

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE**  
**RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“Estudo de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em  
síndrome mielodisplásica”**

**BRUNA ALVES FENERICH**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de Concentração: Clínica Médica**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Traina**

**RIBEIRÃO PRETO - SP**  
**2014**

**Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.**

**Fenerich, Bruna Alves**

“Estudo de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em síndrome mielodisplásica”. Ribeirão Preto, 2014.

63 p. : il. ; 30 cm

Monografia, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Traina, Fabíola.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Mutação. 3. FLT3. 4. JAK2 5. CALR

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Bruna Alves Fenerich**

**“Estudo de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em  
síndrome mielodisplásica”**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em: 25/11/2014

## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram ao meu lado durante esta jornada que culmina na formação de uma nova bióloga.*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela presença em minha vida e por ter guiado e abençoado minha trajetória.

À minha orientadora, Prof. Dra. Fabíola Traina, pela oportunidade e por todo o crescimento profissional e pessoal proporcionado. Este ano de convívio no laboratório representou um período de intenso aprendizado, que levarei por toda a minha jornada profissional.

Às Especialistas de Laboratório, Ana Silvia e Bárbara, por toda ajuda com os experimentos e por tudo que vocês me ensinaram durante este período.

A todos do laboratório de Hematologia da FMRP, principalmente às Fabíoles, Jaqueline, Ana, Fernanda, Jéssica, Renata, Diva e Virgínia, por todo apoio, conversas e risadas.

Aos colegas do Hemocentro de Campinas, João, Dulcinéia e Clarissa e do Hemocentro de Ribeirão Preto, Adriana e Dr. Wilson, por todas as dicas e auxílio com o sequenciamento.

Aos meus pais Antonio Donizeti e Eliana, pelos ensinamentos, incentivo e apoio incessante. Embora nunca tenham tido a oportunidade de frequentar o ensino superior, fizeram o possível e o impossível para proporcionar este feito à mim e à minha irmã, sem medir esforços, e por esta e muitas outras razões, não tenho como agradecer através de palavras. À minha irmã Fernanda que representa uma grande amiga e companheira.

Ao meu namorado Renato, agradeço pelo seu companheirismo, carinho e apoio, que estiveram presentes constantemente. Obrigada por ter sido a pessoa que me acalmou nos dias em que eu achei que não seria capaz de cumprir minhas tarefas e por ter feito meus dias muito mais felizes. Nem vou agradecer por toda a ajuda com as tecnologias, programas de computador, entre outros, pois o agradecimento ficaria muito longo.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus amigos, Lara, Gustavo, Flávia, Lenisa, Vitória, Gabi, Letícia, Carolina, Natalia e Paula, por esses bons anos de convivência e amizade.

Aos meus amigos de Monte Alto, Nathalia, Tamara, Vanessa e Rafael, que mesmo a distância, continuam a fazer parte da minha vida.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação e aos membros da banca por terem encontrado tempo para dedicar na avaliação desse trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

*“A única coisa que importa é colocar em prática, com sinceridade e seriedade, aquilo em que se acredita.”*

*Dalai Lama*

## RESUMO

FENERICH, B. A. “Estudo de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em síndrome mielodisplásica”. 2014, 63 f. Monografia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Em neoplasias mieloides, a identificação de mutações tem sido uma importante ferramenta para o estabelecimento de correlações entre características fenotípicas e o perfil genético das doenças, contribuindo para a classificação, diagnóstico e avaliação do prognóstico de cada paciente. A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma neoplasia mielóide caracterizada pela ineficiência do processo hematopoético e pela presença de displasia em uma ou mais linhagens celulares do sangue periférico. Embora muitas mutações em genes envolvidos na fisiopatologia da SMD tenham sido descritas recentemente, nenhuma destas alterações foi definida como um marcador diagnóstico. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em pacientes com diagnóstico de SMD, SMD/neoplasia mieloproliferativa (NMP) e leucemia mielóide aguda (LMA) com alterações relacionadas à SMD atendidos no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Foram incluídos no estudo um total de 40 pacientes com diagnóstico de SMD (n=36), SMD/NMP (n=1), e LMA com alterações mielodisplásicas (n=3). Amostras remanentes de sangue periférico ou medula óssea coletadas durante o atendimento de rotina dos pacientes em seguimento no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP foram submetidas à extração de DNA e analisadas através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR), PCR em tempo real e/ou análise de fragmentos. As metodologias foram padronizadas e os 40 pacientes analisados foram identificados como triplo negativos para as mutações de interesse, indicando que as alterações moleculares avaliadas são raras em SMD. Novos estudos, com a padronização da investigação de outras mutações e a ampliação da coorte de pacientes com SMD se fazem necessários para o avanço da compreensão da fisiopatologia e no estabelecimento de correlações entre o perfil genético e as características fenotípicas da SMD.

**Palavras-chave:** Síndrome mielodisplásica; Mutação; FLT3; JAK2; CALR.

## ABSTRACT

FENERICH, B. A. “**FLT3, JAK2 and CALR mutations screening in myelodysplastic syndrome**”. 2014, 63 f. Monograph - School of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

In myeloid malignancies, identification of mutations has been an important tool for establishing correlations between phenotypic features and the genetic profile of the disease, contributing to the classification, diagnosis and assessment of prognosis of each patient. Myelodysplastic syndrome (MDS) is a myeloid neoplasm characterized by inefficiency of the hematopoietic process and the presence of dysplasia in one or more cell lines from peripheral blood. Although many mutations in genes involved in the pathophysiology of MDS have recently been described, none of these mutations was defined as a diagnostic marker. Thus, the present study aimed to investigate the presence of mutations in FLT3, JAK2 and CALR genes in patients with MDS, MDS/myeloproliferative neoplasm (MPN) and acute myeloid leukemia (AML) with myelodysplastic related changes followed at the Clinical Hospital of FMRP-USP. Forty patients diagnosed with MDS (n=36), MDS/MPN (n=1), and AML with myelodysplastic related changes (n=3) were included in the study. Remaining peripheral blood or bone marrow samples collected during routine care of patients being followed at the Hematology Clinic of the Clinical Hospital of FMRP were submitted to DNA extraction and analyzed through polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR), PCR real time and/or fragment size analysis. The methodologies were established and the 40 patients studied were identified as triple negative. Further studies with standardization of research of other mutations and the expansion cohort of patients with MDS are needed to advance the comprehension of pathophysiology and to establish correlations between genetic profile and phenotypic features of MDS.

**Keywords:** Myelodysplastic syndrome; Mutation; FLT3; JAK2; CALR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de eletroforese para avaliação da integridade das amostras de DNA genômico...30
- Figura 2.** Análise da mutação FLT3-ITD em pacientes com SMD.....38
- Figura 3.** Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como negativo para a mutação.....39
- Figura 4.** Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como positivo heterozigoto para a mutação.....40
- Figura 5.** Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como positivo homozigoto para a mutação.....40
- Figura 6.** Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Padrões de curvas observados para cada grupo de pacientes.....41
- Figura 7.** Padronização *in house* da pesquisa de JAK2 V617F por RFLP-PCR: Amplificação de JAK2 por PCR.....42
- Figura 8.** Padronização *in house* da pesquisa de JAK2 V617F por RFLP-PCR: Digestão por Bsa XI.....42
- Figura 9.** Análise da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD: Amplificação de JAK2 por PCR.....44
- Figura 10.** Análise da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD: Digestão por Bsa XI.....44
- Figura 11.** Análise da mutação no éxon 9 de CALR.....45

<b>Figura 12.</b> Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em paciente com SMD negativo para a mutação.....	46
<b>Figura 13.</b> Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em amostra controle positiva (Tipo 1).....	46
<b>Figura 14.</b> Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em amostra controle positiva (Tipo 2).....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Iniciadores utilizados para a investigação da mutação em FLT3-ITD.....	31
<b>Tabela 2.</b> Primers e sondas utilizados na de investigação da mutação JAK2 V617F.....	33
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores utilizados na detecção das mutações <i>indel</i> no gene CALR.....	34
<b>Tabela 4.</b> Características dos pacientes incluídos no estudo.....	37

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
V	Volt
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
μM	Micromol
nM	Nanomolar
ng	Nanograma
μL	Microlitro
U/μL	Unidade por microlitro

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AREB-1	Anemia refratária com excesso de blastos 1
AREB-2	Anemia refratária com excesso de blastos 2
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ARSA-T	Anemia refratária com sideroblastos em anel com trombocitose
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b</i>
CARL	Calreticulina
CBL	<i>Cbl proto-oncogene, e3 ubiquitin protein ligase</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>
CRDM	Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens
CRDU	Citopenia refratária com displasia de única linhagem
CSF1R	<i>Colony stimulating factor 1</i>
Ct	Ciclo limiar ( <i>threshold cycle</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5) – methyltransferase 3 alpha</i>
Dntps	Desoxiribonucleotídeos fosfatados
ETV6	<i>ETS variant 6</i>
EZH2	<i>Enhancer of zest homolog 2</i>
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>
IDH 1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IDH 2	<i>Isocitrate dehydrogenase 2</i>
IPSS-R	Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado
ITD	Duplicação interna em tandem
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
KIT	<i>V-kit Hard – Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

LMA	Leucemia mieloide aguda
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
MPL	<i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
n	Número de indivíduos na amostra
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
OMS	Organização mundial da saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
PTPN 11	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	<i>Receptor tirosino quinase</i>
RUNX1	<i>Run – related transcription factor 1</i>
SF3A1	<i>Splicing factor 3a, subunit 1</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3b, subunit 1</i>
SMD del (5q)	Síndrome mielodisplásica associada com del (5q) isolada
SMD	Síndrome mielodisplásica
SMD/NMP	Síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas
SMD-NC	Síndrome mielodisplásica não classificável
SRSF1	<i>Serine/arginine – rich splicing factor 1</i>
SRSF2	<i>Serine/arginine – rich splicing factor 2</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
ZRSR2	<i>Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1. Hematopoese.....	18
1.2. Síndrome mielodisplásica.....	18
1.3. Fisiopatologia da doença.....	20
1.4. Mutações relacionadas à fisiopatologia das neoplasias mieloides.....	21
1.5. Justificativa.....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Casuística.....	28
3.2. Processamento das Amostras.....	28
3.2.1. Extração de DNA.....	28
3.2.2. Verificação da qualidade do DNA genômico e armazenamento das amostras.....	29
3.3. Pesquisa da mutação ITD em FLT3.....	30
3.4. Padronização in house de diferentes métodos para investigação molecular da presença da mutação JAK2V616F.....	31
3.4.1. PCR em tempo real qualitativo.....	32
3.4.2. RFLP-PCR.....	32
3.5. Pesquisa de mutações em CALR.....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Caracaterísticas da população estudada.....	36
4.2. Resultados da pesquisa da mutação FLT3-ITD.....	38
4.3. Resultados da padronização <i>in house</i> de diferentes metodologias.....	39
4.3.1. PCR em tempo real.....	39
4.3.2. RFLP-PCR.....	41
4.4. Resultado da pesquisa da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD.....	43
4.5. Resultados da pesquisa de mutações em CALR.....	44

<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>
Anexo A. Ficha Clínica.....	61
Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.....	63



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Hematopoese**

A gênese das diferentes linhagens celulares que compõem o sangue periférico é dada através de um processo denominado hematopoese, que compreende a eritropoese, a leucopoese e a trombocitopoese (HOFFBRAND & MOSS, 2013). Esta produção ocorre inicialmente, durante o desenvolvimento fetal, em ilhotas sanguíneas pertencentes ao saco vitelínico e, por volta da sétima até a décima oitava semana gestacional, ocorre predominantemente no fígado. No entanto, progressivamente, a medula óssea passa a deter tal função, sendo que no adulto representa a única fonte de produção de células sanguíneas (REGO, 2004).

