variação para a VAF; del, deleção; dup, duplicação; ins, inserção; DP, desvio padrão para a VAF; VAF, frequência do alelo variante.

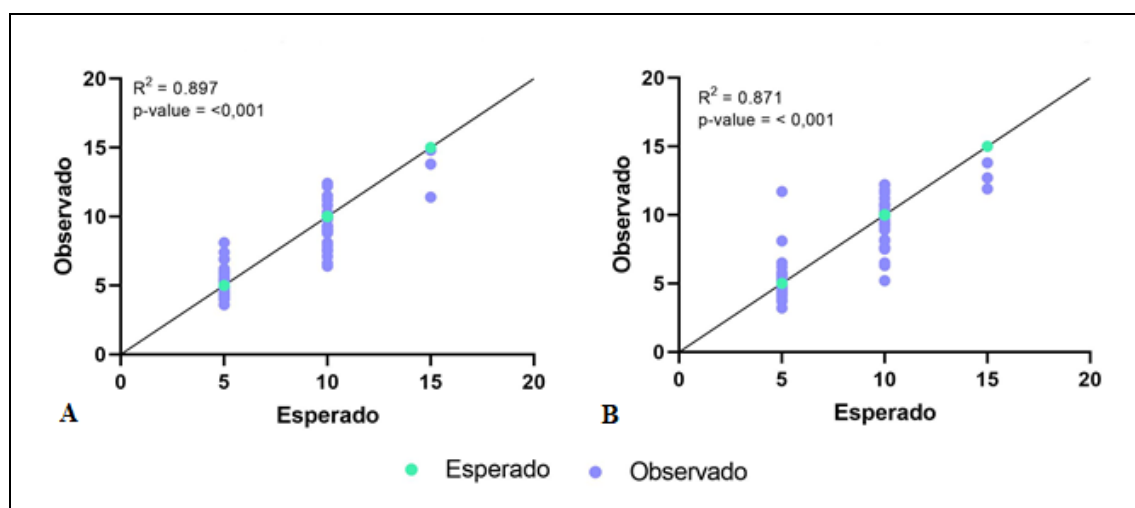
O ensaio de DNA apresentou 95% de reprodutibilidade, uma vez que 19 dentre as 20 variantes do controle foram detectadas em triplicata (Tabela 5). Os valores CV para a VAF variaram de 1,8 a 40,3%. Dentre as variantes com CV altos (>20%) destacam-se as variantes *CALR* c.1092\_1143del52, *FLT3* dup chr13:28,608,250-28,608,277 e *SRSF2* c.284\_307del24. A menor sensibilidade na detecção de grandes duplicações e deleções é um desafio conhecido para a técnica de NGS. A VAF observada para as simplicatas de cada variante mostrou alta correlação com a VAF esperada tanto na avaliação de repetibilidade (Figura 2A), quanto para a reprodutibilidade (Figura 2B).

Tabela 5 – Reprodutibilidade para variantes de DNA

Genes	Variantes	VAF esperada	VAF_1	VAF_2	VAF_3	Média	DP	CV
<i>ABL1</i>	c.944C>T	10%	8,9	12,2	11,8	10,9	1,8	16,5
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	10%	10,3	9,1	9,3	9,6	0,7	6,9
<i>CALR</i>	c.1092_1143del52	5%	4,0	5,6	4,5	4,7	0,8	16,6
<i>CBL</i>	c.1139T>C	10%	9,9	10,8	10,6	10,4	0,5	4,5
<i>CBL</i>	c.1259G>A	10%	10,2	10,7	10,7	10,5	0,3	2,6
<i>CEBPA</i>	c.939_940insAAG	15%	13,8	12,7	11,9	12,8	0,9	7,4
<i>CSF3R</i>	c.1853C>T	5%	6,2	5,3	nd	5,8	0,7	11,3
<i>FLT3</i>	dup chr13:28,608,250-28,608,277	10%	12,2	7,6	6,5	8,8	3,0	34,6
<i>FLT3</i>	c.2503G>T	10%	8,1	9,4	9,6	9,0	0,8	9,2
<i>FLT3</i>	c.1759_1800dup	5%	4,4	3,8	3,2	3,8	0,6	16,6
<i>IDH1</i>	c.394C>T	5%	4,9	5,6	5,8	5,4	0,5	8,6
<i>JAK2</i>	c.1624_1629delAATGAA	10%	7,6	6,3	8,2	7,3	1,0	13,2
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	5%	5,7	5,6	4,7	5,4	0,5	10,1
<i>MPL</i>	c.1544G>T	5%	4,3	5,3	4,8	4,8	0,5	10,4
<i>MYD88</i>	c.794T>C	10%	9,3	11,2	11,6	10,7	1,2	11,7
<i>NPM1</i>	c.863_864insTCTG	5%	4,2	5,0	5,2	4,8	0,5	10,7
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	5%	5,5	5,6	5,7	5,6	0,1	1,8
<i>SF3B1</i>	c.1998G>T	5%	4,6	3,7	4,2	4,2	0,4	10,3
<i>SRSF2</i>	c.284_307del24	5%	8,1	6,5	11,7	9,1	3,7	40,3
<i>U2AF1</i>	c.101C>T	10%	7,5	7,6	5,2	6,7	1,3	19,7

chr, cromossomo; CV, coeficiente de variação; del, deleção; dup, duplicação; ins, inserção; DP, desvio padrão; VAF, frequência do alelo variante.

Figura 2 – Correlação entre a VAF esperada e observada para cada simplicata



(A) repetibilidade e (B) reprodutibilidade.

## 4 Limite de detecção do ensaio

### 4.1 Limite de detecção do ensaio para variantes de DNA

O limite de detecção (LOD) para variantes de DNA foi avaliado utilizando uma amostra controle preparada a partir da mistura de duas amostras positivas sequenciadas previamente utilizando este painel. Estas amostras foram misturadas na proporção de 1:1. A partir desta amostra controle, foi preparada uma curva de diluição seriada com cinco pontos, na proporção de 1:2 em amostra negativa (Tabela 6). Devido ao volume insuficiente e aos valores de VAF muito baixos das variantes, optou-se pela não utilização do controle comercial de DNA.

**Tabela 6 – Controle de DNA: VAF esperados para cada ponto da curva de diluição a 1:2**

Genes	Variantes	Tipo	VAF_i (%)	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)
<i>DNMT3A</i>	p.Arg736Cys	SNV	40,7	20,3	10,2	5,1	3,4	2,5
<i>SF3B1</i>	p.Lys700Glu	SNV	41,3	20,6	10,3	5,2	3,4	2,6
<i>ASXL1</i>	p.Glu1102Asp	SNV	49,5	24,8	12,4	6,2	4,1	3,1
<i>DNMT3A</i>	p.Arg882Cys	SNV	39,8	19,9	10,0	5,0	3,3	2,5
<i>TET2</i>	p.Glu1250AspfsTer17	indel	38,7	19,4	9,7	4,8	3,2	2,4
<i>RUNX1</i>	p.Arg166Gln	SNV	38,8	19,4	9,7	4,8	3,2	2,4
<i>U2AF1</i>	p.Ser34Phe	SNV	39,9	19,9	10,0	5,0	3,3	2,5
<i>BCOR</i>	p.Gln156Ter	SNV	70,1	35,1	17,5	8,8	5,8	4,4

SNV, variante de nucleotídeo único; VAF, frequência do alelo variante; VAF\_i, VAF antes da mistura de amostras; P1, ponto da curva sem diluição; P2/P3/P4/P5, pontos da curva com diluição.

Todos os pontos da curva foram sequenciados em triplicata na mesma corrida. Foram calculados média, desvio padrão e intervalo de confiança (IC95%) para cada a VAF de cada variante detectada (Tabela 7). O ponto 5 da curva foi omitido da tabela, uma vez que a maioria das variantes não foi detectada. Foi definido como o LOD do ensaio o ponto da curva de diluição o qual todas as variantes foram detectadas em triplicata. Conforme observado na Tabela 7, o ponto 3 corresponde ao LOD de 5%. O LOD de 5% é o esperado para o NGS considerando SNVs e pequenas indels. Para definição do LOD de um painel multigênico deve-se considerar que o mesmo pode ser influenciado por tipos específicos de variantes, como grandes duplicações e deleções, além de variantes em regiões ricas em CG. Neste contexto, recomenda-se a confirmação de casos suspeitos de variantes em genes desafiadores,

como *CEBPA*, *CALR* e *FLT3-ITD*; bem como para quaisquer variantes suspeitas como VAF próximo ao LOD (IZEVBAYE *et al.*, 2020; FERRONE *et al.*, 2021).

**Tabela 7 – Limite de detecção (LOD) para o ensaio de DNA**

Genes	P1			P2			P3			P4		
	Média	DP	IC95%	Média	DP	IC95%	Média	DP	IC95%	Média	DP	IC95%
<i>DNMT3A</i>	19,6	1,3	18,2 - 21,1	11,3	0,5	10,7 - 11,9	5,5	0,6	4,8 - 6,3	3,0	0,1	2,9 - 3,1
<i>SF3B1</i>	20,8	1,7	18,9 - 22,7	10,6	1,7	8,7 - 12,5	5,8	0,5	5,3 - 6,4	3,7	0,5	3,2 - 4,3
<i>ASXL1</i>	24,5	1,0	23,3 - 25,7	12,9	1,0	11,7 - 14,0	6,3	0,4	5,8 - 6,7	4,0	0,4	3,6 - 4,5
<i>DNMT3A</i>	19,0	0,8	18,1 - 19,9	10,0	1,2	8,7 - 11,4	4,5	0,2	4,3 - 4,8	3,2	0,2	2,8 - 3,5
<i>TET2</i>	18,2	1,2	16,9 - 19,6	10,4	0,9	9,5 - 11,4	5,0	1,2	3,7 - 6,3	-	-	-
<i>RUNX1</i>	19,1	1,9	17,0 - 21,2	9,2	0,6	8,6 - 9,9	5,3	0,5	4,8 - 5,8	4,0	0,4	3,6 - 4,6
<i>U2AF1</i>	18,6	0,9	17,6 - 19,5	9,6	0,3	9,2 - 10,0	4,2	0,8	3,3 - 5,1	3,4	0,0	3,4 - 3,5
<i>BCOR</i>	34,2	0,6	33,5 - 34,9	17,2	0,7	16,4 - 18,0	8,2	1,6	6,4 - 10,0	5,8	0,8	4,8 - 6,7

DP, desvio padrão; IC, intervalo de confiança.

#### 4.2 Limite de detecção do ensaio para variantes de RNA

O LOD para variantes de RNA (fusões gênicas) foi definido utilizando o controle Seraseq de RNA. A partir deste controle, foi preparada uma curva de diluição de cinco pontos, diluídas em amostra negativa nas proporções de 1:2, 1:4, 1:10 e 1:100. Todos os pontos da curva foram sequenciados em triplicata (Tabela 8). O ponto 5 (diluição 1:100) da curva foi omitido da tabela, uma vez que a maioria das variantes não foi detectada.

**Tabela 8 – Limite de detecção (LOD) para o ensaio de RNA em número de reads contadas**

Variantes	Nº reads_P1 sem diluição			Nº reads_P2 1:2			Nº reads_P3 1:4			Nº reads_P4 1:10		
	C1.1	C1.2	C1.3	C2.1	C2.2	C2.3	C3.1	C3.2	C3.3	C4.1	C4.2	C4.3
<i>MYST3::CERBBP</i>	3638	3361	2645	622	645	428	490	322	290	35	50	46
<i>ETV6::ABL1</i> (isoforma 1)	2809	2354	1846	460	427	379	313	223	227	23	44	39
<i>ETV6::ABL1</i> (isoforma 2)	4398	3981	3769	1120	603	596	454	437	447	40	55	61
<i>PCMI::JAK2</i>	6965	5537	4993	1174	1435	1025	765	569	438	114	43	85
<i>FIP1L1::PDGFRA</i>	14395	13153	10292	3044	2955	1833	1278	1020	1467	75	63	205
<i>TCF3::PBX1</i>	3798	3081	3007	748	766	519	354	294	345	47	35	42
<i>BCR::ABL1</i>	2978	1910	2296	760	797	469	420	301	305	31	45	64
<i>RUNX1::RUNXIT1</i>	2298	1930	1856	488	450	393	262	224	264	nd	42	nd
<i>PML::RARA</i>	3178	2621	2585	485	636	414	348	233	334	nd	34	30

nd, não detectada.

O filtro para chamada de fusões gênicas baseia-se no número de *reads* contadas, sendo necessárias no mínimo 20 *reads*. Entretanto, o fabricante do controle informa o número de cópias de fusão/ $\mu\text{L}$  de controle, obtidos por técnicas quantitativas sensíveis como a PCR digital em gotas (ddPCR). A curva de diluição foi construída considerando o número de cópias esperado para cada ponto da curva. Para o ponto 3 da curva todas as fusões foram chamadas em triplicata, correspondendo a um número mínimo de 518 a 1331 cópias de fusão (Tabela 9).

**Tabela 9 – Número de cópias esperado para cada ponto da curva de diluição**

Fusões gênicas	Nº de cópias/ $\mu\text{L}$				
	P1 (s/diluir)	P2 (1:2)	P3 (1:4)	P4 (1:10)	P5 (1:100)
<i>MYST3::CERBBP</i>	4416	2208	1104	442	44
<i>ETV6::ABL1</i> (isoforma 1)*	4224	2112	1056	422	42
<i>PCMI::JAK2</i>	5322	2661	1331	532	53
<i>FIP1L1::PDGFRA</i>	2070	1035	518	207	21
<i>TCF3::PBX1</i>	2416	1208	604	242	24
<i>BCR::ABL1</i>	3940	1970	985	394	39
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	2490	1245	623	249	25
<i>PML::RARA</i>	2250	1125	563	225	23

Uma vez que o painel OncoPrint Myeloid™ possibilita a detecção aproximadamente 600 fusões gênicas, não é possível determinar o LOD para cada uma delas, mas apenas para aquelas do último ponto da curva de diluição em que todas as variantes do controle foram detectadas em triplicata. Embora pareça lógica a correlação entre número de *reads* e o número de cópias de fusão, esta correlação não é precisa. O número de *reads* contadas para uma determinada fusão pode ser influenciado por fatores, como a região genômica onde ocorreu o ponto de quebra e por variáveis técnicas durante o processo de construção de biblioteca.

## 5 Análise da profundidade de cobertura

Considerando cada biblioteca sequenciada, em média 99,4% e 97,5% das bases dentro de todos os amplicons do painel de DNA tiveram profundidade de cobertura de pelo menos 100x e 500x, respectivamente. Estes valores atendem aos parâmetros recomendados para cobertura de bases alvo por amostra (Quadro 1). Adicionalmente, os arquivos no formato BAM (*Binary Alignment Map*) de 42 bibliotecas de DNA (34 amostras clínicas e oito controle) foram importados para um software próprio

([http://172.19.231.8//coberturaNGS\\_login.html](http://172.19.231.8//coberturaNGS_login.html)) de análise de profundidade de cobertura para todas as regiões interrogadas pelo painel de DNA. Foi utilizado um ponto de corte de profundidade mínima de cobertura de 100x. Foram identificadas falhas na profundidade de cobertura dentro de 14 regiões gênicas sequenciadas (Tabela 10). Estes achados são similares aos observados em estudos prévios com esse painel (IZEVBAYE *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2020).

**Tabela 10 – Regiões sequenciadas com profundidade de cobertura inferior a 100X**

Genes	chr	*Pos início	*Pos final	Amplicons	Cob Média	%
<i>BRAF</i>	chr7	140624442	140624670	<i>BRAF</i> _18.30633	16x	95
<i>SH2B3</i>	chr12	111856152	111856378	<i>SH2B3</i> _1.85663	86x	26
<i>SH2B3</i>	chr12	111856364	111856578	<i>SH2B3</i> _1.52815	95x	14
<i>RBI</i>	chr13	48954147	48954356	<i>RBI</i> _15.4310	98x	24
<i>RBI</i>	chr13	49030397	49030641	<i>RBI</i> _19.3890	98x	24
<i>PRPF8</i>	chr17	1562643	1562846	<i>PRPF8</i> _12.173121	45x	100
<i>PRPF8</i>	chr17	1565330	1565463	<i>PRPF8</i> _19.367343	96x	14
<i>NFI</i>	chr17	29422203	29422452	<i>NFI</i> _1.17210	99x	14
<i>NFI</i>	chr17	29663490	29663739	<i>NFI</i> _42.344804	99x	52
<i>CALR</i>	chr19	13049399	13049648	<i>CALR</i> _1.107389	97x	21
<i>CEBPA</i>	chr19	33792501	33792689	<i>CEBPA</i> _1.1.86676	80x	29
<i>CEBPA</i>	chr19	33792687	33792878	<i>CEBPA</i> _1.1.16632	94x	14
<i>CEBPA</i>	chr19	33792848	33793089	<i>CEBPA</i> _1.1.81913	92x	24
<i>ASXLI</i>	chr20	30946554	30946756	<i>ASXLI</i> _1.875	74x	98
<i>BCOR</i>	chrX	39923069	39923260	<i>BCOR</i> _8.202477	56x	88

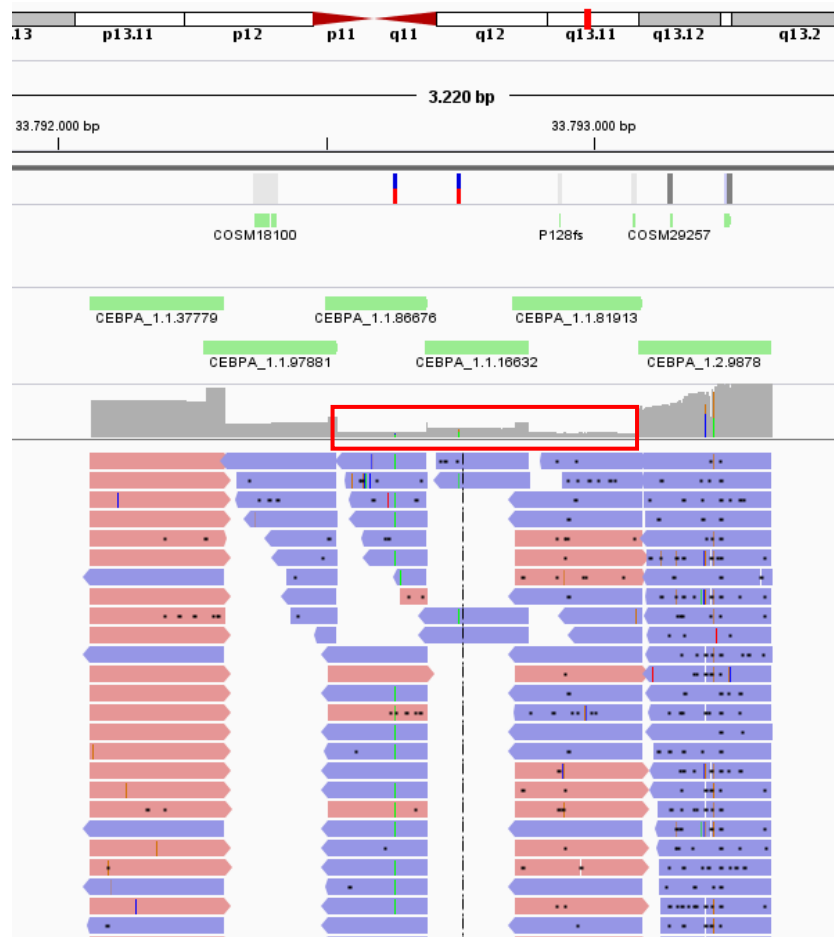
Chr: cromossomo; Cob média, profundidade média de cobertura; pos início, posição cromossômica inicial do amplicon; pos final, posição cromossômica final do amplicon; %, porcentagem de amostras. \*Posição cromossômica para versão GRCh37/hg19 do genoma.

Foi observada uma variação no tamanho destas regiões de baixa profundidade de cobertura entre as amostras. Todas as regiões de falha foram revisadas individualmente, amostra por amostra, quanto à presença de variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas associadas às NMs. Para isto foram utilizadas as plataformas UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) e ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Com exceção do gene *CEBPA*, não foram identificadas regiões críticas para as NMs nas regiões com baixa profundidade de cobertura. O gene *CEBPA* é caracterizado pelo alto conteúdo de dinucleotídeos CG, tornando difícil o sequenciamento de algumas regiões. Entre 14 a 29% das bibliotecas foi observada uma profundidade média de cobertura inferior a 100x para três (*CEBPA*\_1.1.86676,



*CEBPA*\_1.1.16632 e *CEBPA*\_1.1.81913) dentre os seis amplicons que cobrem a região codificante do gene *CEBPA*. Adicionalmente, a profundidade de cobertura para o amplicon *CEBPA*\_1.1.9788 ficou entre 100 a 200x (Figura 3).