O processo hematopoético requer um microambiente normal que tenha a capacidade de produzir fatores de crescimento, que favoreça a interação entre os distintos tipos celulares e acomode as células em desenvolvimento. Tal ambiente especial é representado pelo estroma que juntamente com as células sanguíneas constitui o órgão hematopoético (REGO, 2004). O estroma é formado por um componente celular, compreendendo fibroblastos, adipócitos, linfócitos, macrófagos e células do endotélio, e por uma matriz extracelular composta por colágeno, glicoproteínas e glicosaminoglicanos secretados pelas células do componente celular (REGO, 2004; HOFFBRAND & MOSS, 2013).

A produção de novas células sanguíneas envolve três processos fundamentais: a autorrenovação das células-tronco, a formação de progenitores hematopoéticos comprometidos e a proliferação e diferenciação das células precursoras em células maduras e funcionais (REGO, 2004). As células-tronco são caracterizadas por realizar uma divisão celular assimétrica, que resulta em uma nova célula-tronco e uma célula precursora com baixos níveis de fatores de transcrição já comprometida com uma linhagem específica. A determinação da linhagem de uma célula precursora pode ser dada através de alocação aleatória ou por influência de sinais externos (HOFFBRAND & MOSS, 2013).

### **1.2. Síndrome Mielodisplásica**

Falhas em algum ponto das vias do processo hematopoético podem resultar em neoplasias mielóides, caracterizadas pela redução ou pela proliferação exacerbada de uma ou mais linhagens celulares do sangue periférico. Dentro deste grupo de malignidades, são

encontradas as síndromes mielodisplásicas (SMD), as doenças mieloproliferativas (NMP), as mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP) e as leucemias (VARDIMAN et al., 2009; MALCOVATI et al., 2014).

As síndromes mielodisplásicas correspondem a um conjunto diverso de desordens hematopoéticas de caráter clonal, ou seja, que se originam de uma única célula precursora na medula óssea que tenha sofrido alterações moleculares e adquirido capacidade de autorrenovação (DAVIDS & STEENSMA, 2010; HOFFBRAND & MOSS, 2013). Nas SMDs observa-se uma hematopoese ineficaz, que resulta em citopenias no sangue periférico e medula óssea hiperclular, com risco de transformação para leucemia mielóide aguda (LORAND-METZE, 2004; DAS, CHAUDHURI & LAW, 2013).

Estes distúrbios hematopoéticos ocorrem, sobretudo, em pacientes com idade superior a 50 anos, sendo de incidência rara na infância (LORAND-METZE, 2004). A doença é considerada majoritariamente primária com etiologia ainda pouco definida, podendo estar relacionada a diversos fatores, dentre os quais podem ser citados: processos imunológicos, exposição a altos níveis de benzeno, agrotóxicos/solvente, tabagismo e histórico familiar de neoplasias hematológicas (HOFFBRAND & MOSS 2013). A patogênese da doença secundária pode estar relacionada a terapias que utilizam agentes mielotóxicos, como a quimioterapia e a radioterapia (ADÈS, ITZYKSON & FENAUX, 2014).

Os sintomas clínicos podem ser muito variados, mas geralmente estão relacionados às citopenias encontradas, sendo comuns: a fadiga, palidez, dispneia, complicações hemorrágicas e infecções (BRUNNING, 2008). Devido a inespecificidade sintomática, o diagnóstico baseia-se fundamentalmente em dados de hemograma, de citologia e histologia da medula óssea e técnicas de citogenética (LORAND-METZE, 2004). A presença de displasia é um dos principais critérios de diagnóstico, no entanto, as displasias são muito variáveis e a avaliação das mesmas não é facilmente reproduzível (MALCOVATI et al., 2014).

O diagnóstico preciso e o estudo do prognóstico de cada caso são essenciais para a escolha de um tratamento adequado, e neste contexto, a classificação das síndromes mielodisplásicas em subtipos distintos assume um importante papel. Devido a esta necessidade, diversos sistemas de classificação foram criados, sendo que o primeiro foi desenvolvido pelo grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976 e revisado em 2001, baseando-se nos aspectos morfológicos da doença, no entanto, este se mostrou insuficiente para a definição de um prognóstico conclusivo (MORAES et al., 2009; BENNET, 2013). Posteriormente, o sistema estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tornou-se o padrão para a classificação, adotando-se critérios de análise do cariótipo,

do número de citopenias, do tipo e grau de displasia e da contagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico (MORAES et al., 2009; BRUNNING, 2008).

De acordo com a classificação da OMS, as SMDs podem ser agrupadas nas seguintes categorias: citopenia refratária com displasia de única linhagem (CRDU), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos 1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada (SMD del(5q)) e síndrome mielodisplásica não-classificável (SMD-NC) (BRUNNING, 2008). Os pacientes podem ainda, ser reagrupados em cinco classes de risco, que diferem sobretudo no risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda e no tempo de sobrevida (GREENBERG, 2012).

A principal classificação dos pacientes em grupos de risco é baseada no Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R). Os fatores prognósticos considerados para esta avaliação correspondem aos dados de citogenética, contagem de blastos, número e severidade de citopenias (GREENBERG, 2012). A determinação do grupo de risco de cada paciente é de suma importância na escolha do tratamento, visto que a abordagem terapêutica difere de acordo com o prognóstico. (ADÈS, ITZYKSON & FENAUX, 2014).

### 1.3 Fisiopatologia da doença

A patogênese da síndrome mielodisplásica está relacionada a um conjunto diverso de anormalidades citogenéticas recorrentes. As alterações cromossômicas mais comuns correspondem às deleções, aberrações numéricas e translocações não-balanceadas. Entretanto, em aproximadamente 50% dos casos estudados o cariótipo é normal. Acredita-se que este grupo de pacientes apresente mutações genéticas subjacentes que não seriam detectadas por meio da análise do cariótipo, visto que este não possibilita a identificação dos *loci* mutantes. (DAVIDS & STEENSMA, 2010).

Mutações recorrentes em SMD estão frequentemente relacionadas com genes que controlam diversos processos celulares essenciais, incluindo genes envolvidos na transdução de sinal (JAK2, KRAS); metilação do DNA (DNMT3A, TET2,); regulação da transcrição (RUNX1, GATA2); modificação da cromatina (EZH2, ASXL1); e *splicing* do RNA (SF3B1) (PAPAEMMANUIL et al, 2013; LINDSLEY & EBERT, 2013). Dentre estas mutações, muitas são compartilhadas por outras neoplasias mieloides, incluindo os grupos diagnósticos de síndrome mielodisplásica/neoplasia mieloproliferativa (SMD/NPM),

neoplasia mieloproliferativa (NMP) e leucemia mielóide aguda (LMA) (PAPAEMMANUIL et al., 2013).

A presença destas mutações está relacionada a ineficiência do processo hematopoético devido a alterações na proliferação, maturação e apoptose de células envolvidas nesse processo (LORAND-METZE, 2004; DAS, CHAUDHURI & LAW, 2013; ADÈS, ITZYKSON & FENAUX, 2014). Em SMD, os clones mutados, inicialmente tornam-se mais susceptíveis à apoptose, levando a ocorrência de citopenias no sangue periférico. Esta alta taxa de apoptose também pode atingir as células estromais, causando alterações no microambiente da medula óssea (RAZA et al., 1995). No entanto, a aquisição de novas lesões genéticas pode levar à seleção oligoclonal durante a progressão da doença. Estes clones selecionados sofrem redução apoptótica e adquirem elevadas taxas de proliferação, contribuindo para a transformação para LMA (WALTER et al., 2012).

#### **1.4. Mutações relacionadas à fisiopatologia das neoplasias mieloides**

Uma via frequentemente desregulada em malignidades hematológicas é representada pelos receptores tirosino quinases (RTKs). Dentro dessa família, encontra-se o *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3), um receptor composto por um domínio extracelular e um domínio citoplasmático. O ligante de FLT3, em sinergia com outros, ativa o receptor de tirosino quinase e estimula o crescimento e a proliferação de células sanguíneas e da medula óssea (GILLILAND & GRIFFIN, 2002).

Dois tipos principais de mutações são encontrados no gene que codifica este receptor: mutação interna em tandem (ITD) e mutação pontual D835 (SHIH et al., 2004). A mutação FLT3-ITD corresponde a duplicações de 3 a 400 pares de bases que afetam o domínio próximo da membrana (GRAF et al., 2007). Este domínio, quando não mutado, assume uma forma helicoidal que é responsável por bloquear o segmento de ativação, mantendo o receptor inativo enquanto não houver a ligação do ligante específico. Diante da mutação, este domínio perde sua conformação, cessando também sua capacidade autoinibitória (GILLILAND & GRIFFIN, 2002).

Mutações em FLT3 apresentam relativamente baixa incidência em pacientes acometidos por SMD, no entanto, ocorrem em cerca de 30% dos casos de LMA. Ademais, dados da literatura sugerem fortemente que a aquisição de mutações neste gene está relacionada à transformação da SMD para a LMA, estando associadas ao aumento da proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos (SHIH et al., 2004; DAVER et al., 2013).

A presença desta mutação está associada a um pior prognóstico em LMA (SHIH et al., 2004; DÖHNER et al., 2010).

Uma outra via de comunicação celular afetada em doenças hematológicas é representada por *Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT), que corresponde ao principal mecanismo de sinalização de uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento (O'SHEA, HOLLAND, & STAUDT, 2013). A ativação desta via desencadeia respostas que promovem proliferação, migração, diferenciação e apoptose celular. Tais eventos são críticos para o processo hematopoético, e assim sendo, falhas na regulação ou a ativação constitutiva desta via podem estar relacionadas a doenças inflamatórias e hematológicas (RAWLINGS, ROSLER & HARRISON, 2004).

Uma mutação pontual (V617F) no gene que codifica JAK2, um membro da família da via JAK/STAT, provoca a mudança de um único nucleotídeo, com consequente substituição de um aminoácido (O'SHEA, HOLLAND, & STAUDT, 2013; JAMES et al., 2005). Esta alteração provoca a fosforilação constitutiva do domínio quinase de JAK2, gerando atividade contínua da via mesmo na ausência de ligante e fatores de crescimento (O'SHEA, HOLLAND, & STAUDT, 2013).

A mutação JAK2 V617F apresenta alta incidência em neoplasias hematológicas, sobretudo em NMP, sendo encontrada em aproximadamente 75% dos casos (CAMPBELL & GREEN, 2006; KLAMPFT, 2013). Ainda com uma frequência mais rara, quando comparada às outras malignidades hematológicas, mutações em JAK2 também são identificadas em pacientes com SMD, sobretudo no subgrupo ARSA, e nos pacientes com SMD/NMP no subgrupo ARSA com trombocitose (ARSA-T) (LINDSLEY & EBERT, 2013 a ; HELLSTROM-LINDBERG & CAZZOLA, 2008).

Pesquisas recentes indicam uma outra mutação relacionada à via JAK/STAT. Mutações *indel* no éxon 9 do gene que codifica a calreticulina (CARL) foram identificadas em cerca de 73% dos pacientes com NMP, subgrupo trombocitopenia essencial e mielofibrose primária, negativos para as mutações JAK2 V617F e MPL. Dessa forma, estas mutações parecem ser mutuamente excludentes e culminam na mesma resposta, a ativação constitutiva da via de transdução de sinal JAK/STAT. No entanto, os mecanismos de ativação desta via pela calreticulina mutada ainda não foram esclarecidos (KLAMPFL et al., 2013).

A calreticulina é uma proteína altamente conservada presente no retículo endoplasmático, que atua na ligação com íons cálcio e como uma chaperona no enovelamento de glicoproteínas (CHI et al., 2014). Esta proteína é composta por três domínios estruturalmente e funcionalmente distintos. Um destes domínios corresponde à região C-

terminal, que contem nucleotídeos que formam a sequência de retenção da proteína ao retículo endoplasmático. As mutações no gene CALR, provocam a substituição desta região C-terminal negativamente carregada por uma região positivamente carregada, rica em arginina e metionina (CAZZOLA & KRALOVICS, 2014; RUMI et al., 2014).

Foram descritos 36 tipos de mutações em CALR, sendo mais frequentes as mutações do tipo 1 (53% dos casos) e do tipo 2 (31,7%). O primeiro grupo corresponde a deleções de 52 pares de base (pb), enquanto o segundo é caracterizado por inserções de 5 pb. Ambas mutações resultam na mudança na matriz de leitura do gene, com consequente substituição da região C-terminal, codificada pelo éxon 9 (KLAMPFL et al., 2013).

A frequência das mutações CARL em outras neoplasias mieloides ainda não está totalmente estabelecida. De acordo com o Klampf e colaboradores mutações em CALR foram identificadas somente em cerca de 10% dos pacientes com SMD/NMP subgrupo leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (KLAMPF et al., 2013). Outro trabalho, publicado por Nangalia e colaboradores, aponta que mutações em CALR ocorreram em 8% dos pacientes com SMD (NANGALIA et., 2013).

## **1.5. Justificativa**

A identificação de mutações em genes envolvidos com a fisiopatologia de neoplasias mielóides representa uma ferramenta eficiente e potencialmente útil para auxiliar o diagnóstico e avaliação do prognóstico de cada paciente. No entanto, no caso das síndromes mielodisplásicas, até o presente momento, nenhuma mutação foi incluída como critério diagnóstico na prática clínica. Diante deste cenário, estudos de investigação de mutações para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SMD e na evolução da doença se fazem necessários.

Considerando-se que diversas mutações são compartilhadas pelo grupo de neoplasias mieloides, optou-se por estudar em SMD, duas mutações que já são utilizadas como critério diagnóstico para outras neoplasias mieloides. A primeira delas corresponde à mutação FLT3-ITD, utilizado como ferramenta diagnóstica para LMA. A segunda mutação de interesse, JAK2 V617F, é critério diagnóstico para neoplasias mieloproliferativas, como policitemia vera, trombocitopenia essencial e mielofibrose primária. Adicionalmente, houve o interesse em investigar mutações no gene CALR, as quais foram recentemente descritas como

frequentes em NMP JAK2 V617F negativo, visto que ambas são mutualmente excludentes e ativam as mesmas vias de sinalização celular.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Investigar a presença de mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR em pacientes com diagnóstico de SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas atendidos pelo Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

### **2.2 Específicos**

Realizar a identificação das mutações FLT3-ITD, JAK2 V617F e mutações *indel* no gene CALR em pacientes com diagnóstico de SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

Realizar a padronização *in house* e adequação de dois métodos de detecção da mutação JAK2 V617F descritos na literatura para utilização neste trabalho e possível implementação na rotina do laboratório.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

Amostras remanentes de sangue periférico (n=53) ou medula óssea (n=15) coletadas durante o atendimento de rotina dos pacientes em seguimento no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP foram submetidas à extração de DNA. No total, foram processadas 68 amostras de pacientes com hipótese diagnóstica de síndrome mielodisplásica. No entanto, após avaliação da qualidade do DNA e reavaliação dos dados clínicos, 16 amostras foram excluídas do estudo devido a baixa qualidade do material e 12 amostras foram excluídas por diagnóstico não compatível.

Dessa forma, 40 indivíduos foram submetidos a investigação das mutações de interesse. Das 40 amostras incluídas, 32 eram de sangue periférico e 8 de medula óssea. De acordo com a classificação da OMS, os pacientes apresentaram o diagnóstico de SMD (n=36), SMD/NMP (n=1), e LMA com alterações mielodisplásicas (n=3) (BRUNNING, 2008).

O diagnóstico foi baseado na avaliação de dados de hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea e citogenética, além da aplicação de um protocolo de exclusão de outras doenças relacionadas, como descrito na ficha clínica (Anexo A). A classificação da doença foi realizada de acordo com a classificação da OMS (BRUNNING, 2008). O IPSS-R foi baseado na publicação de Greenberg (GREENBERG, 2012) e calculado através do aplicativo *online* fornecido pela *MDS Foundation (the myelodysplastic syndromes foundation inc.)* disponível no link <http://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/>.

#### 3.2. Processamento das Amostras

##### 3.2.1. Extração de DNA

Após um período de no máximo 24 horas após a coleta, deu-se início ao processamento das amostras. O DNA genômico foi extraído a partir do *buffy coat*, que corresponde ao componente sanguíneo obtido por meio de centrifugação, no qual se concentra uma considerável fração de leucócitos e plaquetas. Para este processo utilizou-se o Kit Gentra Puregene Blood (Qiagen), de acordo com orientações do fabricante. Resumidamente, o kit é composto por uma solução de lise de hemácias, solução de lise de glóbulos brancos e solução de precipitação de proteína para retirada dos restos celulares. Posteriormente, adiciona-se

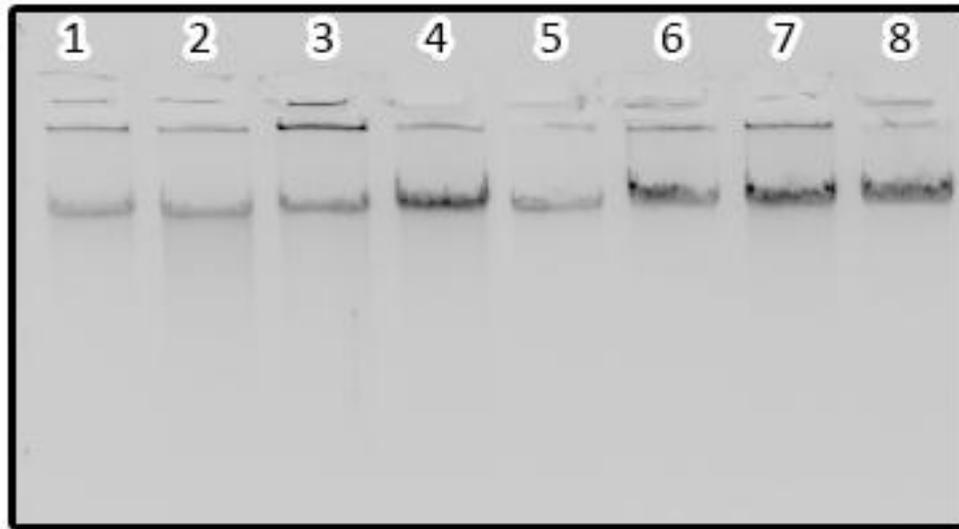
isopropanol e álcool 70 % para precipitação do DNA e solução de hidratação de DNA para reconstituição do pellet.

### **3.2.2. Verificação da qualidade do DNA genômico e armazenamento das amostras**

Após a extração, a concentração e a pureza do DNA foram verificadas através da leitura em aparelho Nano Vue GE. A quantificação é dada em ng/ $\mu$ L e baseia-se na densidade óptica, considerando-se que os ácidos nucleicos absorvem a luz no comprimento de onda de 260 nm. O primeiro parâmetro para avaliar o grau de pureza da amostra corresponde à relação de absorbância 260/280. Amostras com valores próximos a 1,8 são geralmente aceitas como puras para o DNA, sendo que relações significativamente mais baixas podem indicar a presença de proteínas, fenol e outros contaminantes que apresentam absorbância próxima a 280 nm. A relação 260/230 é utilizada como uma medida secundária da pureza de ácidos nucleicos e deve estar compreendida entre 2 e 2,2, sendo que valores consideravelmente inferiores podem sugerir a presença de contaminantes com absorbância próxima a 230 nm. Para este trabalho, foram selecionadas amostras com concentração igual ou superior a 50 ng/ $\mu$ L e cujas relações 260/280 e 260/230 encontraram-se próximas a 1,8 e 2, respectivamente.

A avaliação da integridade do DNA genômico foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Para cada amostra foram aplicados no gel, 6  $\mu$ L do material diluído a 50 ng/ $\mu$ L e 2  $\mu$ L de tampão de corrida, sob voltagem de 100V. A integridade do DNA pode ser observada pela presença de bandas com alto peso molecular e ausência de rastros abaixo de cada banda, que indicam a degradação do material (Figura 1).

Após avaliação da concentração, qualidade e integridade, as amostras selecionadas foram catalogadas em uma planilha excel, etiquetadas e armazenadas em freezer à -20°C. Com o objetivo de evitar a degradação do material devido a descongelamentos frequentes, todas as amostras foram aliquotadas e diluídas em 25 e 50 ng/ $\mu$ L para uso.



**Figura 1 – Gel de eletroforese para avaliação da integridade das amostras de DNA genômico.** As linhas de 1 a 8 representam amostras de DNA selecionadas para pesquisa após quantificação e verificação da pureza. Para cada amostra, foram aplicadas 6  $\mu\text{L}$  de DNA (50 ng) e 2  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida, em gel de agarose 1%. Todas as amostras apresentam bandas íntegras e ausência de degradação, que poderia ser observada pela presença de rastros abaixo das bandas.

### 3.3. Pesquisa da mutação ITD em FLT3

A identificação de FLT3-ITD foi realizada através da amplificação de regiões específicas do DNA (éxons 14 e 15) por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida por análise de eletroforese em gel de agarose 3,5%. Para a PCR foi utilizado um volume final de 25 $\mu\text{L}$ , composto por 2  $\mu\text{L}$  de DNA puro; 2,5  $\mu\text{L}$  de solução-tampão (10X); 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (100 mM de cada); 1  $\mu\text{L}$  de iniciador sense e antisense (10  $\mu\text{M}$  cada); 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e água ultra-pura q.s.p 25 $\mu\text{L}$ .

A reação foi realizada de acordo com as seguintes condições e etapas: fase de desnaturação das moléculas por 5 minutos e temperatura de 94°C; 35 ciclos compostos de 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 55°C (fase de anelamento) e 30 segundos a 72°C (fase de extensão); após o término dos ciclos, a amostra permanece a 72 °C por um período de 5 minutos.