**Figura 3 – Reads geradas a partir do sequenciamento da região codificante do gene *CEBPA* para a biblioteca com menor profundidade de cobertura**

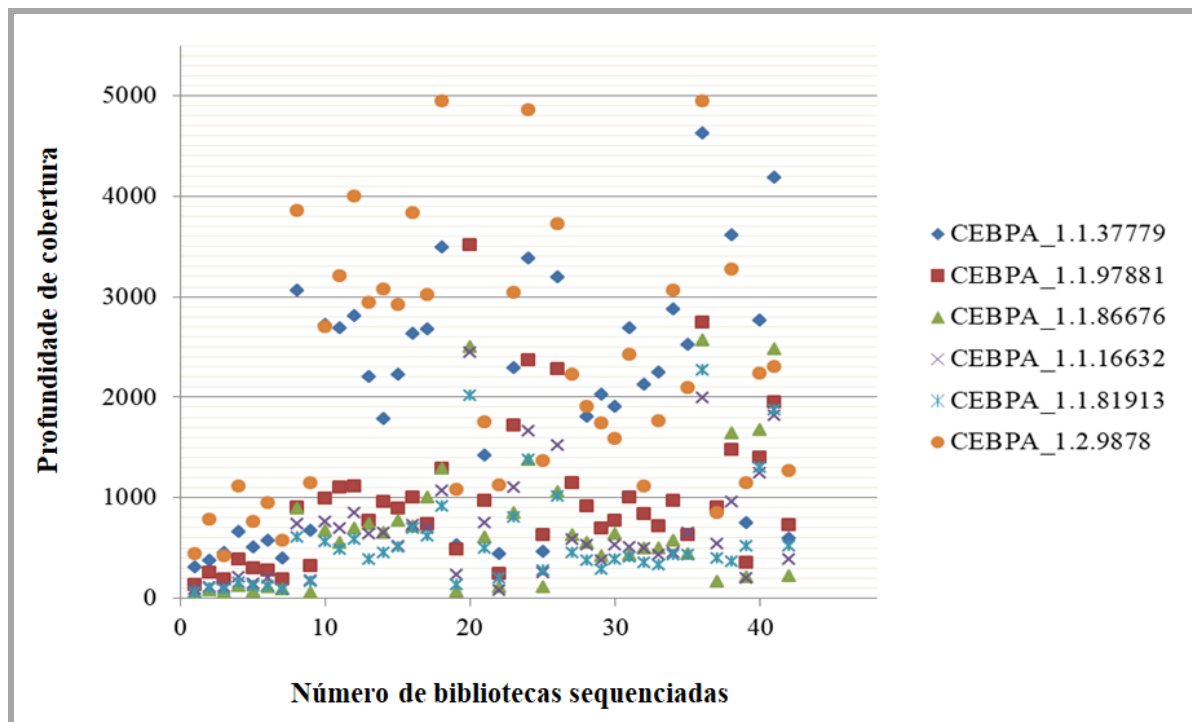


Observa-se menor profundidade de cobertura dos amplicons *CEBPA*\_1.1.86676, *CEBPA*\_1.1.16632 e *CEBPA*\_1.1.81913. Fonte: <https://igv.org/>

Esta região com baixa profundidade de cobertura é crítica para a LMA, uma vez que há diversas variantes patogênicas e provavelmente patogênicas citadas em bancos de dados relevantes, como o COSMIC, ClinVar e Varsome (<https://varsome.com/>). Neste contexto, a profundidade de cobertura desta região deve ser avaliada a cada amostra sequenciada e, quando necessário, o sequenciamento deverá ser complementado pela técnica de Sanger. Aproximadamente 70% das bibliotecas sequenciadas apresentaram boa profundidade de

cobertura da região codificante do gene *CEBPA*, destacando-se os amplicons *CEBPA\_1.1.37779* e *CEBPA\_1.2.9878* (Figura 3). Na Figura 4 pode ser observada uma menor profundidade de cobertura para todos os amplicons nas primeiras 10 bibliotecas sequenciadas. Esta diferença pode estar relacionada a menor experiência técnica no momento do preparo e combinação das primeiras bibliotecas sequenciadas.

**Figura 4 – Profundidade de cobertura de sequenciamento por amplicon do gene *CEBPA* considerando as 42 bibliotecas avaliadas**



## 6 Confirmação de variantes

Algumas variantes detectadas pelo sequenciamento de 34 de amostras clínicas foram também avaliadas por metodologias ortogonais disponíveis no laboratório (Tabela 11), como PCR em tempo real (qPCR), sequenciamento Sanger, PCR digital em gotas (ddPCR) e eletroforese capilar.

No software Ion Reporter há um plugin desenvolvido para melhorar a sensibilidade do painel na detecção da variante *FLT3-ITD*. As quatro variantes *FLT3-ITD* detectadas foram confirmadas por PCR e eletroforese capilar (método padrão ouro). A variante *FLT3-ITD* é uma duplicação localizada no domínio juxtamembrana do gene podendo variar de 3 a mais de 400 pb. Esta variante é importante para estratificação de risco e conduta terapêutica na LMA. Variações no tamanho das duplicações, aliada a possibilidade de duplicações em regiões

diferentes do gene ainda representam um desafio para a detecção por NGS. Desta forma, recomenda-se complementar a pesquisa da variante *FLT3*-ITD por PCR seguido eletroforese capilar, que atualmente ainda é o método padrão-ouro para detecção desta variante (PARK *et al.*, 2020).

**Tabela 11 – Metodologias utilizadas para confirmação de variantes**

Gene/Fusão gênica	Metodologias
<i>BCR::ABL1</i>	cariótipo, RT-qPCR
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	RT-qPCR
<i>CEBPA</i>	sequenciamento sanger
<i>FLT3</i> -ITD	PCR com eletroforese capilar
<i>JAK2</i> (V617F)	qPCR, ddPCR
<i>KIT</i>	sequenciamento sanger
<i>NPM1</i>	PCR
<i>TP53</i>	sequenciamento sanger

RT-qPCR, transcrição reversa seguida de PCR em tempo real; PCR, reação em cadeia da polimerase; ddPCR, *droplet digital PCR*.

## 7 Conclusão

Neste estudo foi avaliado desempenho analítico do painel comercial OncoPrint™ Myeloid desenhado para detecção de variantes de DNA e fusões gênicas de importância para o diagnóstico, prognóstico e conduta terapêuticas das NMs. Usando controles comerciais de referência, o ensaio demonstrou alta sensibilidade e especificidade para variantes de DNA, e alta sensibilidade para as fusões gênicas avaliadas. O LOD de aproximadamente 5% para variantes de DNA se mostrou dentro do valor esperado para SNVs e pequenas indels. A definição acurada de um LOD para o painel de fusões gênicas é um desafio a ser superado, uma vez que o painel permite a detecção de mais de 600 diferentes fusões. O NGS permite a detecção qualitativa de fusões gênicas, não sendo possível fazer uma associação precisa entre o número de reads contadas e o número de cópias de fusão. Os ensaios de DNA e fusões gênicas apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, valores altos de CV (>20%) foram observados para grandes indels do controle comercial, como *CALR* c.1092\_1143del52, *FLT3* dup chr13:28,608,250-28,608,277 e *SRSF2* c.284\_307del24. O ensaio possui a limitação em não detectar as variantes *CEBPA* c.68\_69insG, *ASXL1* c.1900\_1922del23 e *ASXL1* c.1934\_1935insG, uma vez que estas estão localizadas em regiões ricas em CG e em longos homopolímeros, respectivamente. Embora o workflow de

análise do painel tenha um plugin dedicado à detecção da variante *FLT3-ITD*, e no presente estudo o ensaio tenha se demonstrado sensível na detecção desta variante, a literatura recomenda sua complementação pelo método de PCR seguido de eletroforese capilar. Dada a atual relevância do gene *CEBPA* para o diagnóstico e prognóstico na LMA, e baixa profundidade de cobertura observada em algumas regiões deste gene em aproximadamente 30% das bibliotecas sequenciadas, faz-se necessário avaliar individualmente a necessidade de complementação do sequenciamento pelo método de Sanger.

## CAPÍTULO II

### INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES SOMÁTICAS NAS NEOPLASIAS MIELOIDES UTILIZANDO UM PAINEL DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

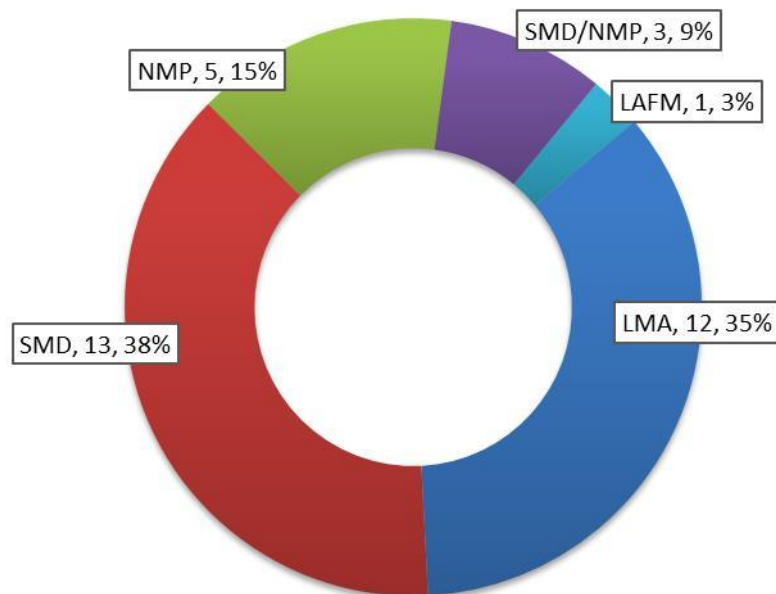
As neoplasias mieloides (NMs) representam um grupo muito heterogêneo de câncer hematológico decorrente de mutações nas células-tronco ou nas células progenitoras hematopoiéticas (LEVY *et al.*, 2019). O diagnóstico das NMs requer a integração de várias fontes de dados dos pacientes, incluindo a apresentação clínica, a morfologia do sangue periférico e medula óssea, a imunofenotipagem, citogenética e marcadores moleculares. Os dados genéticos são um dos fatores críticos no diagnóstico das NMs. Além de seu papel no diagnóstico, as características moleculares também podem fornecer informações quanto ao prognóstico e direcionar a conduta terapêutica (JUMNIENSUK *et al.*, 2022). A análise mutacional por sequenciamento de nova geração (NGS) tem se mostrado cada vez mais relevante para a investigação das NMs. No entanto, a incorporação do NGS na prática clínica ainda é um desafio. A disponibilidade de painéis multigênicos comerciais podem contribuir para esta incorporação. A maioria dos painéis de genes mieloides disponíveis comercialmente incluem entre 25 a 50 genes. Os painéis de NGS permitem que vários genes e diversas amostras sejam sequenciados em paralelo, corroborando para uma futura substituição dos testes de gene único. A crescente utilização de painéis multigênicos tem resultado em um aumento na identificação de variantes genéticas associadas às NMs, sendo algumas variantes novas (NORTHROP *et al.*, 2020). Neste contexto, este trabalho descreve os resultados de um estudo prospectivo observacional a partir do sequenciamento de amostras de pacientes com diagnóstico de NMs, bem como sua associação com os dados clínicos e laboratoriais. Foi utilizado o painel OncoPrint<sup>TM</sup> Myeloid para investigação de variantes genéticas em 40 genes

(23 hotspot e 17 genes completos), além pesquisa de fusões gênicas envolvendo 29 genes *drivers* e análise de expressão relativa para os genes *SMC1A*, *WT1*, *MYC*, *MECOM* e *BAALC*.

### 1 Pacientes e amostras

Foram sequenciadas amostras de sangue periférico ou medula óssea de 34 pacientes com diagnóstico confirmado de NM. Um dos pacientes tinha suspeita clínica de leucemia mieloide aguda (LMA), mas posteriormente foi confirmado o diagnóstico de leucemia aguda de fenótipo misto (LAFM). (Figura 1). Vinte e dois pacientes (64,7%) são do sexo masculino e 12 (35,3%) do sexo feminino. Os pacientes apresentaram idade  $\geq 18$  anos, mediana de 68 anos (18 – 83 anos).

**Figura 1 – Distribuição dos pacientes entre os grupos avaliados**



**LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica; SMD/NMP, neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa.**

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico de NM são apresentados na Tabela 1. Dado o limitado número de amostras, os dados dos pacientes com diagnóstico de SMD/NMP e do único caso de LAFM não foram incluídos nesta tabela. Não houve diferença significativa na distribuição do sexo entre os pacientes. Foi observada diferença significativa

na idade entre os grupos, com maior número de pacientes <30 anos na LMA. Foi observada diferença significativa entre os grupos para os valores de hemácias, hemoglobina, basófilos, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Considerando os índices hematimétricos, destacam-se anemia e plaquetopenia que geralmente caracterizam a SMD e LMA, assim como a trombocitose, achado comum entre as NMPs. Foram calculados os valores das relações plaqueta-linfócito (RPL), neutrófilo-linfócito (RNL) e monócito-linfócito (RML) como a razão entre o número de plaquetas e o de linfócitos, neutrófilos e linfócitos, e entre o número de monócitos e o de linfócitos, respectivamente (Tabela 1).

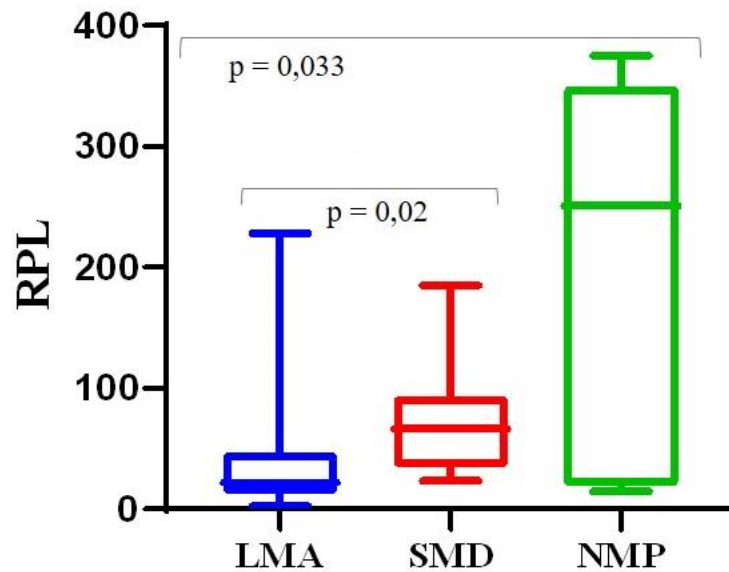
**Tabela 1 – Características demográficas e índices hematimétricos dos pacientes**

Parâmetros	SMD	LMA	NMP	Valor p
Número de pacientes	13	12	5	-
Sexo				0,31
Feminino	3	5	3	
Masculino	10	7	2	
Idade (anos)	69±13	33 (18 -76)	60±20	0,022 <sup>a</sup>
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> /μL)	2,8±0,8	2,6 (1,8-4,9)	4,5±1,3	0,021 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	8,9±3,0	7,95 (5,9-13,7)	12,8±2,7	0,028 <sup>c</sup>
Hematócrito (%)	26,9±8,3	22,6 (17,6-41,0)	38,6±8,2	0,046 <sup>d</sup>
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	3,4±1,7	10,8 (0,8-95,5)	8,5 (7,4-433,6)	0,001 <sup>e</sup>
Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,9 (0,3-3,8)	2,3 (0,0-17,8)	5,6 (3,8-140,0)	0,005
Eosinófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,04±0,03	0,0 (0,0-0,3)	0,2 (0,2-31,2)	<0,0001 <sup>f</sup>
Basófilos (10 <sup>3</sup> /μL)	0,01 (0,0-0,03)	0,0 (0,0-0,7)	0,04 (0,00-194,7)	0,072
Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,2±0,2	0,9 (0,0-64,9)	0,9 (0,5-12,6)	0,024 <sup>g</sup>
Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,8 (0,1-2,8)	1,9 (0,0-11,9)	2,6 (1,8-58,4)	0,017 <sup>h</sup>
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	73,0 (18,0-396,0)	49,0 (8,0-572,0)	791,4±171,3	0,002 <sup>i</sup>
RPL	69,9 (23,5-3067,0)	22,3 (2,4-228,3)	198,0 ±168,6	0,033 <sup>j</sup>
RNL	1,4 (0,1-12,5)	0,8 (0,2-3,3)	1,9±1,1	0,351
RML	0,2 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-5,4)	0,3±0,1	0,273

LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica. DP, desvio padrão; min, mínimo; máx, máximo; RPL, razão plaqueta-linfócito; RNL, razão neutrófilo-linfócito; RML, razão monócito-linfócito. <sup>a</sup>diferença apenas entre LMA e SMD (p = 0,008), <sup>b</sup>diferença observada quando comparados LMA e NMP (p = 0,013) e entre SMD e NMP (p = 0,006), <sup>c</sup>diferença observada quando comparados LMA e NMP (p = 0,013) e entre SMD e NMP (p = 0,017), <sup>d</sup>diferença observada entre LMA e NMP (p = 0,018) e entre SMD e NMP (p = 0,022), <sup>e</sup>diferença observada entre LMA e SMD (p = 0,007) e entre SMD e NMP (p = 0,002), <sup>f</sup>diferença observada quando comparados LMA e SMD (p < 0,0001) e entre LMA e NMP (p = 0,003), <sup>g</sup>diferença observada apenas quando comparados SMD e NMP (p = 0,005), <sup>h</sup>diferença observada apenas quando comparados SMD e NMP (p = 0,009), <sup>i</sup>diferença observada entre LMA e NMP (p < 0,0005) e entre SMD e NMP (p = 0,0001), <sup>j</sup>diferença observada apenas entre LMA e SMD (p = 0,02).

Não foi observada diferença entre LMA, SMD e NMP para os valores de RNL ( $p = 0,351$ ) e RML ( $p = 0,273$ ), mas foi observada diferença significativa para os valores da RPL (0,033), sobretudo quando comparados aos grupos de LMA e SMD ( $p = 0,02$ ) (Figura 2).

**Figura 2 – Box plot comparativo para os valores de RPL entre SMD, LMA e NMP.**



Diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

Os valores mais baixos de RPL se correlacionam com a menor contagem absoluta de plaquetas no sangue periférico, uma vez que a plaquetopenia foi observada 75% dos casos de SMD e 80% dos casos LMA. Adicionalmente, a linfopenia foi observada em 66,7% dos casos de SMD e em 10% dos casos de LMA. Os valores mais altos de RPL observados na NMP refletem a trombocitose observada nesse grupo. O microambiente tumoral é dinâmico, complexo, e intimamente ligado a todas as etapas da carcinogênese, composta por células da matriz e do estroma, células neuroendócrinas, adiposas, imunes e inflamatórias, dos sistemas linfático e vascular. A contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e plaquetas no sangue periférico pode refletir a resposta inflamatória sistêmica associada às mudanças de microambiente induzidas pelas neoplasias (MULAS *et al.*, 2022). Os neutrófilos e linfócitos são os dois principais tipos celulares envolvidos na inflamação (ZHANG *et al.*, 2021). Valores altos de RNL estão relacionados à diminuição no número de linfócitos e um número elevado de neutrófilos no microambiente tumoral. RNL e RML refletem a interação entre o microambiente tumoral e a resposta imunológica do hospedeiro (STEFANIUK *et al.*, 2020).

O reduzido tamanho amostral foi uma limitação deste estudo para análise das relações RPL, RNL e RML. Além disso, um dos principais desafios para adoção destes parâmetros na prática clínica é a determinação de um valor de referência, uma vez que são necessários estudos com este objetivo em grandes coortes. A maioria dos estudos tem como objetivo avaliar o impacto destes parâmetros na sobrevida dos pacientes, sem uma padronização quanto à forma de determinar os valores de referência.