Depois de amplificada, a amostra foi colocada em gel de agarose, uma matriz que realiza a separação dos fragmentos de DNA de acordo com o tamanho. Para tal, o gel é colocado em uma cuba com solução salina e uma corrente elétrica é aplicada, fazendo com que o DNA migre para o pólo positivo, formando bandas. Estas bandas podem ser observadas devido à adição de brometo de etídeo ao gel, pois este exibe fluorescência quando exposto à

luz ultravioleta e, como essa fluorescência aumenta consideravelmente após a inserção no DNA, o brometo de etídeo é utilizado como um corante para se visualizar os fragmentos amplificados. O genótipo normal apresenta uma banda com 329 pares de base (pb), enquanto que para o genótipo mutado, é possível observar uma banda adicional.

**Tabela 1** - Iniciadores utilizados para a investigação da mutação em FLT3-ITD.

	PCR FLT3-ITD
<b>Iniciador sense</b>	5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'
<b>Iniciador antisense</b>	5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3'

### 3.4. Padronização *in house* de diferentes métodos para investigação molecular da presença da mutação JAK2V616F

Atualmente, a investigação desta mutação em pacientes portadores de neoplasias mieloproliferativas atendidos no Hospital das Clínicas da FMRP é realizada através de PCR quantitativo em tempo real, com o uso de um *kit* comercial. Por se tratar de um método oneroso, o presente trabalho realizou a padronização *in house* e a adequação de duas outras metodologias para a investigação da mutação JAK2 V617F nos pacientes inclusos neste trabalho e para implementação na rotina do laboratório. O primeiro método validado consiste em um PCR em tempo real projetado através do serviço da Applied Biosystems, descrito na Dissertação de Mestrado da aluna Mariana Cristina Lima Souza (Souza, 2013). O segundo método corresponde ao polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), uma técnica baseada na digestão dos produtos da PCR com endonucleases e descrito em trabalho publicado por Yamamoto e colaboradores (Yamamoto, 2001).

Para a padronização de ambos métodos, foram selecionadas amostras de pacientes com doenças mielofroliferativas crônicas, cuja ausência ou presença da mutação JAK2 V617F em heterozigose ou homozigose havia sido previamente investigada através do uso do *kit* comercial. Dessa forma, estas amostras foram utilizadas como controles para a validação das metodologias alternativas. No total, utilizou-se 57 amostras de pacientes com NMP previamente identificadas como negativas para a mutação (n=27), positivas heterozigotas (n=22) ou positivas homozigotas (n=8), além de um controle positivo (homozigoto) e um negativo comercial para a validação através do PCR em tempo real. Para a padronização do

PCR-RFLP, foram utilizadas 22 amostras, sendo nove negativas para a mutação, nove positivas e quatro positivas homozigotas.

#### **3.4.1. PCR em tempo real qualitativo**

Para o PCR em tempo real, utilizou-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Realizou-se um ensaio específico projetado através do serviço da Applied Biosystems por Souza e colaboradores (SOUZA, 2013). O ensaio foi realizado com um único conjunto de iniciadores. Dessa forma, a identificação da mutação ocorreu através do uso de sondas que diferenciavam-se apenas na posição da mutação JAK2 V617F (Tabela 2).

A reação de PCR foi realizada em duplicata e preparada com volume final de 25  $\mu\text{L}$  e composta por 12,5 $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems); 0,2  $\mu\text{L}$  de cada sonda (0,08 $\mu\text{M}$ ); 0,9 $\mu\text{L}$  de cada primer (0,36 $\mu\text{M}$ ) e 10,3 $\mu\text{L}$  de DNA (40ng). A reação ocorreu de acordo com as seguintes condições: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguidos por 50 ciclos compostos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (anelamento/extensão).

A análise qualitativa foi realizada a partir do nível de fluorescência emitido por cada sonda, FAM para o alelo mutado e VIC para o alelo selvagem, a cada ciclo de amplificação. Esta fluorescência é captada por diferentes canais de leitura do aparelho e possibilita a construção de um gráfico em tempo real, que relaciona os ciclos de termociclagem com o nível de fluorescência liberada. A partir deste gráfico, foi delimitado, um limiar de fluorescência, também denominado *threshold*, que corresponde a altura em que ocorre o início da fase exponencial da amplificação gênica e registrou-se o ciclo em que a reação atinge esse limiar (Ct), ou seja, o número mínimo de ciclos necessários para a amplificação.

O valor de Ct de cada amostra analisada foi comparado com os das amostras controles do kit comercial, possibilitando assim a detecção dos alelos analisados. Também comparou-se o padrão de curvas geradas para cada grupo de pacientes, tanto para o alelo mutado, quanto para o alelo selvagem. Vale salientar, que este método não é baseado em uma análise quantitativa de expressão gênica, mas permite a detecção qualitativa da amplificação dos alelos mutado e selvagem, a partir de amostras de DNA.

#### **3.4.2. PCR-RFLP**

O segundo método padronizado *in house* corresponde ao polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, uma técnica baseada na restrição de um fragmento de DNA por endonucleases que clivam a molécula em sítios específicos gerando perfis de restrição. A técnica de PCR-RFLP foi realizada em duas etapas, iniciando-se com a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a PCR foi utilizado um volume final de 25 $\mu$ L, cuja composição foi definida através de repetições de experimentos, alterando-se, principalmente a concentração de DNA genômico para se obter um padrão de bandas mais nítido.

A reação padronizada apresentou a seguinte composição: 300 ng de DNA; 2,5  $\mu$ L de solução-tampão (10X); 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1  $\mu$ L de dNTP mix (100 mM de cada); 1  $\mu$ L de primer sense e antisense descritos na tabela 2 (10  $\mu$ M cada); 0,75  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) e água ultra-pura q.s.p 25 $\mu$ L. A reação ocorreu de acordo com as seguintes condições e etapas: 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 57°C e 50 segundos a 72°C e uma etapa final a 72°C durante 7 minutos.

Para a análise RFLP, os produtos obtidos por meio da PCR foram digeridos com a enzima BsaXI durante um período de 16 horas a 37°C e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2,5%. Para cada amostra, utilizou-se 10  $\mu$ L do produto da PCR; 0,5  $\mu$ L da enzima de restrição; 1,5  $\mu$ L de solução-tampão e água ultra-pura para completar o volume final de 15  $\mu$ L. O genótipo mutado em homozigose para JAK2 é representado por fragmentos com 460 pb (fragmento com 460bp de JAK2 não digerido corresponde ao alelo JAK2 V617F, uma vez que a mutação causa perda do sítio de restrição da enzima BsaXI), o genótipo heterozigoto apresenta fragmentos com 460, 241 e 189 pb, enquanto o genótipo normal é representado por fragmentos com 241 e 189 pb.

**Tabela 2** - Primers e sondas utilizados na de investigação da mutação JAK2 V617F.

	RFLP-PCR	PCR real time
Sonda alelo selvagem		5'-TCTCCACAGACACATAC (VIC) - 3'
Sonda alelo mutado		5'-TCCACAGAAACATAC (6-FAM) - 3'
Iniciador sense	5'GGGTTTCCTCAGAACGTTGA3'	5'-AAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT-3'
Iniciador antisense	5'TCATTGCTTTCCTTTTCACAA3'	5'-AGAAAGGCATTAAGAAAGCCTGTAGTT-3'

### 3.5. Pesquisa de mutações em CALR

A pesquisa de inserções e deleções no éxon 9 do gene da calreticulina foi realizada seguindo-se um protocolo baseado na publicação de Chi e colaboradores (CHI et al., 2014). A identificação é realizada através de PCR, seguida por confirmação da amplificação através da corrida em eletroforese em gel de agarose e sequenciamento por análise de fragmentos. Para a obtenção de controles positivos, realizou-se testes com amostras de NMP negativas para JAK2 V617F, visto que estas mutações apresentam alta incidência neste grupo.

Para a reação da PCR, foi utilizado um volume final de 30 µL, compostos por 50 ng de DNA, 3 µL de solução-tampão (10X); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50nm); 1,5 µL de DMSO; 1 µL de dNTP (10 mM); 0,3 µL dos iniciadores sense e antisense (10 µM) (Tabela 3); 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água ultra-pura q.s.p 30 µL. O iniciador sense é marcado com sonda a sonda fluorescente 6-FAM para a análise de fragmentos. A reação do PCR segue as seguintes condições: 10 minutos de desnaturação a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C e uma etapa final a 72°C durante 10 minutos. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose 4% e analisados. Alelos selvagens apresentam bandas com 297 pb, sendo possível identificar o genótipo com mutação *indel*, pelo aparecimento de bandas de 245 pb para a mutação do Tipo 1 e 302 pb para a mutação do Tipo 2.

Devido ao pequeno número de pares de bases que diferenciam as bandas selvagens e mutadas, a confirmação das mutações pode ser realizada através da análise de fragmentos. Para tal, o produto da PCR foi diluído em água ultra-pura em uma relação 1:15 para a preparação da reação, composta por 1 µL do produto diluído; 8,7 µL de Formamida e 0,3 µL de 600 LIZ. O material foi submetido ao sequenciamento no aparelho ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados foram analisados através do Software do próprio sequenciador.

**Tabela 3** – Iniciadores utilizados na detecção das mutações indel no gene CALR.

	<b>PCR CALR</b>
<b>Iniciador sense</b>	5'-TAACAAAGGTGAGGCCTGGT-3' (6-FAM-labeled )
<b>Iniciador antisense</b>	5'-GCCTCTCTACAGCTCGTCCTT-3'



## **4. RESULTADOS**

### **4. 1. Características da população estudada**

Dos 40 pacientes testados para as mutações de interesse, 36 foram diagnosticados com SMD, um paciente com SMD/NMP e três pacientes com LMA com alterações mielodisplásicas.

As características clínicas dos pacientes submetidos a investigação das mutações de interesse estão detalhadas na Tabela 4. Os pacientes cujo exame de citogenética foram inconclusivos devido à ausência de metáfase não puderam ser classificados quanto ao risco citogenético e o IPSS-R. O diagnóstico de SMD, especialmente o diagnóstico dos subtipos AR e CRDM permanecem um desafio na prática clínica, muitas vezes é necessário a repetição de exames de medula óssea e citogenética, e um tempo de seguimento mínimo de 6 a 12 meses para a certeza do diagnóstico. Dessa forma, considera-se importante a observação clínica por período mínimo de 6 meses, repetição do mielograma e cariótipo de medula óssea de 16 pacientes incluídos no estudo para melhor definição diagnóstica.

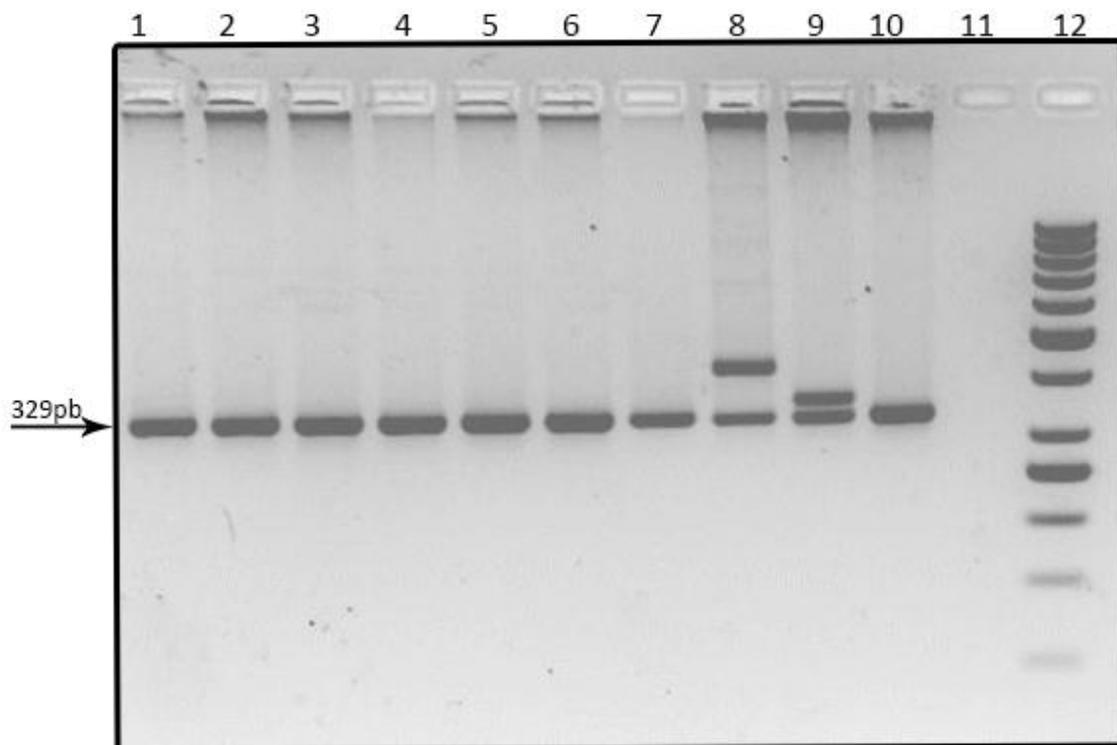
Tabela 4 - Características dos pacientes incluídos no estudo

Características		Número de Pacientes
<b>Pacientes</b>		40
<b>Gênero</b>	Feminino	18
	Masculino	22
<b>Idade (anos)</b>	Mediana (intervalo)	66 (28-85)
<b>Classificação OMS (2008)</b>		
<b>SMD</b>	AR/ARSA/CRDM/del(5q)	3/3/24/1
	AREB-1/AREB-2	4/1
<b>SMD/NMP</b>	LMMC	1
<b>LMA com alterações mielodisplásicas</b>		3
<b>Risco Citogenético</b>		
Muito baixo/Baixo, n (%)		1 (2,5%)/17 (42,5%)
Intermediário, n (%)		13 (32,5%)
Alto/Muito alto, n (%)		1 (2,5%)/2 (5%)
Indisponível, n (%)		6 (15%)
<b>Blastos na Medula Óssea (%)</b>		
<5%, n (%)		32 (80%)
≥5 and < 10%, n (%)		5 (12,5%)
≥10 and < 20%, n (%)		1(2,5%)
≥20% ≤ 30%, n (%)		2 (5%)
<b>IPSS-R</b>		
Muito Baixo/Baixo, n (%)		5 (12,5%)/16 (40%)
Intermediário, n (%)		6 (15%)
Alto/Muito Alto, n (%)		4 (10%)/3(7,5%)
Não Avaliável, n (%)		6 (15%)

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial da Saúde; AR, anemia refratária; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; del(5q), SMD com del(5q) isolada; CRDM, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; AREB-1, anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2, anemia refratária com excesso de blastos-2; LMA, leucemia mieloide aguda. LMMC, leucemia mielomonocítica crônica, IPSS-R, Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado. O risco citogenético e o IPSS-R foram definidos de acordo com Greenberg (GREENBERG, 2012). N, número de pacientes na população; (%), porcentagem.

#### 4.2. Resultados da pesquisa da mutação FLT3-ITD

Amostras de 40 pacientes com diagnóstico de SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas foram analisadas para a mutação FLT3-ITD. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de pacientes acometidos com LMA, previamente identificados como mutados para FLT3-ITD. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentaram fragmentos de tamanho normal, indicando ausência da mutação (Figura2).



**Figura 2 - Análise da mutação FLT3-ITD em pacientes com SMD (Gel de agarose 3,5%).** Amplificação dos alelos de FLT3 por PCR: linhas de 1 a 7: pacientes com SMD, todas as amostras apresentaram fragmentos de tamanho normal (329 pb), indicando ausência da mutação. Linhas 8 e 9: amostras de pacientes com LMA utilizados como controles positivos para a mutação; linha 10: um paciente com LMA não-mutado utilizado como controle; linha 11: branco; linha 12: marcador de 50 pb. Vale salientar que a primeira banda do marcador (50 pb) não aparece no gel devido a realização de uma corrida longa para melhor separação das bandas mutadas.

### 4.3 Resultados da padronização *in house* de diferentes metodologias

#### 4.3.1. PCR em tempo real

Para a validação da metodologia de PCR em tempo real, utilizou-se 57 amostras de pacientes com NMP previamente identificadas como negativas para a mutação (n=27), positivas heterozigotas (n=22) ou positivas homozigotas (n=8), além de um controle positivo e um negativo de um *kit* comercial. Todas as amostras avaliadas através do padrão de curvas de amplificação e da comparação dos valores de Ct conferem com os resultados obtidos previamente através do uso do *kit* comercial. As curvas de amplificação fornecidas pelo programa de análise pela leitura do canal FAM, que detecta o alelo mutado, estão ilustradas nas Figuras 3-5.

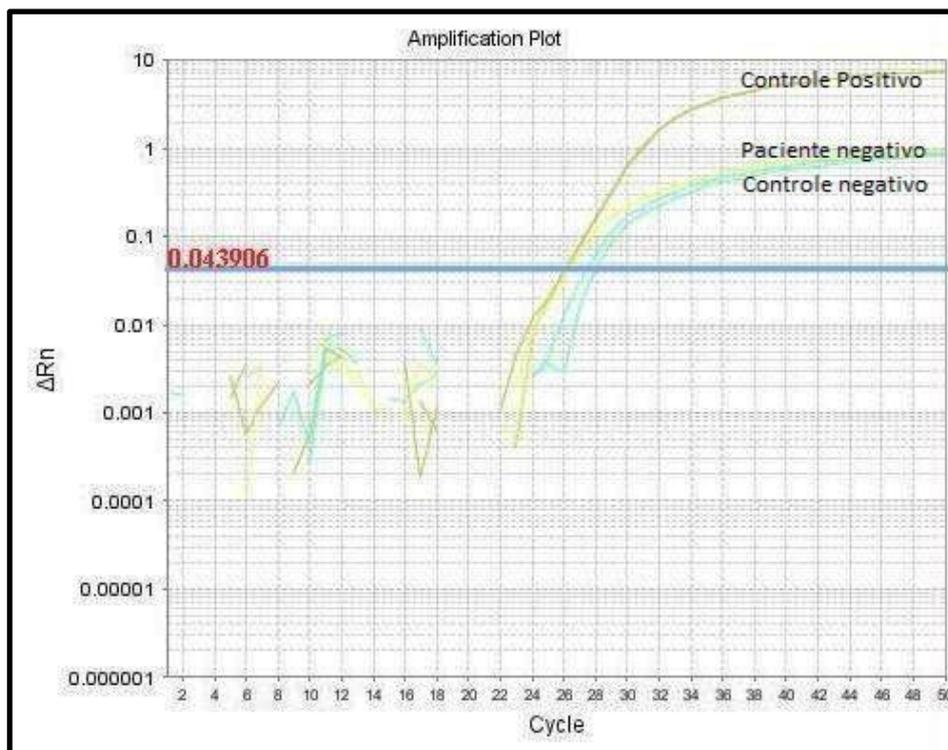


Figura 3 – Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como negativo para a mutação. A linha em amarelo representa a curva de amplificação do paciente (Ct=26,8), sobreposta a curva do controle negativo (Ct=27) confirmando o resultado. A linha em marrom representa um controle positivo homozigoto de um kit comercial (Ct=24).

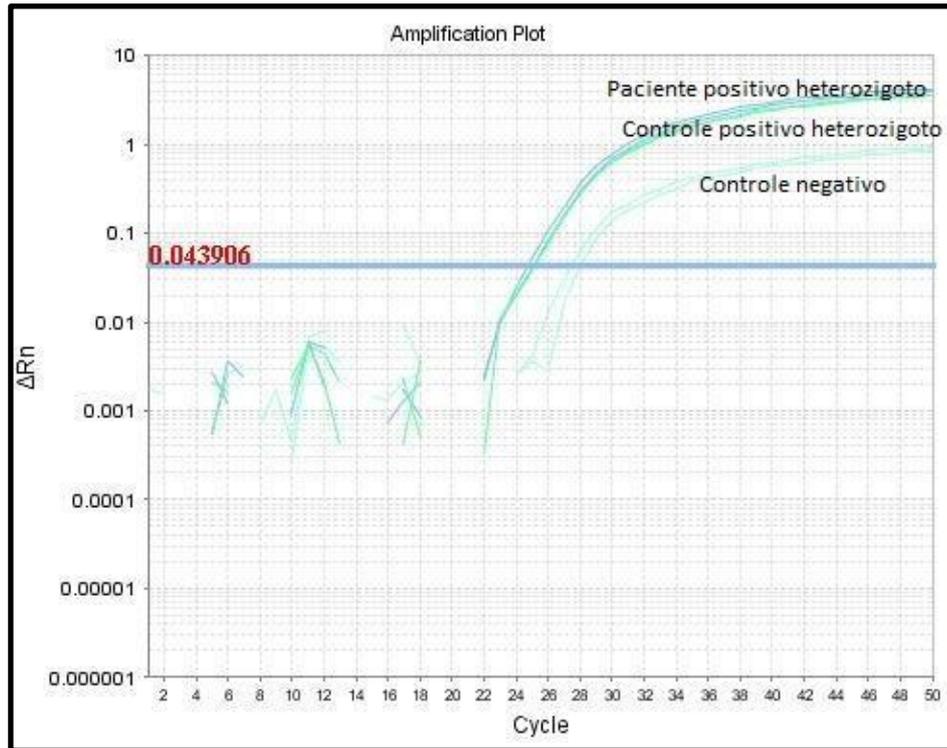


Figura 4 – Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como positivo heterozigoto para a mutação. A linha em azul escuro representa a curva de amplificação do paciente (Ct=25), sobreposta a curva do controle positivo heterozigoto (Ct=25,2), confirmando o resultado esperado. A linha em azul claro representa um controle negativo de um kit comercial (Ct=28).