## 2 Anormalidades genéticas detectadas

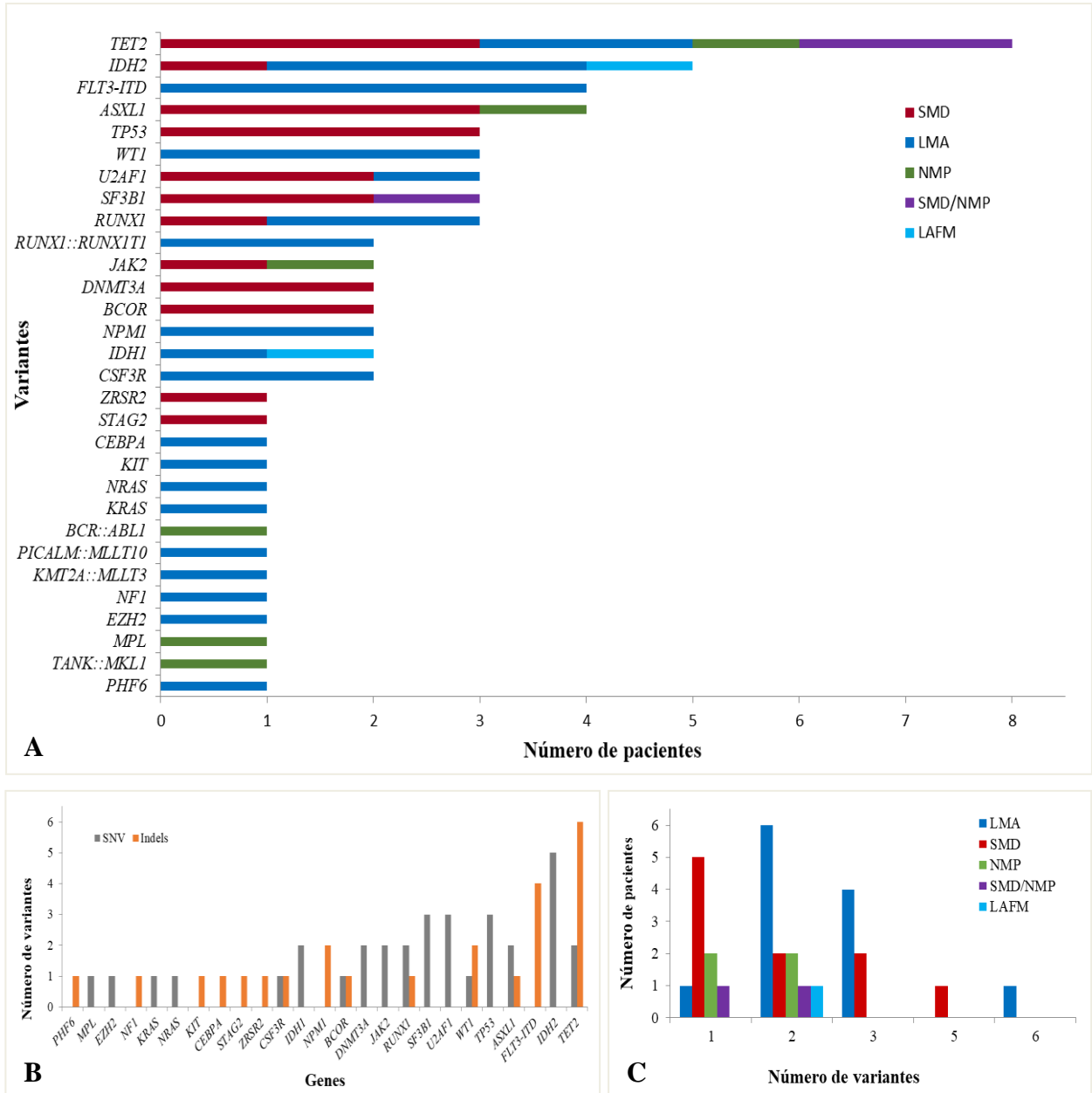
Foi detectada pelo menos uma variante em 29 (85,3%) dentre as 34 amostras sequenciadas. Os resultados são detalhados no Anexo 1. Os genes frequentemente mutados foram *TET2*, *IDH2*, *FLT3* e *ASXL1*. Foram detectadas as fusões gênicas *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A::MLL2*, *PICALM::MLL10*, *BCR::ABL1* e *TANK::MKL1* (Figura 3A). O número médio de variantes por amostra foi 2,2; variando de 1 a 6 variantes. O maior número de variantes foi observado na LMA (Figura 3B). Foram detectadas 57 variantes de DNA em 25 genes, sendo 33 variantes de nucleotídeo único (SNV) e 24 indels (Figura 3C).

A LMA apresentou maior frequência de casos positivos e maior número de variantes por amostra. Similarmente, Carbonell *et al.* (2019) detectaram pelo menos uma variante em 84% das 121 amostras de NM sequenciadas, onde também se destacou a LMA pela maior frequência de variantes. Neste trabalho os genes mais frequentemente mutados foram *ASXL1*, *SRSF2*, *TET2*, *DNMT3A* e *NPM1*. Em outro estudo com 287 pacientes com diagnóstico de NM foi identificada pelo menos uma variante em 89% dos casos, destacando a maior frequência de variantes nos genes *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *JAK2* e *ASXL1* (MAES *et al.*, 2017). Dentre as 57 variantes de DNA detectadas, 27 (47,5%) são do tipo *missense*, 17 (29,8%) são variantes *frameshift*, oito (14,0%) *nonsense* e cinco (8,8%) variantes *non-frameshift*. Foi realizado cariótipo para 21 (77,8%) dentre as 27 amostras positivas para variantes de DNA, sendo 11 casos (52,4%) com cariótipo normal, seis casos (28,6%) com cariótipo alterado não complexo ( $\leq 3$  alterações) e quatro casos de cariótipo complexo ( $> 3$  alterações) (19,0%). Para cinco casos não foi obtido resultado de cariótipo, sendo quatro casos devido à falha na cultura celular e um caso de por ausência de solicitação (Figura 4). Dada heterogeneidade citogenética e molecular que caracteriza as NMs, o cariótipo associado à investigação de variantes somáticas é uma ferramenta de grande relevância para uma estratificação de risco mais assertiva, sobretudo na SMD e LMA. (BERNARD *et al.*, 2022; DÖHNER *et al.*, 2022). Entretanto, nos casos de cariótipo normal a investigação de variantes somáticas tem impacto ainda maior para a estratificação de risco destas doenças. No presente estudo, variantes em



genes relevantes para o prognóstico como *SF3B1*, *RUNX1*, *ASXL1*, *NPM1* e *FLT3-ITD* foram detectadas em pacientes com cariótipo normal.

**Figura 3 – Frequência e distribuição das variantes entre os pacientes com NM**



**(A) Distribuição das variantes detectadas (B) Número de variantes por grupo de NM (C) Distribuição de SNVs e indels entre as variantes detectadas. LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica; SMD/NMP, neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; SNV, variante de nucleotídeo único.**

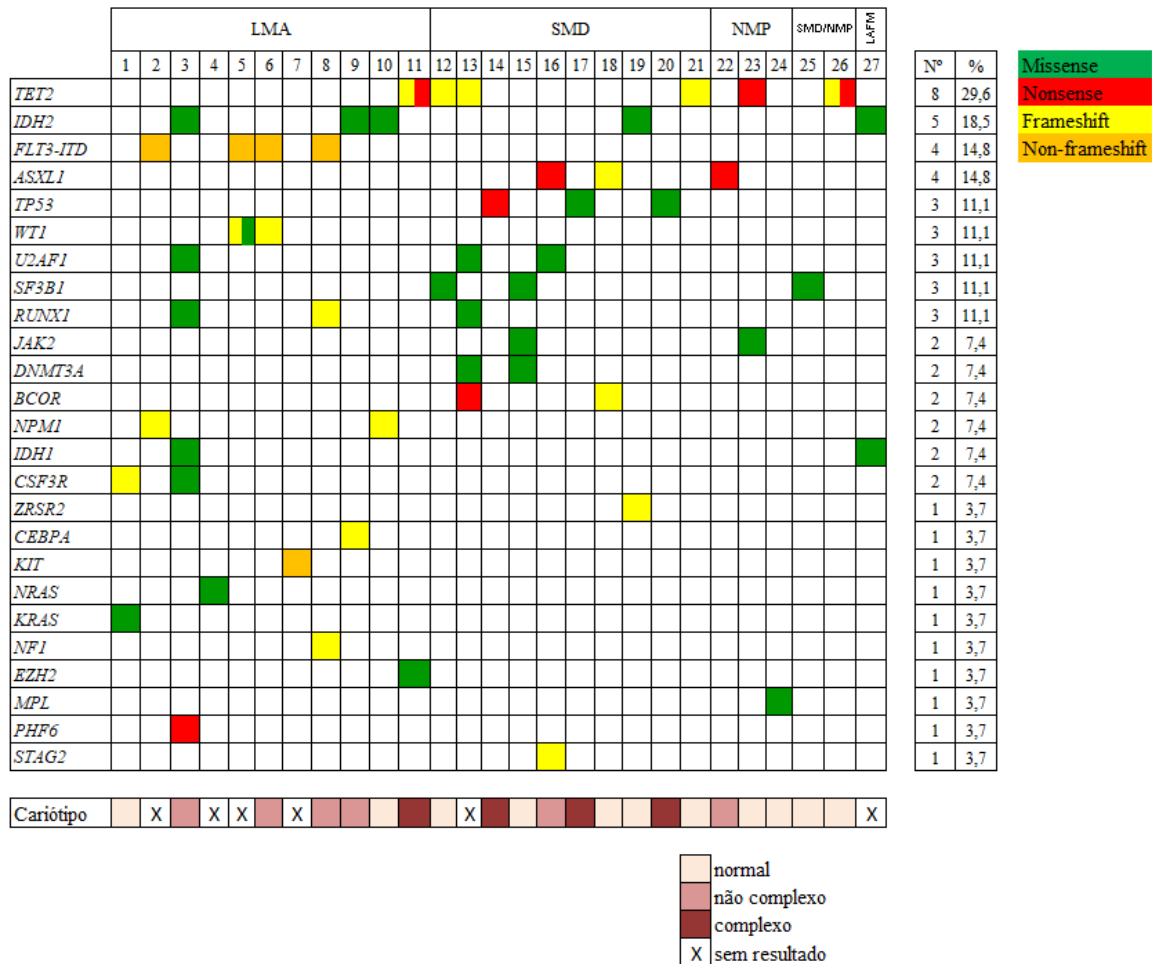
Destacou-se a contribuição do NGS na detecção das fusões *KMT2A::MLLT3* e *PICALM::MLLT10*, uma vez que no primeiro caso o cariótipo foi normal e no segundo houve falha na cultura e ausência de crescimento celular. Além disso, a investigação de fusões

gênicas associada a pesquisa de variantes de DNA deve trazer contribuição importante para a investigação das NMs. A identificação de fusões gênicas é parte essencial no manejo pacientes com LMA, não apenas para diagnóstico, mas também para o prognóstico e a seleção do tratamento apropriada (KIM *et al.*, 2020). Uma das vantagens da investigação de fusões gênicas por painéis de NGS é a possibilidade de detectar fusões envolvendo genes com ampla variedade de *partners*, como o *KMT2A*, por exemplo. No presente estudo, vale ressaltar um caso de LMC em rápida transformação para LMA em que além da translocação t(5;9;22) e fusão *BCR::ABL1* foi detectada uma variante em *ASXL1*. Os eventos genômicos associados a evolução adversa na LMC são pouco compreendidos. Branford *et al.* (2018) detectaram variantes somáticas adicionais a fusão *BCR::ABL1* em pacientes com LMC ao diagnóstico, particularmente naqueles que apesar do tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKIs), experimentaram crise blástica precoce e transformação para LMA. Nestes trabalhos os genes frequentemente mutados ao diagnóstico foram *ASXL1*, *IKZF1* e *RUNX1*.

Além de fusões gênicas alvo, foi detectada em uma amostra a fusão *TANK::MKL1*; uma variante que não é um alvo do painel Oncomine™ Myeloid e por isto chamada pelo software de análise como *non targeted fusion*. Embora o painel tenha como alvo fusões entre genes drivers e seus partners conhecidos, os primers do painel podem detectar fusões entre novas combinações de genes drivers e partners. A fusão *TANK::MKL1* foi detectada em amostra de paciente com histórico de melanoma de coróide, encaminhada ao ambulatório de hematologia para investigação de trombocitose persistente. O diagnóstico foi de TE com cariótipo normal e ausência da variante JAK2 V617F. Não foram detectadas variantes em *MPL* e *CALR*. O gene *MKL1* (megakaryoblastic leukemia protein-1), também conhecido como *MRTF-A*, codifica uma cofator transcricional pertencente à família dos fatores de transcrição relacionados à miocardina (MRTFs). O fator de resposta sérica e seu cofator transcricional *MKL1* são críticos para a maturação dos megacariócitos e formação de plaquetas (SMITH *et al.*, 2012), além de regularem positivamente os genes que aumentam a megacariopoiese humana (RAHMAN *et al.*, 2018). O gene *MKL1* é um partner da fusão *RBM15::MRTFA*, sendo uma das fusões alvo do painel Oncomine™ Myeloid. Esta fusão gênica está associada à translocação t(1;22) recorrente em leucemia megacarioblástica aguda. O gene *TANK* ou *TBKI* (TANK-binding kinase 1) é um membro do inibidor da família do fator nuclear-kB quinase (NF-kB) (JIANG *et al.*, 2021). Após a detecção de um patógeno mediado por receptor, a fosforilação de TANK promove a ativação da via NF-kB na resposta do sistema imune inato. Estudos anteriores demonstraram a expressão aberrante de TANK e

seus efeitos pró tumorais em vários tipos de câncer, incluindo a promoção de migração e invasão no melanoma (VU *et al.*, 2014).

**Figura 4 – Frequência e distribuição dos tipos de variantes de DNA detectadas**



Missense, mutação de ponto com alteração de aminoácido; nonsense, substituição de nucleotídeo leva à inserção prematura de um códon de terminação; Frameshift, indels que levam à alteração na matriz de leitura do gene; Non-frameshift, indels que não levam a mudança na matriz de leitura LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodislásica; SMD/NMP, neoplasia mielodislásica/mieloproliferativa.

Foi observada uma frequência maior de variantes em genes que codificam reguladores epigenéticos envolvidos principalmente na metilação do DNA, e fatores envolvidos na sinalização celular. Na LMA houve um predomínio de variantes em genes envolvidos na sinalização celular em relação às demais NMs. Na SMD foi observado predomínio de variantes em genes envolvidos na regulação epigenética e no *splicing* de RNA (Figura 5). A metilação do DNA representa um mecanismo crucial de regulação epigenética

nas neoplasias hematológicas. A hipometilação e hipermetilação de genes supressores de tumor estão associados ao desenvolvimento e progressão das neoplasias hematológicas. Vários fármacos têm sido utilizados no tratamento das NMs, incluindo os agentes hipometilantes (HMAs) decitabina e azacitidina. Combinações dos HMAs com outras modalidades de tratamento e a descoberta de novas moléculas ainda são objeto de pesquisa para aumentar a sensibilidade às terapias e melhorar os resultados dos pacientes (KALINKOVA *et al.*, 2023). O FLT3 é um receptor de citocinas expresso exclusivamente em células hematopoiéticas, envolvido na proliferação e sobrevivência de células hematopoiéticas normais. Entretanto, a presença das variantes *FLT3*-ITD e *FLT3*-TKD resulta na ativação constitutiva das vias de sinalização de FLT3, resultando em aumento da proliferação celular. A LMA com variante FLT3 tem sido alvo de estudo avaliando a resposta a inibidores de tirosina quinase (SONG *et al.*, 2021).

**Figura 5 – Genes mutados agrupados por categorias funcionais**

		LMA										SMD							NMP			SMD/NMP		LAFM							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Sinalização celular	<i>CSF3R</i>																														
	<i>FLT3</i>																														
	<i>JAK2</i>																														
	<i>KIT</i>																														
	<i>KRAS</i>																														
	<i>MPL</i>																														
	<i>NF1</i>																														
	<i>NRAS</i>																														
Fatores de transcrição	<i>CEBPA</i>																														
	<i>RUNX1</i>																														
	<i>PHF6</i>																														
Fatores de splicing	<i>SF3B1</i>																														
	<i>U2AF1</i>																														
	<i>ZRSR2</i>																														
Ciclo celular	<i>NPM1</i>																														
	<i>TP53</i>																														
	<i>WT1</i>																														
Regulação epigenética	<i>ASXL1</i>																														
	<i>BCOR</i>																														
	<i>DNMT3A</i>																														
	<i>EZH2</i>																														
	<i>IDH1</i>																														
	<i>IDH2</i>																														
	<i>TET2</i>																														
Complexo coesina																															
	<i>STAG2</i>																														

**LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, neoplasia mielodisplásica; NMP, neoplasias mieloproliferativas; SMD/NMP, neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto.**

A ocorrência simultânea de duas ou mais variantes somáticas no mesmo paciente é uma situação comum na LMA, indicando um papel de interação de mutações na patogênese desta

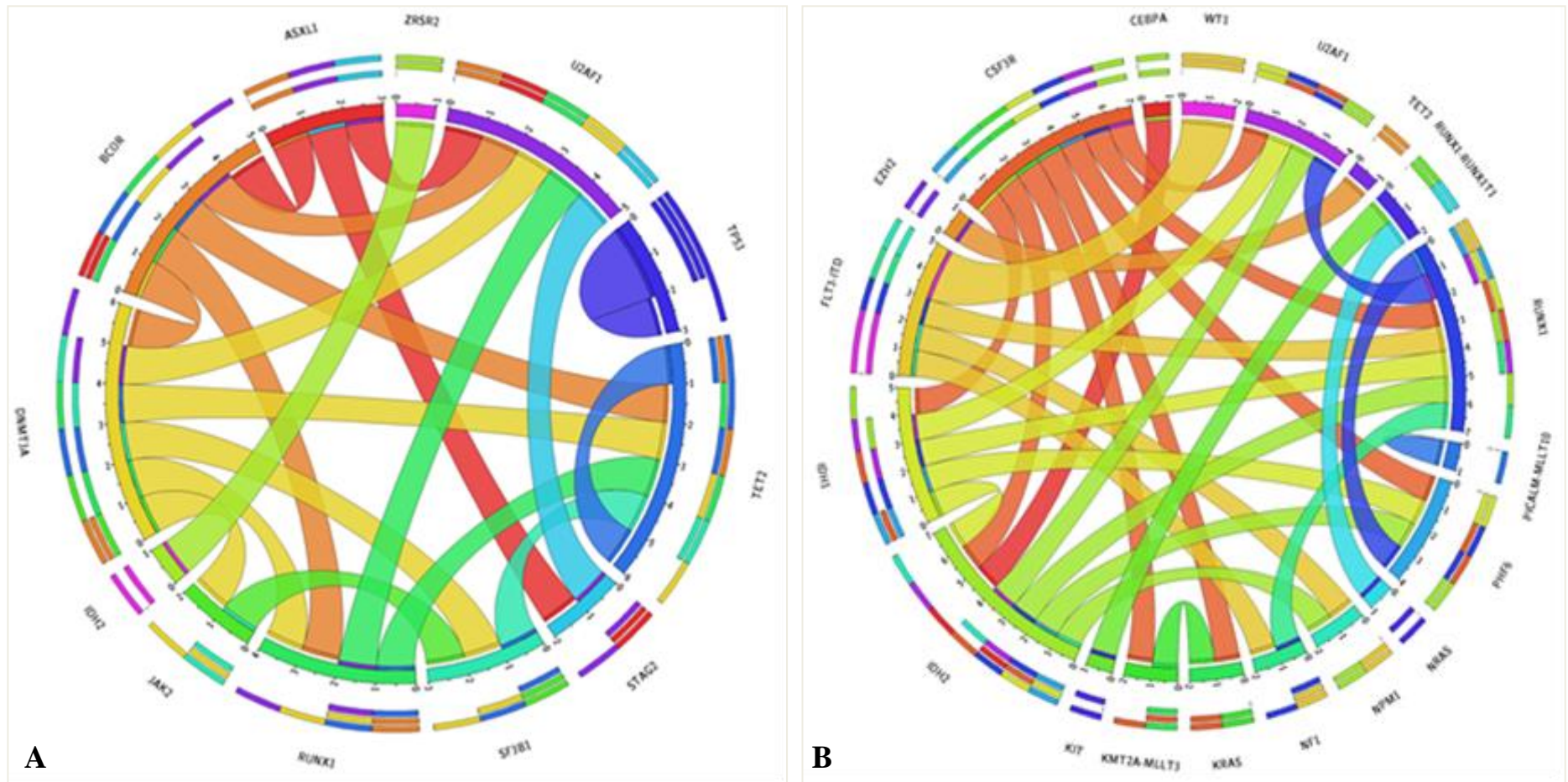
doença (HOU *et al.*, 2020). A figura 5 ilustra a concomitância de variantes na LMA (Figura 6A) e na SMD (Figura 6B). Dentre as variantes detectadas na LMA, apenas a fusão *PICALM::MLLT10* foi mutuamente exclusiva. Dentre as variantes concomitantes destacam-se *FLT3-ITD/WT1*, *FLT3-ITD/NPM1*, *NPM1/IDH2* e *CEBPA/IDH2*. Na SMD, apenas as variantes de *TP53* foram mutuamente exclusivas. Dentre os genes com concomitância de variantes, destacam-se *BCOR*, *DNMT3A*, *U2AF1* e *TET2*. As comutações podem não apenas refletir a história da evolução clonal da doença, mas também terem impacto importante no prognóstico e na previsão de sensibilidade à terapia alvo. Devido ao reconhecimento crescente a respeito da contribuição do panorama mutacional para a LMA e SMD, as classificações de risco mais recentes têm incorporado o impacto de variantes genéticas adicionais na definição da categoria de risco (BERNARD *et al.*, 2022; DÖHNER *et al.*, 2022). O status mutacional *FLT3-ITD/NPM1* define uma categoria de risco favorável ou intermediário na LMA. A categoria de risco favorável é definida pela presença de variante em *NPM1*, sem *FLT3-ITD*. A presença da variante *FLT3-ITD* com *NPM1* mutado ou selvagem define a LMA de risco intermediário. Entretanto, nas duas situações a concomitância de uma variante de prognóstico sabidamente adverso definirá uma LMA de risco adverso (DÖHNER *et al.*, 2022). Variantes somáticas nos genes *IDH1* e *IDH2* são detectadas em aproximadamente 20% dos casos de LMA (WANG *et al.*, 2021). Inibidores de proteínas IDH (por exemplo, enasidenib para *IDH2* mutante e ivosidenib para *IDH1* mutante) demonstram uma taxa de resposta de aproximadamente 40% em pacientes com LMA e *IDH1* ou *IDH2* mutante. Entretanto, a resistência primária e secundária a monoterapia são um desafio (STEIN *et al.*, 2017; DiNARDO *et al.*, 2018). Um estudo de Wang *et al.* (2021) mostrou que variantes em *IDH* em concomitância com variantes nos genes *CEBPA*, *RUNX1* e genes *RAS* são fatores críticos para a resistência adquirida aos inibidores de proteínas IDH. Adicionalmente, estudos mostram que a presença de variante em *WT1* tem valor prognóstico para a LMA com variante *FLT3-ITD*, podendo estar relacionada a resistência a terapia alvo e menor sobrevida (JAHN *et al.*, 2022). A frequência de variantes em *TP53* ao diagnóstico em concomitância com outras variantes é relativamente baixa, e maioria das variantes adicionais está relacionada a um antecedente de hematopoese clonal, envolvendo principalmente os genes *ASXL1*, *DNMT3A* e *TET2* (GROB *et al.*, 2022).