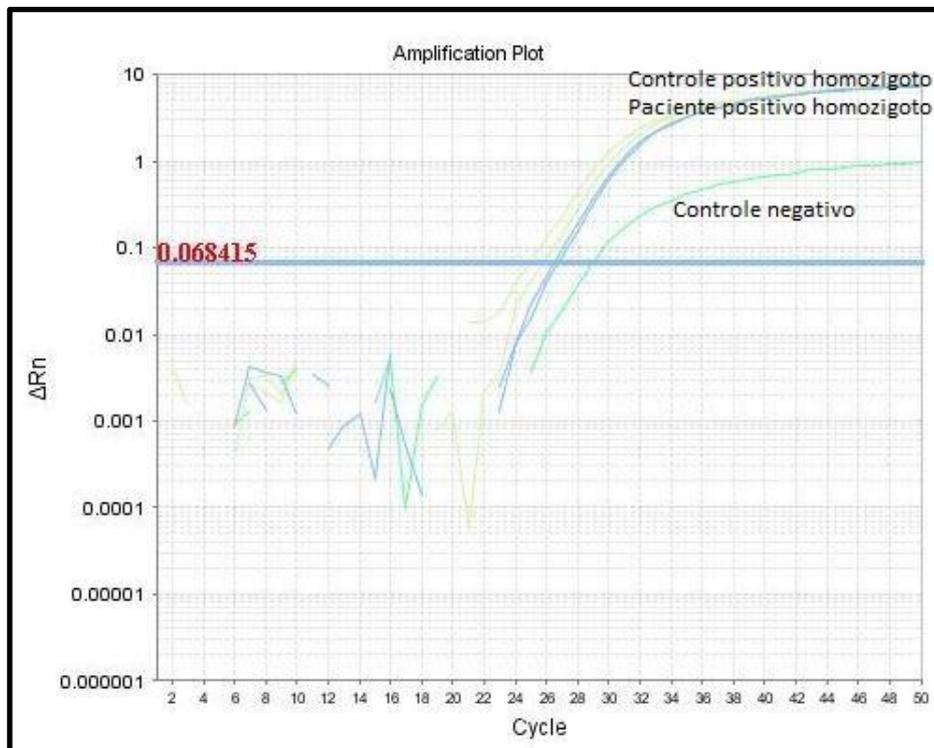
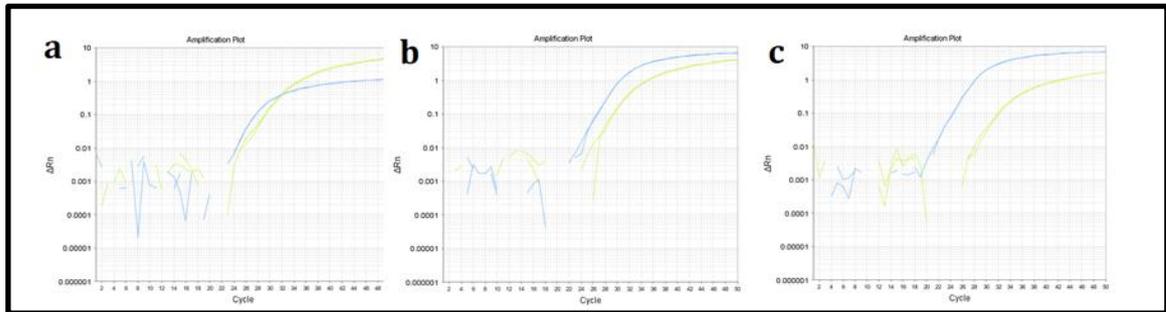


Figura 5 – Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Curva de amplificação de um paciente previamente identificado como positivo homozigoto para a mutação. A linha em azul escuro representa a curva de amplificação do paciente (Ct=26), sobreposta a curva do controle positivo homozigoto (Ct=25,8), confirmando o resultado esperado. A linha em azul claro representa um controle negativo de um kit comercial (Ct=28).

A análise qualitativa da mutação também pode ser realizada pela distinção entre os padrões de curvas para cada grupo de pacientes (negativo, positivo heterozigoto e positivo homozigoto), quando se analisa a amplificação do alelo selvagem e do mutado concomitantemente, pela leitura dos canais VIC e FAM, respectivamente (Figura 6).



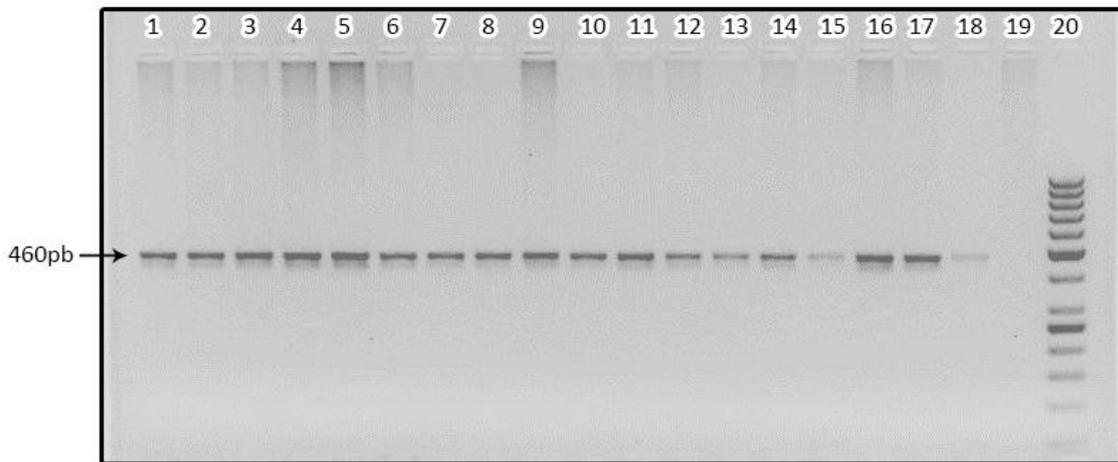
**Figura 6 - Padronização *in house* da pesquisa da mutação JAK2 V617F através de PCR em tempo real: Padrões de curvas observados para cada grupo de pacientes.** Curvas de amplificação de JAK2 em um paciente negativo para a mutação estudada (A), em paciente positivo heterozigoto para JAK2 V617F (B), e paciente positivo homozigoto para JAK2 V617F (C). A curva em verde indica a amplificação de JAK2 selvagem, e a curva em azul indica a amplificação de JAK2 V617F. Note que em pacientes com a ausência da mutação, também é observada amplificação de JAK2 V617F, no entanto, a curva que representa JAK2 selvagem apresenta maior expansão.

Como apresentado anteriormente, todos os resultados obtidos pelo método testado foram confirmados pelos resultados da análise prévia realizada com o *kit* comercial utilizado na rotina do laboratório. No entanto, para a implementação, pretende-se realizar uma curva de diluição seriada para a comparação da sensibilidades dos métodos.

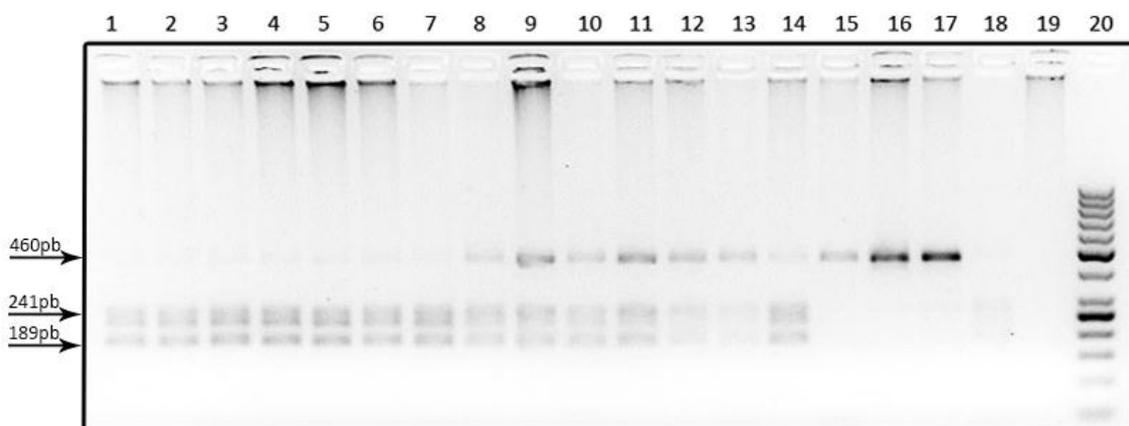
#### 4.3.2. RFLP-PCR

Para a RFLP-PCR, foram utilizadas 22 amostras previamente estudadas para a mutação, sendo nove negativas, nove positivas e quatro positivas homozigotas. A primeira sequência de experimentos teve como objetivo estabelecer a melhor concentração de DNA para a amplificação pela reação da PCR. Cinco amostras controle foram testadas em quatro reações de PCR com diferentes concentrações (50 ng, 100 ng, 300 ng e material puro), mantendo-se as outras condições das reações idênticas. Como resultado, obteve-se que 300 ng representa a concentração mais adequada para a amplificação por PCR. O próximo passo foi determinar a quantidade de produto necessário para a reação de digestão por endonuclease, testando-se duas reações, uma com 2  $\mu$ L de produto e outra com 10  $\mu$ L, mantendo-se o volume da enzima e da solução-tampão. O melhor resultado foi obtido quando se utilizou 10  $\mu$ L do produto amplificado.

Após a adequação das condições de reação, testou-se 22 amostras previamente analisadas para a mutação JAK2 V617F através do uso do *kit* comercial, para validação dos resultados obtidos pelo RFLP-PCR. Todas as amostras apresentaram o padrão de bandas esperado, confirmando a confiabilidade do método testado (Figuras 7 e 8). As amostras negativas para a mutação apresentam fragmentos com 241pb e 189pb, enquanto que para as positivas homocigotas observa-se uma banda com 460 pb e para as heterocigotas, as três bandas são observadas, como esperado.



**Figura 7 – Padronização *in house* da pesquisa de JAK2 V617F por RFLP-PCR: Amplificação de JAK2 por PCR:** linhas 1 a 18: amostras de pacientes com doenças mieloproliferativas previamente analisados para a presença da mutação JAK2 V617F através do *kit* comercial utilizados como controle para a validação do método RFLP-PCR; linha 19: branco; linha 20: marcador de 50 pb.

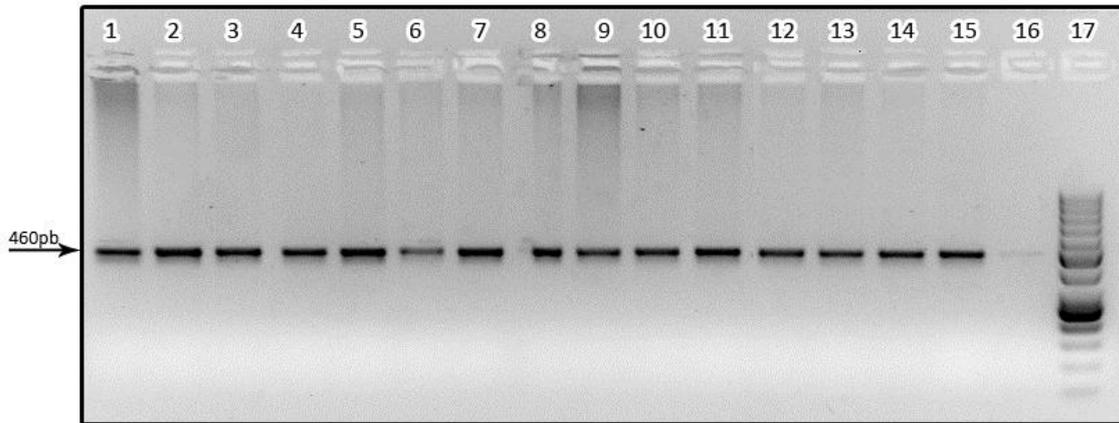


**Figura 8 - Padronização *in house* da pesquisa de JAK2 V617F por RFLP-PCR: Digestão por Bsa XI:** linhas 1 a 7: padrão de digestão observado em amostras negativas para a mutação, com fragmentos de 241 e 189 pb resultantes da digestão do alelo selvagem; linhas 8 a 14: amostras heterocigotas (observe a presença das três bandas); linhas 15 a 17: controles positivos homocigotos para a mutação no alelo JAK2 V617F com fragmento de 460pb. linha 18: amostra não amplificada; linha 19: branco; linha 20: marcador de 50 pb.

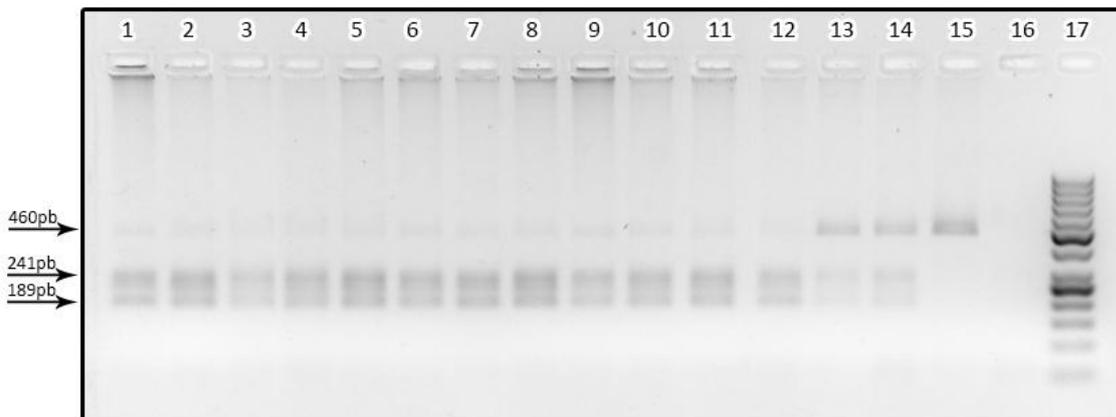
As duas metodologias avaliadas apresentaram resultados satisfatórios, confirmando o diagnóstico previamente estabelecido através do *kit* comercial. Para a análise dos pacientes incluídos nesta pesquisa, optou-se por utilizar o método de PCR-RFLP, visto que trata-se de uma metodologia de baixo custo e com boa eficiência. No entanto, o PCR em tempo real qualitativo representa uma opção mais viável para a implementação na rotina laboratorial por se tratar de um método mais rápido, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras em um curto período, contribuindo assim para a agilização do processamento das amostras e liberação dos resultados. No entanto, novas repetições devem ser realizadas e novos métodos serão testados antes da implementação na rotina laboratorial.

#### **4.4. Resultado da pesquisa da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD**

Um total de 40 amostras de pacientes com diagnóstico de SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas foram analisadas para a mutação JAK2 V617F. Amostras de pacientes com NMP testadas durante a padronização dos métodos descritos anteriormente foram utilizadas como controle. Todos os pacientes incluídos nesta pesquisa apresentaram fragmentos de 241 e 189 pb, resultantes da digestão do fragmento selvagem, indicando ausência da mutação (Figuras 9 e 10).



**Figura 9 – Análise da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD: Amplificação de JAK2 por PCR:** linhas 1 a 11: amostras de pacientes com SMD; linha 12: amostra controle de paciente com MPN negativo para a mutação; linhas 13 e 14: amostra de paciente com MPN com mutação em heterozigose, utilizado como controle; linha 15: amostra de paciente com MPN com mutação em homozigose, utilizado como controle; linha 16: branco; linha 20: marcador de 50 pb.

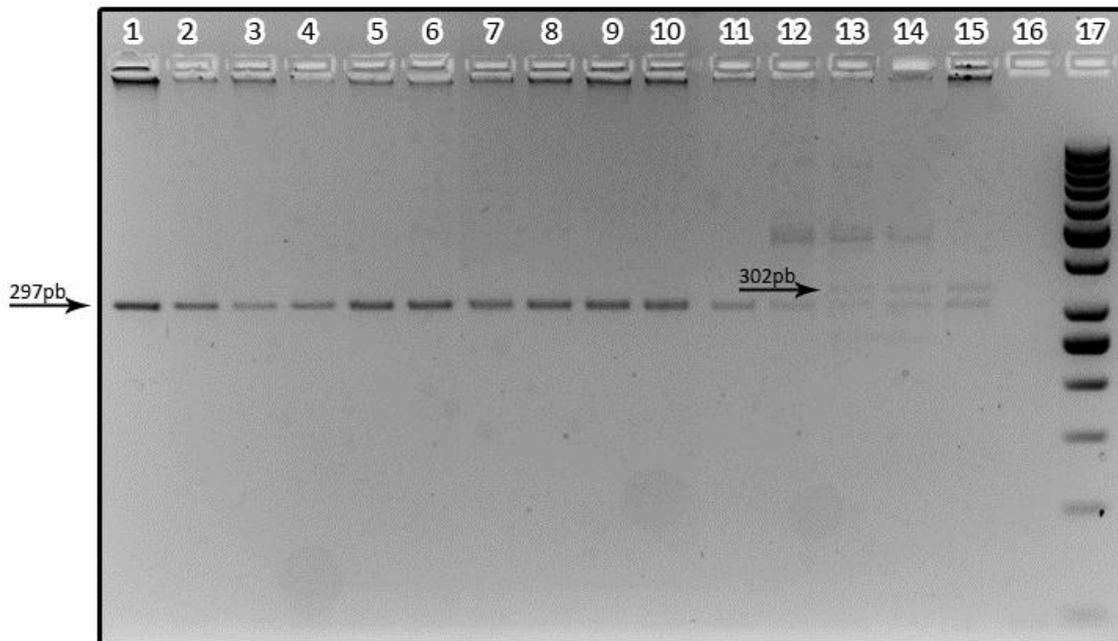


**Figura 10 - Análise da mutação JAK2 V617F em pacientes com SMD: Digestão por Bsa XI:** linhas 1 a 11: Todas as amostras de pacientes avaliadas apresentam somente os fragmentos de 241 e 189 pb, indicando a ausência da mutação; linha 2: amostra utilizada como controle negativo para a mutação, confirmando os resultados observados nos pacientes; linhas 13 e 14: amostras heterozigotas utilizadas como controle; linha 15: amostra-controle homozigota; linha 16: branco; linha 17: marcador de 50 pb.

#### 4.5 Resultados da pesquisa de mutações em CALR

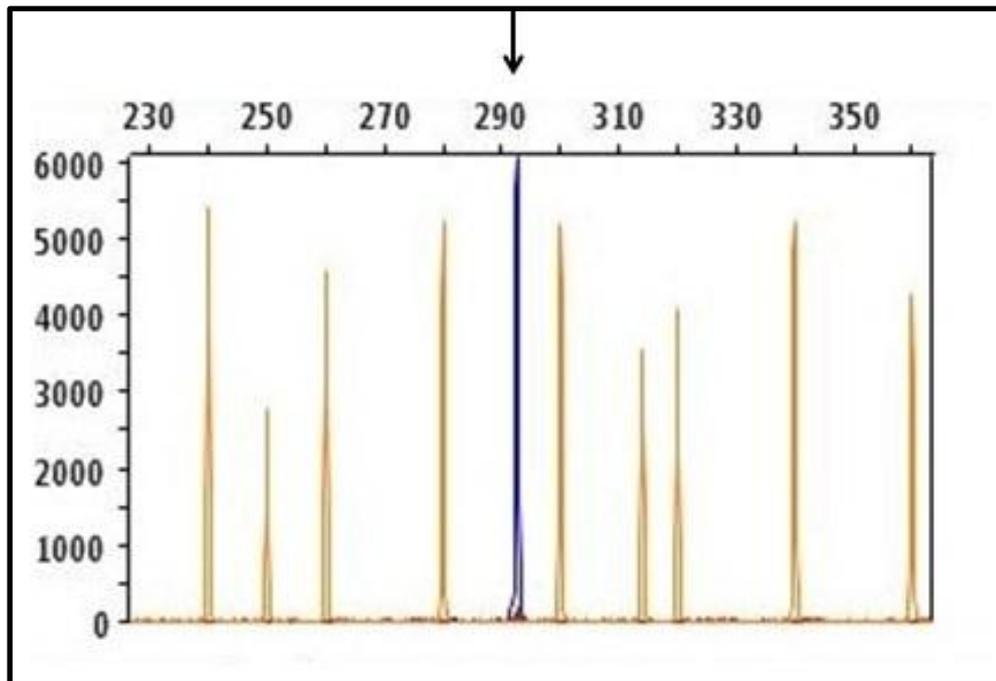
A pesquisa para mutações *indel* no gene CALR foi realizada em 40 amostras de pacientes com diagnóstico para SMD, SMD/NMP e LMA com alterações mielodisplásicas. Amostras controle positivo foram obtidas através da realização de testes com amostras de pacientes com NMP negativas para JAK2 V617F, grupo em que as mutações em CALR apresentam alta incidência. De acordo com a análise por PCR, todas as amostras analisadas

nesta pesquisa são negativas para a mutação, apresentando fragmentos com 297 pb (Figura 11).

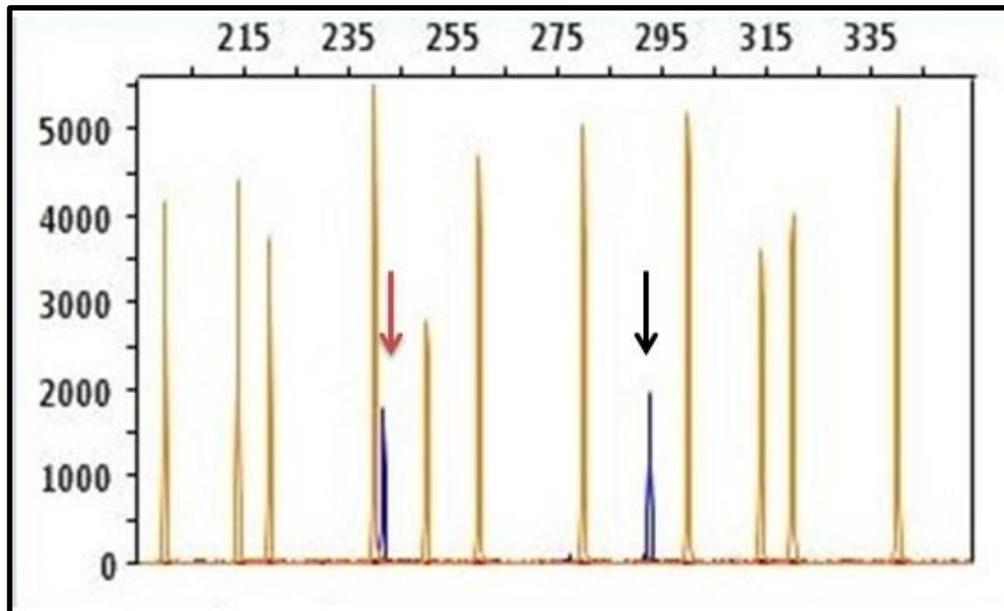


**Figura 11 – Análise da mutação no éxon 9 de CALR.** Amplificação dos alelos de interesse por PCR: linhas de 1 a 11: pacientes com SMD, todas as amostras apresentaram fragmentos de tamanho normal (297 pb), indicando ausência da mutação. Linha 12: amostras de pacientes com NMP utilizado como controle negativo para a mutação; linha 13 e a 14: amostras de NMP utilizadas como controle positivo (Tipo-1); linha 15: controle positivo para a mutação do Tipo 2; linha 16: branco; linha 17: marcador de 50 pb. Observe que as amostras 13, 14 e 15 apresentam uma banda inespecífica na altura de 400 pb. Estas bandas ocorreram somente nestas três amostras em todas as PCRs realizadas, dessa forma, novas condições de reação serão testadas para estas amostras. Observe também que não é possível distinguir eficientemente os padrões de bandas das mutações do tipo 1 (deleção de 52 pb) e do tipo 2 (inserção de 5 pb) através da visualização no gel, sendo que a confirmação destas amostras foi possível pela análise de fragmentos.