A frequência do alelo variante (VAF) das variantes de DNA detectadas variou de 4,2% a 87,5%. As NMs surgem da expansão de células-tronco progenitoras hematopoiéticas que adquirem mutações somáticas. O perfil molecular pode indicar a aquisição de variantes ao longo do tempo, e sugere-se que variantes com VAFs altos ocorrem no início da

leucemogênese e que mutações com VAFs menores sejam adquiridas mais posteriormente, em decorrência de evolução clonal (MILES *et al.*, 2020).

Bernard *et al* (2022) mostraram que pacientes com SMD e variantes *TP53* bialélica vs. monoalélica diferem significativamente na sobrevida global, sendo que os pacientes no estado bialélico de *TP53* têm uma mediana de sobrevida de 8,7 meses, enquanto os pacientes com estado monoalélico apresentaram uma mediana de sobrevida de 2,5 anos. Além disso, os pacientes no estado bialélico tem maior risco de transformação para LMA. A correta estratificação diagnóstica e prognóstica de pacientes com SMD requer avaliação do status mutacional de *TP53* e do seu o estado alélico (VAF). Uma variante *TP53* bialélica é definida pelo valor de VAF próximo ou maior que 50%, ou pela presença de duas ou mais variantes, ou ainda pela evidência da perda de heterozigosidade. O gene *TP53* recebeu especial consideração no novo IPSS-M para identificar verdadeiros pacientes com SMD de alto risco, sendo que o valor da VAF tem um peso nesta estratificação. No presente estudo foram detectadas variantes em *TP53* em três pacientes com SMD, com VAFs de 39,2%, 42,3% e 65,5%. Nos três casos o cariótipo era complexo e com monossomia do cromossomo 17, indicando o status bialélico da variante. A VAF é definida como a proporção de *reads* que carregam a variante em relação ao número total de *reads* em uma determinada posição de nucleotídeo. O painel OncoPrint™ Myeloid foi desenhado para detectar variantes somáticas com alta profundidade de cobertura, o que permite a detecção de variante com valores baixos de VAF. Entretanto, quando são detectadas variantes com VAFs entre 40% e 60% deve ser considerada a possibilidade de tratar-se de uma variante de linhagem germinativa (SCHRATZ e DEZERN, 2020). Neste estudo, foram detectadas variantes com VAF próximo a 50% em 12 genes: *ASXL1*, *CEBPA*, *FLT3*, *KIT*, *NF1*, *NPM1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1* e *WT1*. Entretanto, por tratar-se de um sequenciamento de DNA extraído de amostras de medula óssea ou sangue periférico, não foi possível afirmar se as variantes são somáticas ou germinativas. A presença de variantes germinativas tem implicações no tratamento dos pacientes com NMs. O diagnóstico precoce de SMD associada à predisposição germinativa permite uma maior vigilância para detectar sinais precoces de progressão da doença e, conseqüentemente, programar um oportuno transplante antes da progressão para LMA, o que muitas vezes representa um prognóstico adverso (CRISÀ *et al.*, 2021). Para confirmar a origem das variantes detectadas, as mesmas devem ser pesquisadas em tecido não neoplásico, preferencialmente a partir da cultura fibroblastos da pele. Desta forma, torna-se possível afirmar com segurança a origem de uma variante suspeita. Outra opção é a coleta cuidadosa de células da mucosa oral ou saliva utilizando swabs adequados.

Figura 6 – Circos plots ilustrando a frequência e concomitância de variantes



(A) SMD e (B) LMA. O comprimento do arco corresponde à frequência primeira variante e a largura da fita corresponde à porcentagem de pacientes portadores da segunda variante. Cada gene ou fusão gênica está representado por uma cor de fita partindo do arco interno do circos plot. Os arcos internos e externos representam as primeiras e segundas variantes, respectivamente. Para o gene *TP53* (SMD) e a fusão *PICALM::MLLT10* não há formação de fita, mostrando que as variantes ocorrem isoladas.

Para esclarecer a dúvida quanto a origem de uma determinada variante pode ser utilizado o sequenciamento Sanger através de primers desenhados especificamente para a variante de interesse (SCHRATZ e DEZERN, 2020).

As revisões mais recentes da classificação da OMS para as NMs definiram subtipos de doença associados à predisposição germinativa, incluindo a LMA, SMD, NMP e SMD/NMP que surgem em indivíduos com condições genéticas associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de NMs (ARBER *et al.*, 2016; KHOURY *et al.*, 2022). No presente estudo, em uma amostra de paciente jovem com diagnóstico de SMD foram detectadas duas variantes, uma no gene *ASXL1* e outra em *BCOR*. Este caso tinha o diagnóstico clínico prévio da síndrome de Emberger. Trata-se de uma doença rara causada pela deficiência de *GATA2*, associada a variantes germinativas (exônicas e intrônicas) no gene *GATA2*. *GATA2* é um fator de transcrição importante para a manutenção da dinâmica e equilíbrio da hematopoese, promovendo a proliferação das células precursoras mieloides. Variantes germinativas em *GATA2* levam à interrupção da hematopoiese normal e à perda de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, o que pode representar uma vantagem para células com variantes somáticas, uma vez que estas são caracterizadas por maior taxa de proliferação e sobrevivência (WEST *et al.*, 2022). Pacientes com deficiência de *GATA2* podem progredir de medula hipocelular para hiper celular, sugerindo hematopoese clonal. A hematopoese clonal precede a NM, e variantes em *ASXL1* e *DNMT3A* são comuns em pacientes com deficiência de *GATA2* e na hematopoese clonal (ABELSON *et al.*, 2018).

Os recentes avanços nos estudos de genômica nas NMs têm levado a revisões na classificação e algoritmos de prognóstico, sobretudo na SMD e LMA. Neste contexto os casos de SMD deste estudo foram estratificados quanto ao prognóstico de acordo com os critérios estabelecidos pelo IPSS-R e IPSS-M, utilizando as calculadoras de risco disponíveis on-line (<https://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/>, <https://mds-risk-model.com/>). A estratificação de risco IPSS-R baseia-se nos níveis de hemoglobina, a contagem de plaquetas e neutrófilos, na porcentagem de blastos na medula óssea e no cariótipo. Para o IPSS-M foram adicionados dados moleculares, como as variantes em *TP53* e *KMT2A*, que são pontuados separadamente. Há uma diferença no peso dado aos genes, sendo que 13 genes recebem peso individual (ex., *ASXL1*, *RUNX1*, *SF3B1*) e 15 genes são considerados residuais (ex., *BCOR*, *IDH1*, *STAG2*). Para sete (53,0 %) dentre os 13 pacientes com SMD houve alteração na classificação de risco, mostrando a relevante contribuição das variantes moleculares para melhor refinamento do risco na SMD (Tabela 2).



**Tabela 2 – Estratificação de risco IPSS-R e IPSS-M para o grupo de SMD**

Amostras	Hb	Neutrófilos	Plaquetas	% blastos	Cariótipo	Variantes NGS	IPSS-R		IPSS-M	
							Escore	Risco	Escore	Risco
1	10,1	1,5	159,0	3,2	46,XX[20]	não detectado	2,44	baixo	-1,08	baixo
2	7,0	0,9	98,0	0	46,XX[20]	<i>SF3B1, TET2</i>	2,72	baixo	-0,43	moderado baixo
3	13,4	3,8	18,0	1,5	46,XY[20]	não detectado	2,52	baixo	-1,60	muito baixo
4	9,0	0,4	61,0	12,0	46,XY[20]	<i>DNMT3A, TET2, RUNX1, U2AF1, BCOR</i>	6,0	alto	2,04	muito alto
5	9,0	0,5	53,0	7,8	complexo	<i>TP53</i>	8,1	muito alto	2,96	muito alto
6	6,2	1,7	83,0	0,8	46,XY[20]	<i>DNMT3A, SF3B1, JAK2</i>	3,1	intermediário	0,19	moderado alto
7	3,2	0,3	73,0	0	46,XY,del(9)(q13q22)[20]	<i>ASXL1, U2AF1, STAG2</i>	4,17	intermediário	1,8	muito alto
8	7,4	0,8	184,0	7,8	complexo	<i>TP53</i>	8,03	muito alto	2,92	muito alto
9	8,9	3,3	55,0	0	46,XY[20]	<i>ASXL1, BCOR</i>	1,53	baixo	-0,12	moderado baixo
10	8,0	0,8	103,0	2,5	46,XY[20]	<i>IDH2, ZRSR2</i>	2,44	baixo	0,11	moderado alto
11	8,5	0	396,0	0	46,XY[20]	não detectado	1,56	baixo	-1,30	baixo
12	9,2	1,2	35,0	34,0	complexo	<i>TP53</i>	9,03	muito alto	3,79	muito alto
13	15,4	0,7	159,0	0	45,X[4]//46,XY[6]	<i>TET2</i>	0,41	muito baixo	-2,28	muito baixo

**Hb, hemoglobina; IPSS-R, Revised International Scoring System; IPSS-M, Molecular International Scoring System**

Desde 2017 quando o European LeukemiaNet (ELN) publicou um trabalho com a classificação de risco genético para pacientes com LMA (DÖHNER *et al.*, 2017), houve considerável avanço no entendimento da doença, aliado aos novos conhecimentos sobre a patologia molecular deste grupo de NM. Recentemente, foi publicado um novo trabalho do ELN com atualizações quanto às recomendações e manejo de da LMA em adultos (DÖHNER *et al.*, 2022). Paralelamente à classificação da OMS em uma categoria de doença nomeada LMA com anormalidades genéticas recorrentes (ARBER *et al.*, 2016; KHOURY *et al.*, 2022), novos marcadores moleculares como BCOR, EZH2 e U2AF1, foram incorporados à estratificação de risco genético da LMA (DÖHNER *et al.*, 2022). Neste contexto os casos de LMA do presente estudo foram estratificados quanto às classificações de risco ELN 2010, ELN 2017 e ELN 2022 (Tabela 3).

**Tabela 3 – Estratificação de risco para o grupo de LMA**

Amostra	Cariótipo	NGS	ELN 2010	ELN 2017	ELN 2022
1	46,XX	<i>CSF3R, KRAS, KMT2A::MLLT10</i>	Adverso	Adverso	Adverso
2	47,XY,+14[18]/46,XY[2]	<i>CSF3R, IDH1, IDH2, RUNX1, U2AF1, PHF6</i>	Intermediário II	Adverso	Adverso
3	não realizado	<i>NRAS, RUNX1::RUNX1T1</i>	Favorável	Favorável	Favorável
4	NHC	<i>FLT3-ITD, NPM1</i>	-	Intermediário	Intermediário
5	NHC	<i>WT1, FLT3-ITD</i>	-	Adverso	Intermediário
6	46,XY,t(3;5)(q21;q31)[11]	<i>WT1, FLT3-ITD</i>	Intermediário II	Adverso	Intermediário
7	NHC	<i>PICALM::MLLT10</i>	Intermediário II	Intermediário	Intermediário
8	não realizado	<i>KIT, RUNX1::RUNX1T1</i>	Favorável	Favorável	Favorável
9	45,X,-Y[20]	<i>FLT3-ITD, NF1, RUNX1</i>	Intermediário I	Adverso	Adverso
10	45,XX,-7[13]/45,X,-X[2]	<i>IDH2, CEBPA</i>	Adverso	Adverso	Adverso
11	46,XX[20]	<i>NPM1, IDH2</i>	Favorável	Favorável	Favorável
12	complexo	<i>TET2, EZH2</i>	Adverso	Adverso	Adverso

**ELN, European LeukemiaNet; NHC, não houve crescimento celular.**

A estratificação de risco do ELN 2010 inclui dados de análises citogenéticas e de variantes em nos genes *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3* (DÖHNER *et al.*, 2010). Para duas amostras não foi possível estratificar o risco, uma vez que em dois casos não havia resultado citogenética, devido a falha na cultura celular. De acordo com a ELN 2010 a estratificação de risco para a LMA com variantes em *CEBPA*, *FLT3* e/ou *NPM1* está associada a presença do cariótipo normal. Em uma amostra o risco mudou de Intermediário I (ELN 2010) para adverso (ELN 2017 e ELN 2022). Esta diferença deve-se à inclusão do gene *RUNX1* a categoria de risco

adverso nas classificações de risco mais recentes. Em duas amostras houve mudança na classificação do risco de adverso (ELN 2017) para intermediário (ELN 2022). Esta mudança está relacionada à exclusão do valor da razão do alelo mutado/selvagem da variante *FLT3-ITD* da estratificação de risco na LMA (DÖHNER et al., 2022).

Estes resultados mostram a relevância da incorporação de outros marcadores moleculares na estratificação de risco da LMA, em adição às variantes de *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA*, principalmente nos casos de cariótipo normal e/ou não informativo. Embora as anormalidades genéticas moleculares tenham impacto reconhecido na estratificação de risco da SMD e LMA, a morfologia do sangue periférico e medula óssea e a citogenética permanecem como ferramentas de grande relevância para estas doenças, sobretudo na SMD.

### 3 Análise de expressão

Além da pesquisa de variantes somáticas e fusões gênicas, o painel OncoPrint<sup>TM</sup> Myeloid também possibilita a análise de expressão relativa dos genes *BALLC*, *MECOM*, *MYC*, *SMC1A* e *WT1* em relação a cinco genes controle de expressão constitutiva (*EIF2*, *FBXW2*, *PSMB2*, *PUM1* e *TRIM27*). A expressão dos cinco genes alvo foi normalizada em relação a expressão média dos cinco genes controles. Similarmente ao estudo de Jeon *et al.* (2022), foi calculada a razão do número de *reads* contadas para cada um dos cinco genes alvo em relação a média do número de *reads* contadas para os cinco genes controles, considerando as 34 amostras de RNA sequenciadas. Houve amplificação dos genes controles em todas as amostras sequenciadas. Para todas as amostras o número de *reads* mapeadas no painel de RNA foi superior a 5000, superando o número mínimo preconizado pelo fabricante do painel. O número médio de *reads* geradas para os cinco genes controles (*EIF2*, *FBXW2*, *PSMB2*, *PUM1* e *TRIM27*) foi 34.737. Foram identificadas falhas na amplificação do gene *MECOM* em seis dentre as 12 amostras de LMA e na amplificação do gene *WT1* em duas dentre as cinco amostras de NMP. Esta falha foi evidenciada pelo número de *reads* contadas inferior a 15, valor de corte do software Ion Reporter para análise de expressão. Desta forma, os genes *MECOM* e *WT1* não foram incluídos na análise estatística para comparação entre os grupos de doença. Não foi possível identificar uma causa para o menor número de *reads* contadas para estes genes, uma vez que os controles funcionaram. Os valores de razão gene alvo/controle são apresentados na Tabela 4. Considerando toda a coorte de NM, foi observada diferença na expressão entre os genes ( $p < 0,0001$ ). Quando as amostras foram agrupadas por doença, foi observada diferença significativa na expressão do gene *BAALC* ( $p = 0,007$ ) comparando SMD, LMA e NMP (Figura 7).

**Tabela 4 – Razão do número de reads de cada gene alvo em relação à média do somatório de reads dos cinco genes controle**

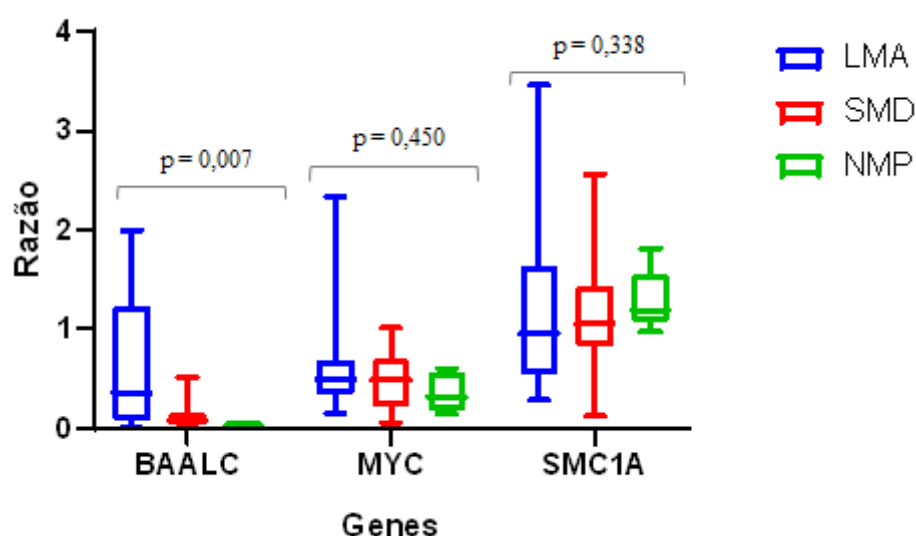
<b>Amostra</b>	<b>Doença</b>	<b>BAALC</b>	<b>MECOM</b>	<b>MYC</b>	<b>SMCIA</b>	<b>WT1</b>
1	LMA	0,073	1,138	0,331	0,914	0,207
2	LMA	0,439	0,013	0,403	0,988	0,024
3	LMA	1,569	0,000	0,587	0,684	0,057
4	LMA	0,002	0,000	0,147	0,287	0,100
5	LMA	0,072	0,000	0,214	0,280	0,132
6	LMA	1,315	0,002	1,364	3,371	1,487
7	LMA	0,992	0,009	2,338	3,460	0,681
8	LMA	0,906	0,000	0,499	0,479	0,079
9	LMA	1,997	0,006	0,531	1,001	0,024
10	LMA	0,272	0,010	0,660	1,137	0,002
11	LMA	0,084	0,000	0,334	0,850	0,165
12	LMA	0,002	0,000	0,702	1,808	0,000
13	LAFM	0,324	0,034	0,267	0,216	0,001
14	SMD	0,504	0,052	0,052	1,020	0,005
15	SMD	0,078	0,107	0,551	1,186	0,011
16	SMD	0,056	0,213	0,213	1,102	0,020
17	SMD	0,074	0,030	0,481	1,056	0,003
18	SMD	0,399	0,003	0,254	1,688	0,027
19	SMD	0,225	0,015	0,877	1,839	0,150
20	SMD	0,081	0,071	0,509	1,183	0,001
21	SMD	0,011	0,002	0,202	0,733	0,011
22	SMD	0,086	0,057	0,595	0,920	0,007
23	SMD	0,007	0,008	0,119	0,119	0,001
24	SMD	0,048	0,023	0,229	0,644	0,018
25	SMD	0,056	0,071	0,793	2,565	0,009
26	SMD	0,056	0,006	1,014	0,901	0,032
27	NMP	0,005	0,003	0,601	0,968	0,000
28	NMP	0,007	0,039	0,143	1,174	0,006
29	NMP	0,013	0,009	0,317	1,189	0,000
30	NMP	0,016	0,012	0,196	1,281	0,004
31	NMP	0,054	0,037	0,536	1,816	0,002
32	SMD/NMP	0,024	0,026	0,653	1,050	0,000
33	SMD/NMP	0,025	0,006	0,175	0,748	0,000
34	SMD/NMP	0,026	0,012	0,160	0,962	0,003
<b>Mediana</b>		0,072	0,013	0,442	1,010	0,006

**LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica, SMD/NMP, neoplasia mielodisplásica/ mieloproliferativa.**

Adicionalmente, foi observada diferença significativa na expressão de *WT1*, quando foram comparados apenas SMD e LMA. Devido às falhas de amplificação detectadas, os valores de

expressão de *WT1* e *MECOM*, foram excluídos das análises. Para os demais genes não foi observada diferença significativa na expressão entre os grupos (Tabela 5). Jeon *et al.* (2022) em um estudo utilizando o mesmo painel com amostras de LMA, observaram expressão insignificante de *MECOM* para a maioria das amostras, com mediana de expressão de 0,004; resultado semelhante ao observado em análises de RNA-seq. Neste mesmo estudo foi observada menor sobrevida global nos casos com expressão aumentada de *BAALC*. Foi avaliada a expressão de genes relacionados à hematopoese, diferenciação, proliferação celular e apoptose. Durante a hematopoese normal, o gene *BAALC* é expresso nas células progenitoras CD34<sup>+</sup>, enquanto sua expressão é perdida durante a diferenciação celular e quase ausente nas células sangue periférico normal de indivíduos saudáveis (BALDUS *et al.*, 2003). A superexpressão de *BAALC* está associada ao aumento da proliferação celular e redução da apoptose em células leucêmicas, mas seu principal efeito leucemogênico é o bloqueio da diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas (HEUSER *et al.*, 2012). Além disso, a superexpressão de *BAALC* parece estar associada à LMA de fenótipo imaturo e prognóstico adverso, especialmente em adultos com cariótipo normal (BALDUS *et al.*, 2003, SANTAMARIA *et al.*, 2010). Marjanovic *et al.* (2021) observaram expressão aumentada de *BAALC* em 38% dos pacientes com LMA. Entretanto, neste estudo a alta expressão de *BAALC* não se mostrou forte preditor de prognóstico adverso após análise estatística.

**Figura 7 – Box plot mostrando a expressão dos genes *BAALC*, *MYC* e *SMC1A***



LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica.

**Tabela 5 – Mediana, valores mínimo e máximo de expressão para cada gene avaliado**

Genes	SMD	LMA	NMP	Valor p*
<i>BAALC</i>	0,074 (0,007-0,504)	0,356 (0,002-1,997)	0,013 (0,005-0,054)	0,007
<i>MECOM</i>	0,030 (0,002-0,213)	-	0,012 (0,003-0,039)	0,182
<i>MYC</i>	0,481 (0,052-1,014)	0,515 (0,147-2,338)	0,317 (0,143-0,601)	0,450
<i>SMC1A</i>	1,056 (0,119-2,256)	0,951 (0,280-3,460)	1,189 (0,968-1,816)	0,338
<i>WT1</i>	0,011 (0,001-0,150)	0,100 (0,002-1,487)	-	0,002

**LMA, leucemia mieloide aguda; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD, neoplasia mielodisplásica. \*Kruskal-Wallis para comparação entre três grupos e Mann-Whitney para comparar dois grupos.**

Diferentemente dos linfomas de células B, o papel do gene *MYC* na patogênese das NMs ainda é pouco compreendido (GAO *et al.*, 2020). O proto-oncogene *MYC* desempenha um papel crucial na regulação da auto-renovação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas. A repressão da expressão da proteína *MYC* é necessária para a diferenciação mieloide, enquanto a desregulação de *MYC* estimula a proliferação e promove a leucemogênese (WILSON *et al.*, 2004). Estudos mostram a expressão aberrante do gene *MECOM* na LMA associada a rearranjos envolvendo o gene *KMT2A* (HINAI e VALK, 2016, PARK *et al.*, 2020). A proteína *SMC1A* é um membro do complexo multiproteína coesina, envolvido na coesão cromossômica durante a divisão celular e reparo de DNA. Estudos sugerem que alterações em *SMC1A* podem contribuir na leucemogênese através da separação prematura das cromátides irmãs (GADEWAL *et al.*, 2020). Um estudo de Hömme *et al.* (2010) associou a baixa expressão de *SMC1A* a uma menor sobrevida na LMA. Hipoteticamente, uma perda de expressão da proteína *SMC1A* levaria à instabilidade cromossômica e aneuploidia devido à interrupção da coesão entre as cromátides irmãs durante as mitoses. Entretanto, não foi observada correlação entre a expressão da proteína *SMC1A* e a presença de um cariótipo complexo ou mesmo de alterações cromossômicas específicas. O tamanho amostral reduzido foi uma limitação do presente estudo para resultados mais consistentes quanto à relevância da expressão dos cinco genes alvo do painel. Um caminho promissor para biomarcadores de LMA envolve a identificação de assinaturas de genes por análise de expressão gênica (SMALL *et al.*, 2022). Um estudo envolvendo 268 pacientes com LMA e cariótipo normal identificaram padrões de assinaturas gênicas distintas entre os pacientes que recaíram e aqueles que permaneceram em remissão completa (WALKER *et al.*, 2021). Em outro estudo com uma coorte de pacientes com diagnóstico recente LMA foi

observada uma correlação entre a baixa expressão dos genes *MECOM* e *MEIS* com melhores taxas de remissão completa e sobrevida livre de doença (ZHU *et al.*, 2017).

#### 4 Análises de sobrevida global

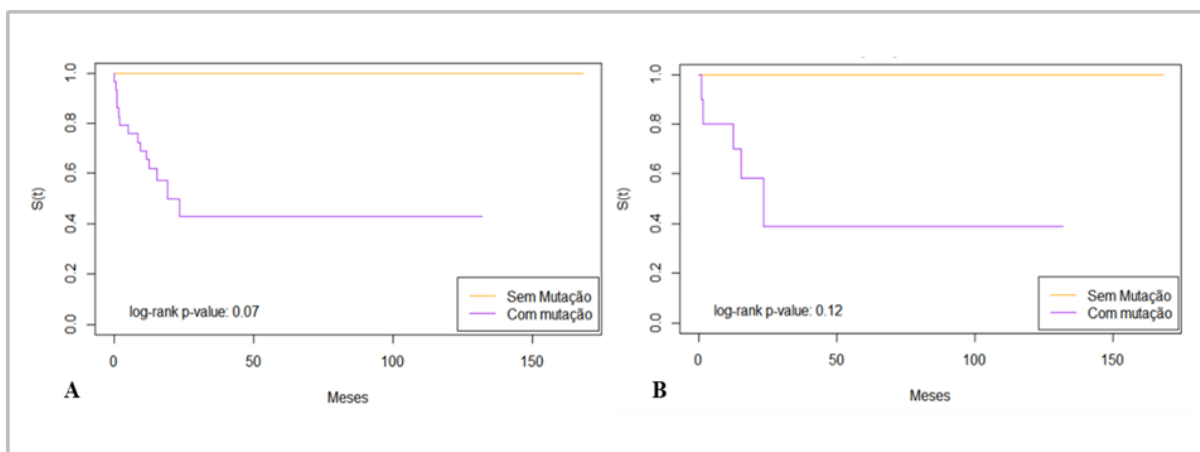
A sobrevida global foi calculada como o tempo desde o diagnóstico até o último dia de acompanhamento ou óbito. A mediana de sobrevida dos pacientes com NM foi de 15 meses (0,2 – 168 meses). Considerando cada grupo de NM a mediana de sobrevida dos pacientes com SMD foi de 18,0 meses (1,1 – 168,0 meses), e a média de sobrevida dos pacientes com LMA e NMP foi de 10,6 meses ( $\pm 8,4$ ) e 16,7 meses ( $\pm 7,3$ ), respectivamente. A sobrevida global foi avaliada quanto às variantes genéticas detectadas, quanto à expressão dos genes *SMC1A*, *MYC*, *BAALC*, *WT1* e *MECOM*; e quanto às razões RPL, RNL e RML.

##### 4.1 Análise de sobrevida global de acordo com as variantes genéticas

O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida e para ilustrá-la graficamente a sobrevida ao longo do tempo, associado ao teste log-rank, para comparação da sobrevida entre duas amostras. Para esta análise o evento de interesse foi o óbito do paciente. Considerando toda a coorte de pacientes com NM, 14 (41%) vieram a óbito. Entre os pacientes com LMA e SMD, o número de óbitos foram oito (67%) e cinco (42%), respectivamente. O único paciente com diagnóstico de LAFM veio a óbito 1,8 meses após diagnóstico. No grupo de NMP e SMD/NMP não ocorreram óbitos no período de acompanhamento. A sobrevida global foi avaliada considerando toda a coorte de NM, SMD e LMA. Devido ao tamanho amostral reduzido não foi avaliada a sobrevida global para os grupos NMP, SMD/NMP e LAFM. Considerando a presença ou ausência de variantes, não foi observada diferença na sobrevida para todo grupo de NMs ( $p = 0,07$ ) e para a SMD ( $p = 0,12$ ) (Figura 8). Uma vez que em todas as amostras do grupo de LMA foram detectadas pelo menos uma variante, não foi possível a divisão da amostra em dois grupos (com e sem variante) e a subsequente comparação entre eles. Posteriormente, foi avaliado se houve diferença na sobrevida global na coorte de NM considerando cada gene mutado individualmente. Foi observada diferença significativa na sobrevida global apenas para as variantes nos genes *FLT3-ITD* ( $p = 0,02$ ) e *TP53* ( $p = 0,02$ ) (Figura 9). Considerando que algumas variantes foram detectadas em apenas uma amostra, e algumas foram detectadas em concomitância com uma ou mais variantes, as análises também foram realizadas estratificando a sobrevida global por número de variantes. O número médio de variantes detectadas nas amostras foi de 2,2 variantes; incluindo variantes de DNA e fusões gênicas. As

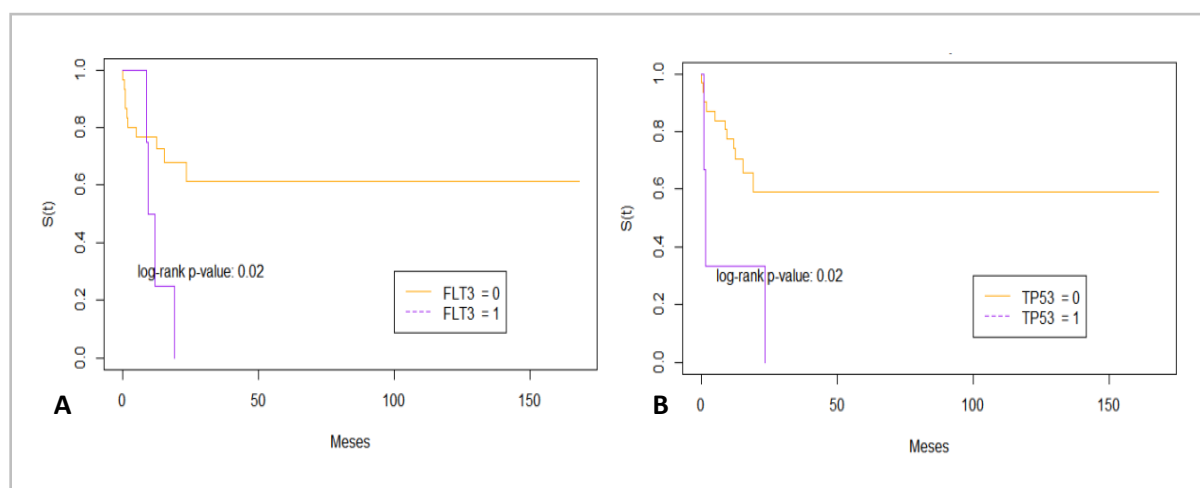
curvas de sobrevida foram construídas considerando: nenhuma variante, uma variante, duas variantes, e três ou mais variantes. Foi observada diferença na sobrevida quando avaliado todo o grupo de NM ( $p = 0,04$ ). Entretanto, não foi observada diferença significativa para a coorte de LMA ( $p = 0,11$ ) e SMD ( $p = 0,18$ ) (Figura 10).

**Figura 8 – Sobrevida global estratificada pela presença ou ausência de variante**



(A) NM e para (B) SMD. Eixo Y, probabilidade de sobrevida; eixo X, tempo em meses.

**Figura 9 – Sobrevida global na NM para as variantes *FLT3-ITD* e em *TP53***



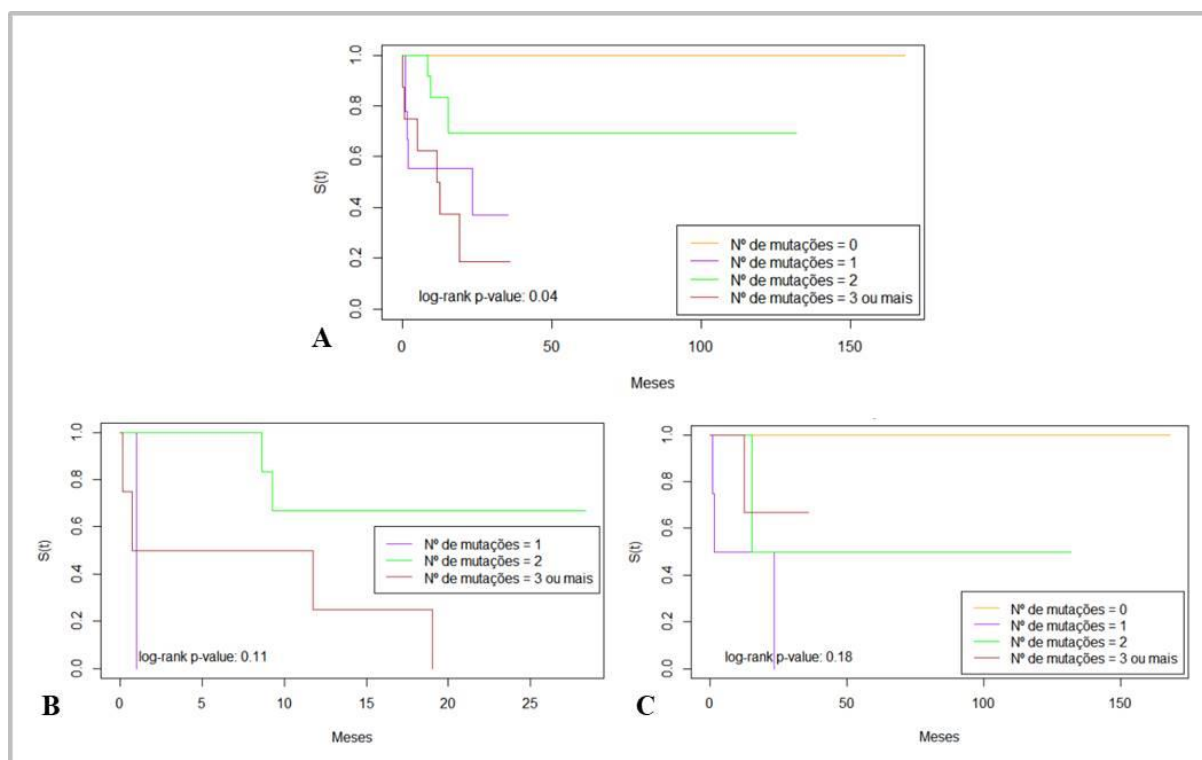
(A) *FLT3-ITD* e (B) *TP53*. 0, não óbito; 1, óbito. Eixo Y, probabilidade de sobrevida; eixo X, tempo em meses.

Para a coorte de NM, foi realizado o teste de LSD de Fisher para comparações múltiplas. Foi observado que o grupo de NM com nenhuma variante detectada difere dos grupos com uma variante ( $p = 0,023$ ) e com três ou mais variantes ( $p = 0,024$ ), mas não houve diferença



significativa quando comparado ao grupo com duas variantes ( $p = 0,109$ ). Também não foi observada diferença na sobrevida global quando comparados os grupos com uma e duas variantes ( $p = 0,307$ ), com uma e três variantes ( $p = 0,961$ ), e com duas e três variantes ( $p = 0,300$ ).

**Figura 10 – Sobrevida global estratificada pelo número de variantes**



(A) NM (B) LMA e (C) SMD. Eixo Y, probabilidade de sobrevida; eixo X, tempo em meses.

As análises realizadas mostraram que o número de variantes/amostra teve impacto na sobrevida global dos pacientes com NM dessa coorte, principalmente quando comparado com o grupo sem variantes. A menor sobrevida global nos casos em que foram detectadas as variantes *FLT3* (ITD) e *TP53* corroboram com a literatura em relação ao impacto destas variantes na estratificação de risco (DÖHNER *et al.*, 2022; BERNARD *et al.*, 2022). Embora algumas variantes isoladamente não tenham impacto na sobrevida, o número aumentado de variantes pode reduzir a sobrevida global e aumentar o risco de transformação para LMA (LUNDBERG *et al.*, 2014). Vale ressaltar que devido ao pequeno tamanho da amostra muitas diferenças visuais não são detectadas como diferenças estatísticas e alguns testes não puderam ser avaliados pelo fato de a amostra não poder ser dividida nos dois grupos necessários para realização do teste.

#### 4.2 Análise da sobrevida global para expressão dos genes *BAALC*, *MECOM*, *MYC*, *SMCIA* e *WT1*

Para esta análise as curvas de sobrevida foram geradas e comparadas a partir de um ponto de corte definido pela mediana de expressão de cada gene considerando dois grupos: < que a mediana *versus*  $\geq$  a mediana. A Tabela 6 mostra os p-valores do log-rank obtidos para as curvas de sobrevida comparando a expressão de cada gene em relação à mediana de expressão da amostra. Não foi observada diferença significativa para nenhum dos genes avaliados. Os resultados das análises para o gene *MECOM* na LMA foram desconsiderados devido às falhas na amplificação observada na metade das amostras deste grupo. A análise também não foi realizada para o grupo de NMP, devido à ausência de óbito neste grupo.

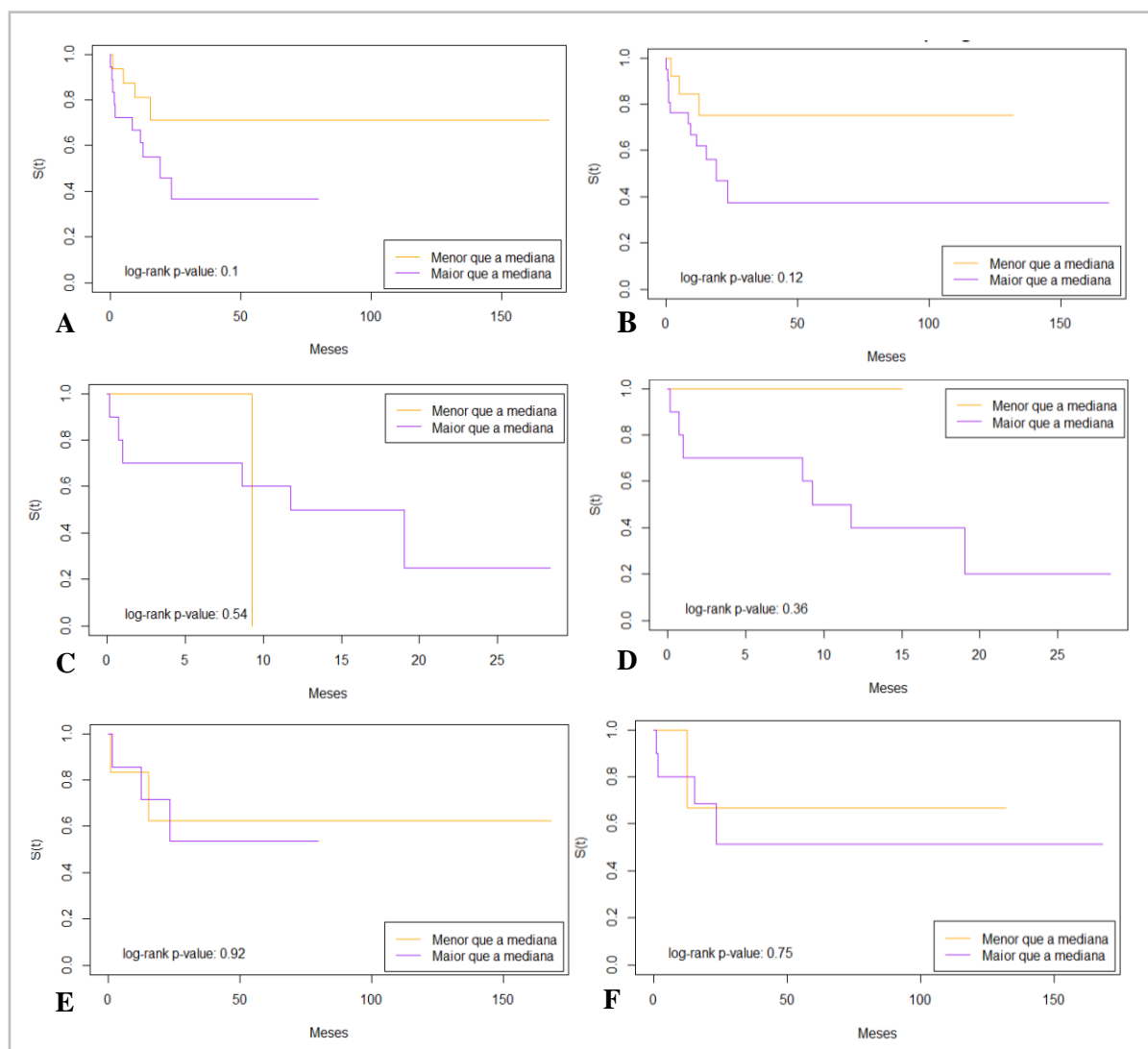
**Tabela 6 – Valor-p para os long-rank das curvas de sobrevida**

<b>Grupo</b>	<b><i>BAALC</i></b>	<b><i>MECOM</i></b>	<b><i>MYC</i></b>	<b><i>SMCIA</i></b>	<b><i>WT1</i></b>
NM	0,1	0,85	0,55	0,69	0,12
LMA	0,54	0,25	0,16	0,21	0,36
SMD	0,22	0,3	0,06	0,53	0,75

**NM, neoplasia mieloide; LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, neoplasia mielodisplásica.**

Embora tenha sido observada diferença na expressão do gene *BAALC* na comparação entre LMA, SMD e NMP, e na expressão de *WT1* entre LMA e SMD, não houve diferença na sobrevida global na amostra avaliada (Figura 11). Em estudo com 33 amostras de LMA utilizando o mesmo painel do presente estudo foi observada menor sobrevida global entre os pacientes com aumento da expressão de *BAALC* ( $p = 0,0327$ ) (JEON *et al.*, 2022). Outro estudo com uma coorte de 60 pacientes com LMA foi observada redução na sobrevida global ( $p = 0,0327$ ) entre os pacientes positivos para a expressão do gene *WT1*. Neste estudo foi utilizada a técnica de RT-qPCR (UJJ *et al.*, 2016). No presente estudo, devido ao reduzido tamanho da amostra, as diferenças visuais observadas entre as curvas de sobrevida não foram detectadas como diferença estatística. Embora alguns estudos mostrem diferenças na expressão dos genes avaliados neste estudo e em outros genes, assim como seu impacto na sobrevida dos pacientes, estudos adicionais com grandes coortes são necessários para padronizar a forma de determinar os valores de referência para definição de alta e baixa expressão.

**Figura 11 – Sobrevida global em relação à expressão dos genes *BAALC* e *WT1* no grupo de NM, na LMA e SMD.**

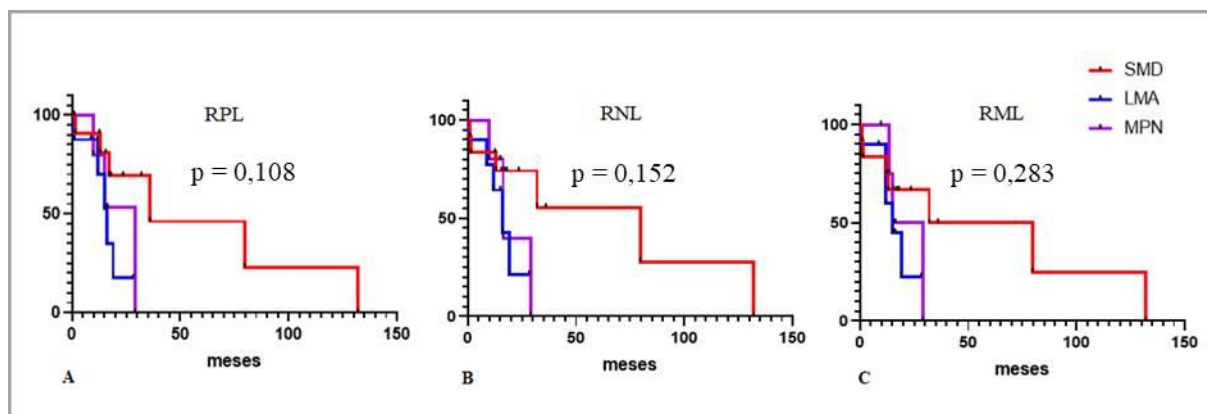


NM (A e B), na LMA (C e D) e na (E e F) SMD. A, C e E: expressão de *BAALC*; B, D e F: expressão de *WT1*. Eixo Y, probabilidade de sobrevida; eixo X, tempo em meses.

#### 4.3 Análise da sobrevida global para as relações RPL, RNL e RML

Para esta análise as curvas de sobrevida para as relações RPL, RML e RNL foram geradas e comparadas entre LMA, SMD e NMP. A mediana de cada score foi utilizada como ponto de corte. As amostras foram divididas em dois grupos considerando os valores de corte:  $<$  que a mediana e  $\geq$  a mediana. Comparando os três grupos de NM não foram observadas diferenças na sobrevida global para RPL ( $p = 0,108$ ), RNL ( $p = 0,152$ ) e RML ( $p = 0,283$ ), apesar das diferenças visuais observadas principalmente na LMA (Figura 12).

**Figura 12 – Sobrevida global para as razões RPL, RNL e RML comparando SMD, LMA e NMP**



(A) RPL, (B) RNL e (C) RML. Eixo Y, probabilidade de sobrevida; eixo X, tempo em meses.

Desde que Virchow descreveu pela primeira vez a presença de leucócitos nos tecidos neoplásicos e a correlação da inflamação com o câncer em 1863, numerosos estudos buscaram elucidar a conexão entre a inflamação e a progressão das neoplasias (IKWEGBUEL *et al.*, 2019). Estudos sugerem que as relações hematológicas, como a relação neutrófilo-linfócito (RNL), plaqueta-linfócito (RPL) e a relação linfócito-monócito (RML), podem prever o prognóstico de pacientes afetados por vários tipos de câncer, incluindo as neoplasias hematológicas (CHO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021; KAMIYA *et al.*, 2022). Entretanto, estudos adicionais em grandes coortes são necessários para definir valores de referência adequados para estes parâmetros, assim como seu impacto na sobrevida dos pacientes com NM, uma vez que alguns grupos são comumente acometidos por infecções oportunistas, frequentemente apresentam outras comorbidades, além da idade avançada.

## 5 Conclusão

Neste estudo, um painel comercial de NGS foi utilizado para investigar variantes somáticas em uma coorte prospectiva de 34 amostras de pacientes com diagnóstico de NM. Foi detectada pelo menos uma variante em 29 (85,3%) dentre as 34 amostras sequenciadas. Os genes frequentemente mutados em nossa coorte foram *TET2*, *IDH2*, *FLT3* e *ASXL1*. A LMA se destacou pela maior frequência de casos com variantes e pelo maior número de variantes por amostra. Foi observada uma frequência maior de variantes em genes que codificam reguladores epigenéticos, e fatores envolvidos na sinalização celular. Considerando a utilização dos critérios de estratificação de risco mais recentes do European LeukemiaNet

(ELN) e do IPSS molecular (IPSS-M), foi observada a contribuição da investigação de variantes genéticas por painel de NGS para a estratificação de risco dos pacientes com LMA e SMD, sobretudo nos casos de cariótipo normal ou na impossibilidade de realização do mesmo. Entretanto, a morfologia e a citogenética ainda tem papel crucial na estratificação dessas NMs. O painel de NGS utilizado também permitiu avaliar a expressão relativa de cinco genes com papel importante na regulação na hematopoese. Foi observada diferença na expressão dos genes *BAALC* e *WT1* quando os grupos de LMA, SMD e NMP. A análise de expressão foi limitada pelo reduzido tamanho e pela falha na amplificação em algumas amostras para os genes *MECOM*, na LMA, e *WT1*, na NMP. Adicionalmente, foram avaliadas as razões RPL, RNL e RML, com diferença significativa nos valores de razão RPL quando comparados os grupos de LMA, SMD e NMP. Embora estudos mostrem o potencial destes parâmetros para a avaliação de prognóstico de diversas doenças, a utilização dos mesmos na prática clínica demanda mais estudos para determinação de um valor de referência. Foi observada diferença na sobrevida global na coorte de pacientes com NM apenas para as variantes nos genes *FLT3-ITD* e *TP53*. Esta diferença também foi observada para o número de variantes por amostra. Vale ressaltar que devido pequeno tamanho da amostra diferenças visuais observadas não foram detectadas como diferenças estatísticas, e alguns testes não puderam ser avaliados pelo fato de a amostra não poder ser dividida nos dois grupos necessários para realização dos mesmos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NMs são um grupo heterogêneo de neoplasias das progenitoras hematopoiéticas resultantes de anormalidades genéticas que resultam em desregulação da proliferação, autorenovação e apoptose celular. O desenvolvimento da metodologia de NGS tem contribuído muito para o conhecimento da patogênese das NMs, e conseqüentemente tem permitido que alvos moleculares sejam incorporados à classificação, prognóstico e direcionamento deste grupo tão diverso de neoplasia hematológica. Os diferentes subgrupos de NMs são caracterizados por uma sobreposição de características clínicas e genômicas.

Os painéis de NGS permitem a investigação de diversas alterações genéticas de relevância clínica, em volume reduzido de amostra por paciente, através da multiplexação de diferentes amostras em uma única corrida de sequenciamento, e em período relativamente curto de tempo. Atualmente há alguns painéis comerciais que permite a investigação de variantes somáticas em amostras de sangue e aspirado medular. A técnica de NGS, assim como qualquer outra técnica de laboratório, tem suas vantagens, mas também limitações. Neste contexto, considerando a crescente utilização dos painéis de NGS na prática clínica, estes deve ter sua performance analítica avaliada antes de ser disponibilizado para utilização. Recomenda-se que sejam avaliadas a especificidade, sensibilidade, limite de detecção, reprodutibilidade e repetibilidade.

Este estudo avaliou a performance analítica de um painel comercial de NGS que permite a investigação de variantes somáticas de DNA (SNVs e indels) em 40 genes, sendo 23 genes hotspots e 17 genes completos (éxons). Paralelamente, também são investigadas fusões gênicas envolvendo 29 genes drivers, o que possibilita a investigação de até 600 diferentes fusões gênicas. Embora o painel utilizado possibilite a avaliação da expressão de outros cinco genes, esta aplicação não teve sua performance avaliada, pois atualmente não está recomendada para utilização na prática clínica.

Usando controles comerciais de referência, o ensaio demonstrou alta sensibilidade e especificidade para variantes de DNA, e alta sensibilidade para as fusões gênicas avaliadas. O LOD de aproximadamente 5% para variantes de DNA se mostrou dentro do valor esperado para SNVs e pequenas indels. Os ensaios de DNA e fusões gênicas apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, valores altos de CV (>20%) foram observados para grandes indels do controle comercial. O ensaio avaliado não detecta as variantes *CEBPA*

c.68\_69insG, *ASXL1* c.1900\_1922del23 e *ASXL1* c.1934\_1935insG, uma vez que estas estão localizadas em regiões ricas em GC e em longos homopolímeros, respectivamente. A detecção acurada de variantes em regiões ricas em GC e homopolímeros ainda são um desafio para a metodologia de NGS. Esta limitação também foi constatada pela menor profundidade de cobertura de algumas regiões do gene *CEBPA*.

Foram sequenciadas 34 amostras de DNA e RNA de pacientes com diagnóstico de NM. Em 85,2% das amostras sequenciadas foi detectada pelo menos uma variante, sendo 33 SNVs, 24 indels e seis fusões gênicas. Os genes *TET2*, *IDH2*, *FLT3* e *ASXL1* destacaram-se pela maior frequência de variantes. Foi observada diferença na sobrevida na coorte de NM quanto à presença de variantes nos genes *FLT3* e *TP53*, e quanto ao número de variantes detectadas por amostra, principalmente quando comparados os grupos sem variante e aqueles  $\geq 3$  variantes. Este estudo mostrou a contribuição das alterações moleculares para o diagnóstico e estratificação das NMs, principalmente na LMA e SMD. Foi observado que algumas variantes em genes como o *TP53*, *FLT3-ITD* e *CEBPA* detectadas isoladamente têm impacto definido no prognóstico da doença, mas a concomitância de variantes com outros genes, pode alterar o prognóstico. Embora a investigação do perfil molecular das NMs por NGS tenham ganhado relevância para a prática clínica nos últimos anos, sua utilização nos serviços públicos e privados de saúde de Brasil ainda é muito limitada. Isto se deve ao alto custo dos painéis de NGS, mas sobretudo da estrutura de equipamentos, insumos e expertise técnica demandada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, S. *et al.* Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018;559(7714):400-404.
- ALSHEMMARI, S. H.; RAJAN, R.; EMADI, A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review. *Med Princ Pract*. 2016;25(6):501-509.
- ARAKI, M. *et al.* Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016; 127:1307-1316.
- ARAKI, M.; KOMATSU, N. The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2020;111(2):200-205.
- ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
- AWADA, H.; THAPA, B.; VISCONTE, V. The Genomics of Myelodysplastic Syndromes: Origins of Disease Evolution, Biological Pathways, and Prognostic Implications. *Cells*. 2020;9(11):2512.
- AZZATO E.M., BAGG A. Molecular genetic evaluation of myeloproliferative neoplasms. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015, 37 (Suppl. 1), 61-71.
- BALDUS, C. D. *et al.* BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1051-6.
- BALLEN, K. K. *et al.* Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:358–367.
- BARBUI, T. *et al.* White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: A subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood* 2015, 126, 560–561.
- BARBUI, T. *et al.* Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5128-33.
- BARBUI, T. *et al.* Practice-relevant revision of IPSET thrombosis based on 1019 patients with WHO defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer J* 2015; 5: e369
- BARBUI, T. *et al.* The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 8, 15 (2018).
- BARBUI, T. *et al.* Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. Epub ahead of print 27 February 2018.



- BAROSI, G. *et al.* Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: An ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood* 2013, 121, 4778–4881.
- BEER, P. A. *et al.* *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112:141-9.
- BEHDAD, A. *et al.* A clinical grade sequencing-based assay for CEBPA mutation testing: report of a large series of myeloid neoplasms. *J Mol Diagn.* 2015;17(1):76-84.
- BEJAR, R. *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011; 364:2496-2506.
- BEJAR, R. *et al.* Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2012 Sep 20;30(27):3376-82.
- BEJAR, R. *et al.* Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32:2691-2698.
- BÉNÉ, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia.* 2011;25(4):567-574.
- BENETATOS, L.; VARTHOLOMATOS, G. Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(11):1999-2009.
- BENNETT, J.M. *et al.* The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol.* 1994;87(4):746-54.
- BERNARD, E. *et al.* Molecular International Prognostic Scoring System, *NEJM Evid* 1 2022;1(7):1-14.
- BILL, M. *et al.* Mutational landscape and clinical outcome of patients with de novo acute myeloid leukemia and rearrangements involving 11q23/*KMT2A*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Oct 20;117(42):26340-26346.
- BLECUA, P., MARTINEZ-VERBO L., ESTELLER, M. The DNA methylation landscape of hematological malignancies: an update. *Mol Oncol.* 2020;14(8):1616-1639.
- BOETTCHER, S. *et al.* A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. *Science.* 2019;365(6453):599-604.
- BOSE P., VERSTOVSEK, S. Updates in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ther Adv Hematol.* 2019;10:2040620719870052.
- BRANDFORD, S. *et al.* Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood.* 2018 Aug 30;132(9):948-961.

CABAGNOLS, X. *et al.* Presence of atypical thrombopoietin receptor (*MPL*) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* 2016;127:333-42.

CARBONELL, D. *et al.* Next-Generation Sequencing Improves Diagnosis, Prognosis and Clinical Management of Myeloid Neoplasms. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1364.

CAZZOLA M.; KRALOVICS R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; 123: 3714–3719.

CERQUOZZI, S.; TEFFERI, A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: A literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J.* 2015, 5, e366.

CERVANTES F.; PASSAMONTI F.; BAROSI G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22(5):905e14.

CHACHOUA I. *et al.* Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016; 127:1325-1335.

CHAUFFAILLE, M. L. *et al.* Diagnósticos em Hematologia. Manole. 2016 (1): 167-185.

CHEN, Y. *et al.* Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013 27:836-842.

CHEN, S.; BENBARCHE, S.; ABDEL-WAHAB, O. Splicing factor mutations in hematologic malignancies. *Blood*. 2021;138(8):599-612.

CHESON, B. D. *et al.* World Health Organization (WHO) international working group. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3671-4.

CHO, U. *et al.* Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200936.

CORTES J., O'DWYER M. E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18:671-84.

CRISÀ, E. *et al.* Genetic Predisposition to Myelodysplastic Syndromes: A Challenge for Adult Hematologists. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2525.

DELIC, S. *et al.* Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2016 Nov;175(3):419-426.

DELLA PORTA, M. G. *et al.* Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWGPM). *Leukemia*. 2015;29:1502-1513.

DiNARDO, C. D. *et al.* Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med.* 2018;378(25):2386-2398.

DINGLI, D. *et al.* Presence of unfavorable cytogenetic abnormalities is the strongest predictor of poor survival in secondary myelofibrosis. *Cancer.* 2006;106, 1985–1989.

DIPERSIO, J. F. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014 Dec;20(12):1472-8.

DÖHNER, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010 Jan 21;115(3):453-74.

DÖHNER, H. E. E. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424-427.

DÖHNER, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022;140(12):1345-1377.

FADERL, S. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine.* 1999; 341(3):164–172.

FERRONE, C. K. *et al.* Validation, Implementation, and Clinical Impact of the OncoPrint Myeloid Targeted-Amplicon DNA and RNA Ion Semiconductor Sequencing Assay. *J Mol Diagn.* 2021;23(10):1292-1305.

GADEWAL, N. *et al.* miRNA-mRNA Profiling Reveals Prognostic Impact of SMC1A Expression in Acute Myeloid Leukemia. *Oncol Res.* 2020;28(3):321-330.

GALÁN-DÍEZ M.; CUESTA-DOMÍNGUEZ A.; KOUSTENI S. 2017. The bone marrow microenvironment in health and myeloid malignancy. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a031328.

GANGAT, N. *et al.* Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol.* 2009 Jul;83(1):17-21.

GANGAT, N. *et al.* DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 1;29(4):392-7.

GANGAT, N.; TEFFERI, A. Myelofibrosis biology and contemporary management. *Br J Haematol.* 2020;191(2):152-170.

GAO, L. *et al.* High-level MYC expression associates with poor survival in patients with acute myeloid leukemia and collaborates with overexpressed p53 in leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Lab Hematol.* 2021;43(1):99-109.

GARZA, J., ANDERSON, J.M., SCHERBER, R.M. Assessing Symptom Burden in Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm Overlap Patients. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2020;34(2):475-489.

GENOVESE, G. *et al.* Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25;371(26):2477-87.

GERDS, A. T. *et al.* A Phase 2 Study of Luspatercept in Patients with Myelofibrosis-Associated Anemia. *Blood.* 2019b;134:557–557.

GIDARO, A. *et al.* Laboratory and clinical risk assessment to treat myelodysplastic syndromes. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Sep 1;54(9):1411-26.

GIRODON, F. *et al.* Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients. *Leukemia.* 2010;24:900–903.

GREENBERG, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89:2079-2088.

GREENBERG, P. The myelodysplastic syndromes. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, et al. eds. *Hematology: Basic Principles and Practice.* 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2000; 1106-1129.

GREENBERG, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120:2454-2465.

GREENBERG, P. L. *et al.* Myelodysplastic Syndromes, Version 3.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;15:60-87.

GRIMWADE, D. H. B.; IVEY, A. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127(1):29-41.

GROB, T. *et al.* Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2022;139(15):2347-2354.

HAFERLACH, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014 Feb;28(2):241-7.

HAIDER, M. *et al.* New Insight Into the Biology, Risk Stratification, and Targeted Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017;37:480-494.

HARRISON, C.; MCLORNAN, D. Myelofibrosis, *Hematology.* 2014; 19(2):120-121.

HARRISON, C. N. *et al.* Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* 2017;4:e317–e324.

HASSERJIAN, R. P. Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology.* 2019;86(1):7-13.

HEATH, E. M. *et al.* Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia.* 2017;31(4):798-807.

HELBIG, G. Classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: focus on mutations and *JAK2* inhibitors. *Med Oncol* 2018;35(9):119.

HEUSER, M. *et al.* Functional role of *BAALC* in leukemogenesis. *Leukemia*. 2012;26(3):532-6.

HINAI A. A., VALK P.J. Review: Aberrant *EVII* expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;172(6):870-8.

HOFFBRAND, V. A.; MOSS, P. A. H. Fundamentos de Hematologia de Hoffbrand. *Artmed*. 2018(7):146.

HÖMME, C. *et al.* Low *SMC1A* protein expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia. *Oncol Rep*. 2010;24(1):47-56.

HU, T. *et al.* Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021;82(11):801-811.

HULCRANTZ, M. *et al.* Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *J Clin Oncol* 2012;30(24):2995e3001.

IKWEGBUE, P.C. *et al.* Interplay between heat shock proteins, inflammation and cancer: a potential cancer therapeutic target. *Am J Cancer Res*. 2019;9(2):242-249.

International Prognostic Scoring System (IPSS-M) for Myelodysplastic Syndromes Risk Assessment Calculator. Disponível em: <https://mds-risk-model.com/>.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>. Acesso em 13/12/2020.

IURLO, A. *et al.* New Perspectives on Polycythemia Vera: From Diagnosis to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 13;21(16):5805.

IURLO, A. *et al.* Cytogenetic study in primary myelofibrosis at diagnosis: Clinical and histological association and impact on survival according to WHO 2017 classification in an Italian multicenter series. *Hematol Oncol*. 2020 Sep 26. doi: 10.1002/hon.2808.

IZEVBAYE, I. *et al.* Clinical Validation of a Myeloid Next-Generation Sequencing Panel for Single-Nucleotide Variants, Insertions/Deletions, and Fusion Genes. *J Mol Diagn*. 2020;22(2):208-219.

JAHN, N. *et al.* Genomic landscape of patients with *FLT3*-mutated acute myeloid leukemia (AML) treated within the CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia*. 2022;36(9):2218-2227.

JAISWAL, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2488-98.

JAMIESON, C. H. *et al.* Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis, C.M.L. N. Engl. J. Med. 2004; 351: 657-667.

JANN, J. C.; TOTHOVA, Z. Cohesin mutations in myeloid malignancies. Blood. 2021;138(8):649-661.

JENNINGS, L. J. *et al.* Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(3):341-365.

JEON, M.J. *et al.* Performance evaluation and clinical impact of the OncoPrint Myeloid Research Assay for gene expression analysis in myeloid haematologic malignancies. J Clin Pathol. 2022;23:jclinpath-2022-208425.

JIANG, Y. *et al.* TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) Serves as a Potential Target for Hepatocellular Carcinoma by Enhancing Tumor Immune Infiltration. Front Immunol. 2021;12:612139.

JULIUSSON, G.; HOUGH R. Leukemia. Prog Tumor Res. 2016;43:87-100.

JUMNIENSUK, C. *et al.* Concordance of Peripheral Blood and Bone Marrow Next-Generation Sequencing in Hematologic Neoplasms. Adv Hematol. 2022; 26:8091746.

KALINKOVA, L. *et al.* Targeting DNA Methylation in Leukemia, Myelodysplastic Syndrome, and Lymphoma: A Potential Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Tool. Int J Mol Sci. 2022;24(1):633.

KAMIYA, N. *et al.* Matsumura M. Monocyte-to-Lymphocyte Ratio in the Diagnosis of Lymphoma in Adult Patients. Int J Gen Med. 2022;15:4221-4226.

KAZI, J.U.; RÖNNSTRAND L. *FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3*: From Basic Science to Clinical Implications. Physiol Rev. 2019 Jul 1;99(3):1433-1466.

KHAN, I.; EKLUND, E. E.; GARTEL, A. L. Therapeutic Vulnerabilities of Transcription Factors in AML. Mol Cancer Ther. 2021;20(2):229-237.

KOENECKE, C. *et al.* Impact of the revised International Prognostic Scoring System, cytogenetics and monosomal karyotype on outcome after allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia evolving from myelodysplastic syndromes: a retrospective multicenter study of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. Haematologica. 2015;100(3):400-8.

KHOURY, J.D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Leukemia. 2022;36(7):1703-1719.

KIM, B. *et al.* Detection of recurrent, rare, and novel gene fusions in patients with acute leukemia using next-generation sequencing approaches. Hematol Oncol. 2020;38(1):82-88.

KLAMPFL, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013; 369:2379-239.

KVASNICKA, H. M. *et al.* European LeukemiaNet study on the reproducibility of bone marrow features in masked polycythemia vera and differentiation from essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2017; 92:1062-1067.

LASHO, T. L. *et al.* *SRSF2* mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 2012;120:4168-4171.

LEVY, M. A. *et al.* Implementation of an NGS-based sequencing and gene fusion panel for clinical screening of patients with suspected hematologic malignancies. *Eur J Haematol.* 2019;103(3):178-189.

LI, Y. *et al.* Clinical implications of genome-wide DNA methylation studies in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017 2;10(1):4.

LIN, X.; HUANG, H.; CHEN, P. Retrospective analysis of the clinical features of 172 patients with *BCR-ABL1*-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Mol Cytogenet.* 2020;13:8.

LIN, Y. *et al.* Prognostic role of *TET2* deficiency in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(26):43295-43305.

LINDSLEY, R. C.; EBERT, B. L. The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. *Blood.* 2013;122(23):3741-8.

MA, W. *et al.* MPL mutation profile in *JAK2* mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:34-9.

MAES, B. *et al.* Targeted next-generation sequencing using a multigene panel in myeloid neoplasms: Implementation in clinical diagnostics. *Int J Lab Hem.* 2017;1-9.

MASAROVA, L.; VERSTOVSEK, S. Emerging drugs for essential thrombocythemia. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2019;24(2):93-105.

MARCHIOLI, R. *et al.* Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2224-2232.

MARCHIOLI, R. *et al.* Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2013;368:22-33.

MARJANOVIC, I. *et al.* Prognostic significance of combined *BAALC* and *MNI* gene expression level in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Int J Lab Hematol.* 2021 Jun;43(3):433-440.

MARTINEZ-TRILLOS, A. *et al.* Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: Results in 40 patients. *Ann Hematol* 2010;89:1233-1237.

MATYNIA, A. P. *et al.* Molecular genetic biomarkers in myeloid malignancies. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(5):594-601.

MCMULLIN, M. F.; ANDERSON, L. A. Aetiology of Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers (Basel).* 2020 Jul; 12(7): 1810.

MEDINA, E. A.; DELMA, C. R.; YANG, F. C. ASXL1/2 mutations and myeloid malignancies. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):127.

MESA, R. A. *et al.* International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res.* 2007 Jun;31(6):737-40.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018 32: 273-284.

MILES, L. A. *et al.* Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature.* 2020;587(7834):477-482.

MILOSEVIC, F. J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel *MPL* and *JAK2* mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016;127:325-32.

MINCIACCHI V.R., KUMAR R., KRAUSE DS. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells.* 202110;10(1):117.

MIRANDA-FILHO, A. *et al.* Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol.* 2018;5(1):e14-e24.

MITTELMAN, M. *et al.* The lower risk MDS patient at risk of rapid progression. *Leuk Res.* 2010 Dec;34(12):1551-5.

MONTANARO, M. *et al.* Thrombosis and survival in essential thrombocythemia: a regional study of 1,144 patients. *Am J Hematol.* 2014;89:542-546.

MORA, B.; PASSAMONTI, F. Developments in diagnosis and treatment of essential thrombocythemia. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(3):159-171.

MUGHAL, T. I. *et al.* An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2015;100(9):1117-30.

MULAS, O. *et al.* Prognostic Role of Cell Blood Count in Chronic Myeloid Neoplasm and Acute Myeloid Leukemia and Its Possible Implications in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(10):2493.

MURATI, A. *et al.* Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* 2012, 12:1-15.



NANGALIA, J.; GREEN, A. R. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*. 2017; 130(23):2475-2483.

NARAYANAN, D.; WEINBERG, O. K. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(1):3-15.

NORTHRUP, V. *et al*. The Value of Next-Generation Sequencing in the Screening and Evaluation of Hematologic Neoplasms in Clinical Practice. *Am J Clin Pathol*. 2020;153(5):639-645.

NYBAKKEN, G. E.; BAGG, A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. *J Mol Diagn*. 2014;16:145-158.

O'DONNELL, M. R. *et al*. Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;15(7):73-74.

ORAZI A, GERMING U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia*. 2008;22(7):1308-19.

O'SULLIVANJ. M.; HARRISON, C. N. Myelofibrosis: clinicopathologic features, prognosis, and management. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018 Feb;16(2):121-131. PMID: 29741513.

PAPAEMMANUIL, E. *et al*. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Somatic *SF3B1* mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365:1384-1395.

PAPAEMMANUIL, E. *et al*. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122:3616-3627.

PAPAEMMANUIL E. *et al*. Genomic Classification and prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-2221.

PARDANANI, A. *et al*. Prevalence and clinicopathologic correlates of *JAK2* exon 12 mutations in *JAK2V617F*-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21: 1960-1963. 5.

PARK, J. *et al*. Analytical and Potential Clinical Performance of Oncomine Myeloid Research Assay for Myeloid Neoplasms. *Mol Diagn Ther*. 2020;24(5):579-592.

PASSAMONTI, F. *et al*. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2004; 117: 755–761.

PASSAMONTI, F. *et al*. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2813-6.

PASSAMONTI F. *et al*. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012;120(6):1197-201.

PATEL U. *et al.* Diagnostic, Prognostic, and Predictive Utility of Recurrent Somatic Mutations in Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17S:S62-S74.

PELCOVITS A.; NIROULA R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020 Apr 1;103(3):38-40.

PIETRA, D. M. *et al.* Differential clinical effects of different mutation subtypes in *CALR* mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016; 30:431-438.

PLATZBECKER, U. Treatment of MDS. *Blood.* 2019;133(10):1096-1107.

QUINTÁS-CARDAMA A., CORTES J. E. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:973-988.

RAHMAN, N. T. *et al.* MRTFA augments megakaryocyte maturation by enhancing the SRF regulatory axis. *Blood Adv.* 2018;2(20):2691-2703.

RAHMAN, M. A. *et al.* Recurrent SRSF2 mutations in MDS affect both splicing and NMD. *Genes Dev.* 2020;34(5-6):413-427.

REILY, J.T. Pathogenetic insight and prognostic information from standard and molecular cytogenetic studies in the *BCR-ABL*-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Leukemia* 2008; 22:1818–1827.

Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndromes Risk Assessment Calculator. Disponível em: <https://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/>.

RIETHER, C.; SCHÜRCH, C. M.; OCHSENBEIN, A. F. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ* 2014;22(2):187-98.

RUGGERI, M. *et al.* The rate of progression to polycythemia vera or essential thrombocythemia in patients with erythrocytosis or thrombocytosis. *Ann. Intern. Med.* 2003; (139):470–475.

RUMI, E. *et al.* *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123: 1544-1551.

RUMI, E. *et al.* The Genetic Basis of Primary Myelofibrosis and Its Clinical Relevance. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 24;21(23):8885.

SABOUR, L.; SABOUR, M.; GHORBAN, S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res.* 2017;23(2):225-234.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.

SANGIORGIO, V.F.I., ORAZI, A., ARBER, D.A. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: are morphology and immunophenotyping still relevant? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2020;33(2):101139.

SANTAMARÍA, C. *et al.* BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol.* 2010;89(5):453-8.

SCHANZ, J. *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012;30:820-829.

SCHISCHLIK, F.; KRALOVICS, R. Mutations in myeloproliferative neoplasms - their significance and clinical use. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(11):961-973.

SCHRATZ, K. E., DEZERN A. E. Genetic Predisposition to Myelodysplastic Syndrome in Clinical Practice. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2020;34(2):333-356.

SEVER, M. *et al.* Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leuk. Lymphoma* 2013, 54, 2667–2670.

SHAHSIAH, R. *et al.* Validation of a next generation sequencing panel for detection of hotspot cancer mutations in a clinical laboratory. *Pathol Res Pract.* 2017;213(2):98-105.

SMALL, S. *et al.* Role of Biomarkers in the Management of Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14543.

SMITH, E. C. *et al.* MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood.* 2012;120(11):2317-29.

SONG, M. K. *et al.* Targeted Therapeutic Approach Based on Understanding of Aberrant Molecular Pathways Leading to Leukemic Proliferation in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5789.

SOOD, R.; KAMIKUBO, Y.; LIU P. Role of *RUNX1* in hematological malignancies. *Blood.* 2017;129(15):2070–2082.

SPIVAK, J. L. How I treat polycythemia vera. *Blood* 2019, 134, 341–352.

STEENSMA, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9-16.

STEENSMA, D. P. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018 May 24;8(5):47.

STEFANIUK, P. *et al.* The Neutrophil to Lymphocyte and Lymphocyte to Monocyte Ratios as New Prognostic Factors in Hematological Malignancies - A Narrative Review. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2961-2977.

STEIN, B. L. *et al.* Historical views, conventional approaches, and evolving management strategies for myeloproliferative neoplasms. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015 Apr;13(4):424-34.

STEIN, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;130(6):722-731.

STIREWALT, D.L.; RADICH, J.P. The role of *FLT3* in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2003 Sep;3(9):650-65.

SWOLIN, B.; RÖDGER, S.; WESTIN, J. Therapy-related patterns of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome post polycythemia vera: Single center experience and review of literature. *Ann. Hematol.* 2008, 87, 467-474.

TAKEI, H.; KOBAYASHI, S. S. Targeting transcription factors in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2019;109(1):28-34.

TEFFERI, A. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342:1255-1265.

TEFFERI, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* and *IKZF1*. *Leukemia* 2010;24(6):1128-38.

TEFFERI, A. How I treat myelofibrosis. *Blood.* 2011;117:3494-504.

TEFFERI, A. *et al.* Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia.* 2013;27:1874-1881

TEFFERI, A. *et al.* Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014;124(16):2507-13.

TEFFERI, A. *et al.* CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28:1472–1477.

TEFFERI A. *et al.* CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;24:1494-1500.

TEFFERI, A. CME Information: Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2015 J H 90:162–173.

TEFFERI, A. *et al.* Targeted next-generation sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood.* 2015; 126:354–354.

TEFFERI, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol.* 2016 Jan;91(1):50-8.

TEFFERI, A. *et al.* Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv.* 2016; 1:21-30.

TEFFERI, A. *et al.* Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*, in press. *Blood Adv*. 2016;1 (2): 105–111.

TEFFERI, A. *et al.* Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am J Hematol*. 2018 Mar;93(3):348-355.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Mutations and prognosis in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 2019; May;60(5):1112-1113.

TEFFERI, A. *et al.*; Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2020; Apr;189(2):291-302.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96(1):145-162.

THOMPSON P.A., KANTARJIAN H.M., CORTES J. E. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(10):1440-54.

TIU, R.V. *et al.* Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117(17):4552-60.

TORTOLANI, P. J. *et al.* Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. *Blood*. 1995; 85:3444–3451.

VALENT, P. *et al.* Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017; 8 (43): 73483-73500.

VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(1):130-134.

VANNUCHI, A. M. *et al.* Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008;22:1299-1307.

VANNUCCHI, A. M. *et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:1861–1869.

VARDIMAN, J. W. *et al.* Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;31(4).

VASSALO V.; MAGALHÃES, S. M. M. Myelodysplastic syndromes and diseases with myelodysplastic and myeloproliferative features. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009; 31 (4):267-272.

VELLOSO, E. D. R. P. *et al.* Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda: revisão e descrição de casos. *Einstein (São Paulo)* [online]. 2011, vol.9, n.2, pp.184-189.

VINY, A. D.; LEVINE, R. L. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer J* 2014;20:61-5.

VOSBERG, S. *et al.* Close Correlation of Copy Number Aberrations Detected by Next-Generation Sequencing with Results from Routine Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Genes Chromosom Cancer*. 2016;55(7):553-567.

VOSO, M. T. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013;31:2671-2677.

VU, H.L.; APLIN, A. E. Targeting TBK1 inhibits migration and resistance to MEK inhibitors in mutant NRAS melanoma. *Mol Cancer Res*. 2014;12(10):1509-19.

WALKER, C. J. *et al.* Gene expression signature predicts relapse in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2021;5(5):1474-1482.

WANG, J. *et al.* Analysis of TET2 and EZH2 gene functions in chromosome instability in acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2020 Feb 17;10(1):2706.

WANG, R. Q. *et al.* Characteristics and prognostic significance of genetic mutations in acute myeloid leukemia based on a targeted next-generation sequencing technique. *Cancer Med*. 2020 Nov;9(22):8457-8467.

WANG, F. *et al.* Leukemia stemness and co-occurring mutations drive resistance to IDH inhibitors in acute myeloid leukemia. *Nat Commun*. 2021;12(1):2607.

WELCH, J. S. Patterns of mutations in TP53 mutated AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018;31(4):379-383.

WEIS, T.M. *et al.* Clinical considerations for the use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;141:125-138.

WEST, R. R. *et al.* ASXL1 and STAG2 are common mutations in GATA2 deficiency patients with bone marrow disease and myelodysplastic syndrome. *Blood Adv*. 2022;6(3):793-807.

WILSON, A. *et al.* c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004;18(22):2747-63.

XIE, M. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9-16.

YIN, Y.; BUTLER, C.; ZHANG, Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol*. 2021;82(11):812-819.

YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544-1557.

ZHANG, Y. *et al.* CSF3R Mutations are frequently associated with abnormalities of RUNX1, CBFβ, CEBPA, and NPM1 genes in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2018 Aug;124(16):3329-3338.

ZHANG, Q. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with prognosis and response to chemotherapy in patients with non-M3 de novo acute myeloid leukemia. *Transl Cancer Res*. 2021;10(2):1013-1024.

ZHOU, A.; OH, S. T. Prognostication in MF: from CBC to cytogenetics to molecular markers. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(2):155-64.

ZHU, Y. M. *et al.* Gene mutational pattern and expression level in 560 acute myeloid leukemia patients and their clinical relevance. *J Transl Med*. 2017;15(1):178.

## 8 ANEXOS

## Anexo A – Relação das amostras e anormalidades genéticas detectadas no estudo

Nº	Sexo	Idade	Doença	Cariótipo	Gene	Tipo	Variante	VAF (%)
1	F	68	SMD	45,X[4]/46,XY[6]	<i>TET2</i>	indel	c.4861_4862delCT, p.Leu1621PhefsTer39	8,4
2	F	81	SMD	46,XX,der(6;7)(q10;q10)[20]	nd			
3	F	62	SMD	46,XX[10]	<i>SF3B1</i>	SNV	c.1873C>T, p.Arg625Cys	10,3
					<i>TET2</i>	indel	c.4013_4014insA, p.Lys1339GluTer5	7,2
4	M	83	SMD	46,XY[30]	nd			
5	M	70	SMD	46,X,Yqh-[13]	<i>DNMT3A</i>	SNV	c.2644C>T, p.Arg882Cys	39,8
					<i>TET2</i>	indel	c.3750_3751delGA, p.Glu1250AspfsTer17	38,7
					<i>RUNX1</i>	SNV	c.497G>A, p.Arg166Gln	38,8
					<i>U2AF1</i>	SNV	c.101C>T, p.Ser34Phe	39,9
					<i>BCOR</i>	SNV	c.466C>T, p.Gln156Ter	62,7
6	M	80	SMD	45,XY,add(5)(q13),-17,-18,add(20)(q13.2),add(21)(q22),+mar[2]/46,XY[18]	<i>TP53</i>	SNV	c.796G>T, p.Gly266Ter	39,2
7	M	74	SMD	46,XY[29]	<i>DNMT3A</i>	SNV	c.2206C>T, p.Arg736Cys	40,7
					<i>SF3B1</i>	SNV	c.2098A>G, p.Lys700Glu	41,3
					<i>JAK2</i>	SNV	c.1849G>T, p.Val617Phe	4,2
8	M	58	SMD	46,XY,del(9)(q13q22)[20]	<i>ASXL1</i>	SNV	c.1972G>T, p.Gly658Ter	45,2
					<i>U2AF1</i>	SNV	c.101C>T, p.Ser34Phe	48,1
					<i>STAG2</i>	indel	c.1418delT, p.Leu473TyrfsTer20	87,5

Continuação



Nº	Sexo	Idade	Doença	Cariótipo	Gene	Tipo	Variante	VAF (%)
9	M	73	SMD	46~50,XY,inv(1)?(p22q42),add(5)(q31),del(5)(q13q33),del(9)(q12),add(11)(p15),-13,-17,-20,add(21)(p11.2),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5[cp10]/ 46,XY[10]	<i>TP53</i>	SNV	c.818G>A, p.Arg273His	65,5
10	M	44	SMD	46,XY[12]	<i>ASXL1</i>	indel	c.1914_1951del37, p.Thr639ArgfsTer6	46,0
					<i>BCOR</i>	indel	c.2254delA, p.Arg752GlnfsTer34	14,3
11	M	81	SMD	46,XY[22]	<i>IDH2</i>	SNV	c.419G>A, p.Arg140Gln	39,7
					<i>ZRSR2</i>	indel	c.440_450delTGGAATGGT, p.Leu147TyrfsTer21	74,0
12	M	45	SMD	46,XY [30]	nd			
13	M	75	SMD	44~45,XY,add(7)(q11.2),del(7)(q11.2),del(12)(q13),-13,-14,add(15)(p11.2),?del(16)(q22),-17,-19,-20,add(21)(p11.2),der(?)t(?;14)(?;q11.2),+mar1,+mar2,+mar3[cp7]/46,XY[13]	<i>TP53</i>	SNV	c.659A>G, p.Tyr220Cys	42,3
14	F	24	LMA	46,XX [30]	<i>CSF3R</i>	indel	c.2427_2428insC, p.Ser810GlnfsTer6	6,5
					<i>KMT2A::MLLT3</i>	fusão		
15	M	74	LMA	47,XY,+14[18]/46,XY[2]	<i>KRAS</i>	SNV	c.35G>A, p.Gly12Asp	18,4
					<i>CSF3R</i>	SNV	c.1853C>T, p.Thr618Ile	52,9
					<i>IDH1</i>	SNV	c.394C>T, p.Arg132Cys	10,0
					<i>IDH2</i>	SNV	c.419G>A, p.Arg140Gln	11,2
					<i>RUNX1</i>	SNV	c.592G>A, p.Asp198Asn	43,1
					<i>U2AF1</i>	SNV	c.251A>C, p.Gln84Pro	47,7
				<i>PHF6</i>	indel	c.977_978delGT, p.Cys326Ter	35,4	

Continuação

Nº	Sexo	Idade	Doença	Cariótipo	Gene	Tipo	Variante	VAF (%)
16	M	21	LMA	Não realizado	<i>NRAS</i>	SNV	c.181C>A, p.Gln61Lys	5,4
					<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	fusão		
17	M	23	LMA	NHC	<i>NPM1</i>	indel	c.864_865delGCinsTCATAA, p.Trp288CysfsTer12	45,2
					<i>FLT3-ITD</i>	indel	c.1775_1775delTinsTTGATTTTCAGAGAATATGAATA, p.Phe594_Asp600dup	41,3
18	F	18	LMA	NHC	<i>WT1</i>	SNV	c.1399C>T, p.Arg467Trp	39,3
					<i>WT1</i>	indel	c.1156_1159dup, p.Ala387ValfsTer4	5,3
					<i>FLT3-ITD</i>	indel	c.1796_1797ins51, p.Gly583_Tyr599dup	35,4
19	M	27	LMA	46,XY,t(3;5)(q21;q31)[11]	<i>WT1</i>	indel	c.1147_1148delCT, p.Leu383CysfsTer6	40,7
					<i>FLT3-ITD</i>	indel	c.1788_1789ins66, p.Glu596_Tyr597ins	34,3
20	M	20	LMA	NHC	<i>PICALM::MLLT10</i>	fusão		
21	M	38	LMA	Não realizado	<i>KIT</i>	indel	c.1255_1257delGAC, p.Asp419del	43,5
					<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	fusão		
22	M	72	LMA	45,X,-Y[20]	<i>FLT3-ITD</i>	indel	c.1783_1803dup, p.Arg595_Leu601dup	79,9
					<i>NF1</i>	indel	c.1020delT, p.Val341SerfsTer35	44,0
					<i>RUNX1</i>	indel	c.256_257insCGGGCGAGCTGGTG, p.Thr92AlafsTer35	22,9
23	F	76	LMA	45,XX,-7[13]/45,X,-X[2]	<i>IDH2</i>	SNV	c.419G>A, p.Arg140Gln	33,4
					<i>CEBPA</i>	indel	c.578_590delACCCGCACCCGCC, p.His193ArgfsTer121	50,4
24	F	59	LMA	46,XX[20]	<i>NPM1</i>	indel	c.863_864insTCTG, p.Trp288CysfsTer12	37,7
					<i>IDH2</i>	SNV	c.419G>A, p.Arg140Gln	33,0

Continuação

Nº	Sexo	Idade	Doença	Cariótipo	Gene	Tipo	Variante	VAF(%)
25	M	68	LMA	45~47,XY,add(5)(q31),add(6)(q21),del(10)(q22q24),del(11)(q21q23),-12,-13,add(13)(q34),add(14)(p12),del(16)(q22),ins(17;?) (q21;?),add(20)(q11.2),+mar1,+mar2,+mar3[cp4]/46,XY[16]	<i>TET2</i>	indel	c.3129_3130insT, p.Lys1044Ter	30,4
					<i>TET2</i>	indel	c.5058_5061delCCAG, p.Ser1686ArgfsTer8	30,1
					<i>EZH2</i>	SNV	c.2051G>A, p.Arg684His	32,2
26	F	64	NMP	46,XX[14]	<i>TANK::MKL1</i>	fusão		
27	M	38	NMP	46,XY,t(5;99;22)(q31;q34;q11.2)[20]	<i>ASXL1</i>	SNV	c.3202C>T, p.Arg1068Ter	42,4
					<i>BCR::ABL1</i>	fusão		
28	F	76	NMP	46,XX[20]	<i>TET2</i>	SNV	c.2428C>T, p.Gln810Ter	46,9
					<i>JAK2</i>	SNV	c.1849G>T, p.Val617Phe	45,3
29	M	41	NMP	46,XY [20]	<i>MPL</i>	SNV	c.1544G>T, p.Trp515Leu	11,2
30	F	81	NMP	Não realizado	nd			
31	M	68	SMD/NMP	46,XY[20]	<i>SF3B1</i>	SNV	c.2098A>G, p.Lys700Glu	45,9
32	F	80	SMD/NMP	46,XX,der(6;7)(q10;q10)[20]	<i>TET2</i>	indel	c.2573delA, p.Lys858ArgfsTer15	50,2
					<i>TET2</i>	SNV	c.2671C>T, p.Gln891Ter	45,8
33	M		SMD/NMP	Não realizado	nd			
34	F	24	LAFM	NHC	<i>IDH1</i>	SNV	c.394C>T, p.Arg132Cys	6,1
					<i>IDH2</i>	SNV	c.419G>A, p.Arg140Gln	5,6

LMA, leucemia mieloide aguda; SMD, neoplasia mielodisplásica; NMP, neoplasia mieloproliferativa; SMD/NMP, neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; SNV, variante de nucleotídeo único; VAF, frequência do alelo variante; nd, não detectado; NHC, não houve crescimento celular.

## Anexo B – Parecer CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação *in vitro* de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas

**Pesquisador:** Adriano de Paula Sabino

**Área Temática:**

**Versão:** 9

**CAAE:** 02177612.0.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E  
TECNOLOGICO-CNPQ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.072.805

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de uma Emenda ao projeto: "Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação *in vitro* de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas" já aprovado por este Comitê.

Justificativa da Emenda: "Atualmente pelas características das análises em andamento, não está havendo necessidade de recrutamento de voluntários, coleta de materiais biológicos e nem intervenção por parte da pesquisa em quaisquer condutas na internação e assistência dos pacientes assistidos no HC-UFMG. As análises laboratoriais do presente trabalho estão sendo conduzidas em amostras sanguíneas já colhidas e processadas na rotina assistencial dos pacientes do HC-UFMG, cujos resultados já foram liberados aos médicos solicitantes. Tais amostras são selecionadas pelos pesquisadores no momento do descarte, que ocorre uma vez por semana no setor de hematologia/bioquímica. As pesquisas de novos biomarcadores nessas amostras que seriam descartadas não terão impactos às condutas clínicas dos respectivos pacientes, pois trata-se de pesquisa básica visando a descoberta de potenciais novos biomarcadores e alvos terapêuticos nestas amostras descartadas. Os dados serão avaliados no coletivo, sem qualquer

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2ª Sala 2005 2º Campus Pampulha

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

identificação dos pacientes assistidos no serviço. O projeto se configura em um projeto amplo, eixo principal da linha de pesquisa do pesquisador responsável: Oncologia. Vale ressaltar que se para objetivos futuros houver necessidade de coleta do TCLE, este será coletado de acordo com as normas vigentes. Diante do exposto acima, do uso de amostras de descarte, solicito dispensa do TCLE. Desde já agradeço a atenção e aguardo retorno. Conforme carta resposta em anexo, as sugestões foram acatadas e o TCLE será obtido dos pacientes."

Sobre o estudo: O câncer pode ser definido como uma doença na qual as células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos. As células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo por meio dos sistemas sanguíneos e linfáticos. Várias alterações genéticas podem ser necessárias para a transformação de um célula saudável para um câncer. Portanto, a avaliação de alterações cromossômicas é utilizada para estabelecer o risco de câncer e triagem da doença. A proliferação de células normais é regulada por oncogenes promotores do crescimento contrabalançados por inibidores do crescimento e genes supressores de tumores. O desenvolvimento do câncer pode envolver a ativação ou expressão alterada de oncogenes e/ou perda ou inativação de um gene supressor de tumor. A detecção precoce do câncer oferece a melhor chance de cura quando o tumor é pequeno o suficiente para ser completamente removido cirurgicamente, mas a maioria dos tumores não produzem sintomas até serem demasiadamente grandes ou até que as células cancerosas tenham se espalhado para outros tecidos, processo conhecido como metástase. A maioria dos oncogenes produz proteínas que funcionam em alguma fase da ativação de células para a proliferação e a sua ativação leva à divisão celular. Muitos oncogenes estão associados a malignidades hematológicas. Alguns oncogenes importantes são RAS, HER2 e BCR/ABL. A oncogenicidade dos genes supressores de tumores é derivada de perda do gene em vez de sua ativação. BRCA1 e BRCA2 são exemplos de genes supressores de tumores. As leucemias são neoplasias que surgem a partir do tecido hematopoiético. São proliferações clonais, originadas de células que sofreram mutações na sequência de bases do DNA, ou rearranjos cromossômicos com expressão inadequada de oncogenes e/ou inibição de mecanismos de controle proliferativo. Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, como a predisposição genética, a exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno. Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo das células hematopoiéticas na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, dependendo

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

do subtipo, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia. Segundo o Instituto de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no Brasil, no ano de 2014, estimou-se um risco de 5,20 casos novos de leucemia para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres [2]. As incidências desses casos diagnosticados e estimados demonstraram a necessidade de uma boa articulação da clínica médica com a pesquisa laboratorial e os procedimentos terapêuticos corretos. Além de evitar a oneração do Sistema de Saúde, uma conduta bem fundamentada aumentaria a sobrevivência dos pacientes acometidos. A classificação correta do tipo e subtipo de leucemia/tumor sólido é imprescindível para o melhor tratamento de cada caso. No entanto, além das características imunofenotípicas que já estão estabelecidas para orientação na clínica médica, muitas outras mutações e fatores prognósticos distintos têm sido correlacionados e têm sido investigados.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Investigar do ponto de vista celular, molecular e plasmática, biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação *in vitro* de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia/tumores sólidos.

##### **Objetivo Secundário:**

Análise Celular e Molecular - Avaliação de ciclo celular - Avaliação da apoptose - Avaliação de vias de sinalização molecular (genes, mRNA, MirRNAs) - Análise de perfil de proteínas - Análise de perfil metabólico Biomarcadores plasmáticos - Busca por novos biomarcadores plasmáticos de diagnóstico e prognóstico nas leucemias linfóides, mielóides e mielodisplasia/Tumores sólidos;

- Quantificar micropartículas circulantes de diferentes origens celulares;
- Avaliar a capacidade de cada tipo de micropartícula em carrear um determinado cluster de miRNAs selecionado, servindo como ponte entre a célula de origem e o alvo;
- Testes *in vitro*- Conduzir teste *in vitro* de atividade antitumoral com moléculas sintéticas em amostra de pacientes e linhagens de leucemias linfóides, mielóides e mielodisplasia/tumores sólidos;
- Correlacionar os parâmetros avaliados com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com os autores:

Na Plataforma Brasil:

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

**Riscos:**

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com experiência e capacidade técnica e em local com infra-estrutura adequada. Em caso de punção de medula, este procedimento será realizado pelo seu médico hematologista ou patologista.

**Benefícios:**

Espera-se obter resultados que possibilitem fornecer explicações sobre as complexas alterações genéticas em portadores de neoplasias hematológicas/não hematológicas, além de identificar possíveis marcadores de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Acredita-se que os resultados ajudarão a esclarecer a relação dos eventos regulatórios e o desenvolvimento das alterações neoplásicas hematológicas/não hematológicas, bem como poderão contribuir para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica, para o tratamento das mesmas.

**No TCLE:**

**Benefícios:**

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa. O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de câncer beneficiem outros pacientes.

**Riscos:**

Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. Os materiais utilizados nessa pesquisa serão somente aqueles considerados excedentes dos coletados para exames laboratoriais de rotina para o seu diagnóstico. Os riscos físicos e inconvenientes não serão diferentes daqueles previstos durante os procedimentos normais para a obtenção de amostras biológicas para o diagnóstico da sua doença. O seu médico irá informá-la em detalhes sobre os

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

riscos associados aos procedimentos adicionais de biópsia e da coleta de sangue, uma vez que o nível do risco dependerá de onde o(s) tumor(es) está(ão) localizado(s) no seu corpo. De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

Como os procedimentos de biópsia, coleta de sangue, punção na medula são realizados para fins de tratamento (e não da pesquisa), os riscos e benefícios desses procedimentos não devem ser considerados como riscos da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para a Oncologia. Término previsto para 01/08/2024. Os pesquisadores esclarecem que "Não há previsão de interrupção da pesquisa, salvo alguma situação especial que não é possível prever no momento. - Não haverá custos para a instituição envolvida na pesquisa. O estudo será custeado por instituições de fomento à pesquisa."

Trata-se de uma emenda com a seguinte justificativa: "Atualmente pelas características das análises em andamento, não está havendo necessidade de recrutamento de voluntários, coleta de materiais biológicos e nem intervenção por parte da pesquisa em quaisquer condutas na internação e assistência dos pacientes assistidos no HC-UFMG. As análises laboratoriais do presente trabalho estão sendo conduzidas em amostras sanguíneas já colhidas e processadas na rotina assistencial dos pacientes do HC-UFMG, cujos resultados já foram liberados aos médicos solicitantes. Tais amostras são selecionadas pelos pesquisadores no momento do descarte, que ocorre uma vez por semana no setor de hematologia/bioquímica. As pesquisas de novos biomarcadores nessas amostras que seriam descartadas não terão impactos às condutas clínicas dos respectivos pacientes, pois trata-se de pesquisa básica visando a descoberta de potenciais novos biomarcadores e alvos terapêuticos nestas amostras descartadas. Os dados serão avaliados no coletivo, sem qualquer identificação dos pacientes assistidos no serviço. O projeto se configura

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br



Continuação do Parecer: 5.072.805

em um projeto amplo, eixo principal da linha de pesquisa do pesquisador responsável: Oncologia. Vale ressaltar que se para objetivos futuros houver necessidade de coleta do TCLE, este será coletado de acordo com as normas vigentes. Diante do exposto acima, do uso de amostras de descarte, solicito dispensa do TCLE. Desde já agradeço a atenção e aguardo retorno. Conforme carta resposta em anexo, as sugestões foram acatadas e o TCLE será obtido dos pacientes.\*

Os autores esclareceram que a coleta de sangue venoso e de sangue de medula, são realizadas rotineiramente, como parte da rotina assistencial aos pacientes pela Clínica Médica e parte deste material coletado será utilizados na pesquisa. Os riscos da pesquisa foram reformulados no TCLE, porém, ainda fazem referência aos procedimentos de biópsia e coleta de sangue, que não são procedimentos da pesquisa.

Foi adequadamente anexado Termo de constituição de biorrepositório.

Em relação à solicitação de dispensa de TCLE: o material a ser utilizado na pesquisa trata-se de amostra biológica dos participantes, que têm o direito de saberem que parte de seu material (como amostras de sangue) estão sendo utilizados para fins de pesquisa também. Assim, deverá ser solicitada autorização aos participantes para o uso de suas amostras biológicas para fins de pesquisa. Os autores concordaram com este posicionamento e nas Informações Básicas da Pesquisa anexadas na Plataforma Brasil não solicitaram a dispensa.

Em relação ao TCLE:

- caso haja participante menor, deve ser incluído um TALE e um TCLE para o responsável;
- numerar as páginas e inserir campo para rubrica do participante e do pesquisador responsável nas páginas que não contém assinatura;
- em relação aos benefícios da pesquisa, relatar que não existem benefícios DIRETOS aos participantes, e que os benefícios indiretos são os descritos em adquirir conhecimentos para futuros diagnósticos e intervenções;
- em relação aos riscos, sugiro remover a seguinte sentença, já que não se refere a riscos da pesquisa: \*De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 205 Sala 2005 2 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha." Para a pesquisa, considerar o risco de identificação dos participantes, e o que será feito para minimizar esse risco (anonimização);

- Informar que caso algum risco relacionado à pesquisa se manifeste, o participante terá direito à indenização e/ou atendimento especializado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Além dos documentos já anexados para o projeto original e as emendas anteriores, para esta Emenda foram anexados ainda os seguintes documentos:

- Informações Básicas do Projeto atualizadas na Plataforma Brasil;
- Carta-resposta ao parecer 4.888.698;
- TCLE;
- TCLE alterado;
- Termo de constituição de biorepositório;
- Carta-resposta às pendências documentais.

**Recomendações:**

Recomenda-se:

Em relação ao TCLE:

- caso haja participante menor, deve ser incluído um TALE e um TCLE para o responsável em próxima emenda (este parecer somente está aprovando participantes maiores de 18 anos, não curatelados);
- numerar as páginas e inserir campo para rubrica do participante e do pesquisador responsável nas páginas que não contém assinatura;
- em relação aos benefícios da pesquisa, analisar se não existem potenciais benefícios DIRETOS aos participantes, e informar no TCLE que os benefícios indiretos são os descritos em adquirir conhecimentos para futuros diagnósticos e intervenções;
- em relação aos riscos, sugiro remover a seguinte sentença, já que não se refere a riscos da pesquisa (já que se trata de pesquisa de material já coletado em biópsia): "De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha."

Para a pesquisa, considerar o risco de identificação dos participantes, e o que será feito para minimizar esse risco (anonimização):

- informar que caso algum risco relacionado à pesquisa se manifeste, o participante terá direito à indenização e/ou atendimento especializado.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, solicitando atenção às recomendações descritas.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1523414_E5.pdf	30/09/2021 12:43:40		Aceito
Outros	Carta_Resposta_ao_parecer_4_888_698.pdf	30/09/2021 12:40:32	Adriano de Paula Sabino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2021_atualizado_30_09_21.pdf	30/09/2021 12:37:20	Adriano de Paula Sabino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2021.pdf	22/07/2021 12:28:59	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Declaração de Manuseio Material	Biorepositorio.pdf	22/07/2021 12:25:08	Adriano de Paula Sabino	Aceito

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	22/07/2021 12:25:08	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	22/07/2021 12:07:32	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Emenda.docx	04/11/2020 13:59:16	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	EMENDA_2019.pdf	10/04/2019 21:21:22	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_2019.pdf	09/04/2019 22:25:06	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_2019.pdf	09/04/2019 21:50:07	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	021776120parecer.pdf	01/08/2016 18:29:40	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Outros	02177612aprovacao.pdf	01/08/2016 18:29:12	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/07/2016 22:20:59	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Emenda ao Projeto 2015.doc	10/04/2015 15:50:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE modificado.docx	09/08/2013 12:39:30		Aceito
Outros	Emenda ao Projeto.doc	09/08/2013 12:25:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa.doc	09/08/2013 12:05:15		Aceito
Outros	Divulgação resultados.jpg	01/06/2012 10:27:41		Aceito
Outros	Destino material.jpg	01/06/2012 10:27:20		Aceito
Outros	Termo de compromisso pesquisadores.jpg	16/04/2012 15:19:01		Aceito
Outros	Termo compromisso pesquisador responsável.jpg	04/04/2012 10:57:54		Aceito
Outros	Termo compromisso instituicao.jpg	04/04/2012 10:57:26		Aceito
Outros	Protocolo DEPE.HC.UFMG.jpg	04/04/2012 10:57:01		Aceito
Outros	Aprovacao camarall.jpg	04/04/2012 10:56:38		Aceito
Outros	Aprovacao camarall.jpg	04/04/2012		Aceito

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 2 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

Outros	Aprovacao camarall.jpg	10:56:19		Aceito
Outros	Aprovacao camaral.jpg	04/04/2012 10:55:57		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Outubro de 2021

Assinado por:

Crissia Carem Palva Fontainha  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br