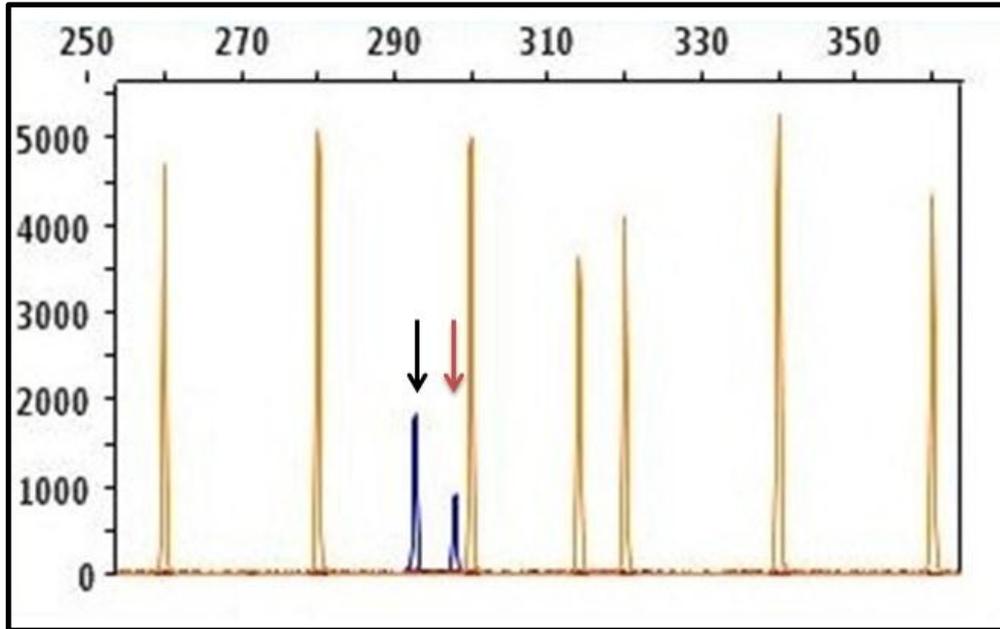
Até o presente momento, a confirmação da ausência da mutação foi realizada através da análise de fragmentos em 15 dos 40 pacientes. Adicionalmente, amostras controles negativo (n=1), positivo tipo 1 (n=2), positivo tipo 2 (n=1) também foram submetidas à análise de fragmento. A análise de fragmento é necessária para a confirmação dos casos negativos e para a definição do tipo de mutação para os casos mutados. Todas as amostras avaliadas através da análise de fragmento confirmam os resultados obtidos pela PCR (Figuras 12-14). As demais amostras (n=22) serão submetidas à análise de fragmento assim que possível.



**Figura 12 - Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em paciente com SMD negativo para a mutação.** Os picos em laranja representam o padrão interno Gene-Scan 600 LIZ Size Standart, o pico em azul representa os amplicon de CALR; as setas em preto representam o alelo selvagem (297pb). O eixo Y do grafico representa a intensidade de fluorescência e o eixo X superior, os pares de base.



**Figura 13 - Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em amostra controle positiva (Tipo 1).** Os picos em laranja representam o padrão interno Gene-Scan 600 LIZ Size Standart, os picos em azul representam os amplicons de CALR; a seta em preto representam o alelo selvagem (297pb) e a seta vermelhas o alelo mutato (245 pb). O eixo Y do grafico representa a intensidade de fluorescência e o eixo X superior, os pares de base.



**Figura 14 - Análise do tamanho de fragmentos dos amplicons de CALR em amostra controle positiva (Tipo 2).** Os picos em laranja representam o padrão interno Gene-Scan 600 LIZ Size Standart, os picos em azul representam os amplicons de CALR; a seta em preto representam o alelo selvagem (297pb) e a seta vermelha, o alelo mutato (302 pb). O eixo Y do grafico representa a intensidade de fluorescencia e o eixo X superior, os pares de base.

**DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

A SMD representa uma das cinco grandes categorias de neoplasias mieloides (TEFFERI & VARDIMAN, 2009). Esta doença tem caráter clonal e apresenta-se como um conjunto heterogêneo de desordens hematológicas decorrentes de alterações na proliferação, diferenciação e apoptose, que culminam em um processo hematopoético ineficaz e risco de progressão para LMA (LORAND-METZE, 2004; DAS, CHAUDHURI & LAW, 2013). A doença origina-se a partir de uma célula-tronco hematopoética que tenha adquirido lesões genéticas (WOLL et al., 2014). No entanto, outras mutações subsequentes e alterações epigenéticas contribuem para as características fenotípicas da doença e para a progressão clonal da mesma (TEFFERI & VARDIMAN, 2009).

A principal característica da SMD é a presença de displasia em uma ou mais linhagens (CAMPO et al., 2011). Dessa forma, a avaliação morfológica da medula óssea é um dos principais critérios de diagnóstico, no entanto, as displasias são muito variáveis e a avaliação das mesmas não é facilmente reproduzível. Assim sendo, a identificação de correlações entre características fenotípicas e o perfil genético podem contribuir significativamente para o estabelecimento do diagnóstico (MALCOVATI et al., 2014).

Avanços na análise citogenética permitiram a identificação de alterações cromossômicas recorrentes em cerca de 50% dos casos de SMD (HAASE et al., 2007). Este conhecimento permitiu a compreensão das relações entre anormalidades citogenéticas e as características morfológicas em algumas categorias da doença, contribuindo para a classificação e o diagnóstico (LINDSLEY & EBERT, 2013 b). A SMD del(5q) representa o primeiro subtipo de SMD reconhecido como uma categoria distinta devido a presença de uma anormalidade citogenética (VAN DEN BERGHE, 1974).

A identificação de mutações representa uma ferramenta potencialmente útil para o diagnóstico de neoplasias mieloides. Porém, em SMD, mutações em diversos genes foram recentemente descritas, não existindo uma mutação única que defina um marcador diagnóstico. Sendo assim, a investigação de mutações em diversos genes pode ser necessária para permitir uma correlação entre o genótipo e o fenótipo da doença, além de possibilitar a distinção do perfil genético de cada entidade diagnóstica (MALCOVATI et al., 2014; CAZZOLA, DELLA PORTA & MALVOVATI, 2014).

As alterações moleculares em SMD estão frequentemente relacionadas com genes que controlam diversos processos celulares essenciais para a hematopoese, incluindo genes

envolvidos na transdução de sinal (*FLT3*, *CSF1R*, *KIT*, *BRAF*, *PTPN11*, *NRAS/ KRAS*, *CBL*, *JAK2*), metilação do DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), na modificação de histonas (*ASXL1*, *EZH2*), regulação da transcrição (*RUNX1*, *ETV6*, *CEBPA*, *TP53*), e *splincing* do RNA (*SRSF1*, *SRSF2*, *U2AF35*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3A1*, *SF3B1*) (PAPAEMMANUIL et al, 2013; LINDSLEY & EBERT, 2013 a). Muitas destas mutações também são encontradas em outras neoplasias mieloides, como SMD/NPM, NMP e LMA (PAPAEMMANUIL et al, 2013).

Considerando a importância de estudos de identificação de mutações em SMD, optamos por pesquisar alterações moleculares já estabelecidas como critério diagnóstico ou prognóstico para outras neoplasias mieloides, visto que muitas mutações são compartilhadas. A pesquisa foi realizada para as mutações FLT3 e JAK2, utilizadas no prognóstico de LMA e diagnóstico de NPM, respectivamente (DÖHNER et al., 2010; CAMPBELL & GREEN, 2006; LEVINE & GILLIAND, 2008). Incluímos também a pesquisa da mutação no gene CALR, recentemente descrita como a segunda alteração molecular mais frequente em NMP negativos para mutação JAK2 (KLAMPFL et al, 2013).

O estudo foi inicialmente delineado para a população de pacientes com diagnóstico de SMD, no entanto, ampliamos a pesquisa para casos de doenças relacionadas, como SMD/NMP LMMC (n=1) e LMA com alterações mielodisplásicas (n=3). Estas doenças compartilham alterações citogenéticas e lesões moleculares recorrentes também encontradas em SMD, além de apresentarem características fenotípicas semelhantes, como a presença de displasia (TIU et al., 2011). De acordo com a classificação da *French American British* (FAB) de 1982, estas duas categorias de neoplasias mieloides eram classificadas como SMD (BENNET et al., 1982). Posteriormente, pela classificação da OMS publicada inicialmente em 2001 e atualizada em 2008, estes grupos foram realocados (WEINBERG et al., 2009; BENNET, 2013; BRUNNING, 2008).

A LMMC apresenta características mieloproliferativas e displásicas, dessa forma, a partir da revisão realizada pela OMS em 2008, este grupo passou a compor a categoria de SMD/NMP (BRUNNING, 2008; GREENBERG et al., 2011). Ainda de acordo com a OMS, a LMA com alterações mielodisplásicas, antes classificada como anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) pela FAB, compreende os casos de LMA secundária a SMD, LMA com displasia em múltiplas linhagens e LMA com alterações citogenéticas associadas à SMD (BRUNNING, 2008; GREENBERG et al., 2011, WEINBERG et al., 2009).

Como esperado, a população incluída em nosso estudo apresentou idade avançada, com idade mediana de 66 anos (28-85). De acordo com Greenberg e colaboradores, a mediana

de idade em pacientes com SMD está compreendida na faixa de 65 a 70 anos (GREENBERG et al., 2011). Dentre a população incluída em nossa coorte, cinco (12,5%) dos pacientes apresentaram idade inferior a 50 anos, sendo que esta baixa incidência nesta faixa etária também foi encontrada em estudos sobre a etiologia da doença. Germing e colaboradores relatam que menos de 10% dos pacientes com SMD encontram-se nesta faixa etária (GERMING et al., 2004).

A pesquisa da mutação FLT3-ITD demonstrou que todos os pacientes incluídos neste trabalho são negativos para esta alteração molecular. A mutação FLT3-ITD tem sido descrita com baixa frequência em pacientes com SMD e LMMC, com incidência inferior a 2% em ambos os grupos (DAVER et al., 2013). A aquisição desta mutação tem sido relacionada com a progressão da SMD para LMA (SHIH et al., 2004). Em estudo publicado por Pinheiro e colaboradores, dois dos 50 pacientes analisados em um estudo prospectivo adquiriram a mutação um ano após o diagnóstico e evoluíram para LMA posteriormente (PINHEIRO et al., 2008).

Em LMA, a frequência da mutação é alta, ocorrendo em aproximadamente 30% dos casos (KOTTARIDIS et al., 2001). A identificação de FLT3-ITD como a mutação mais frequente em LMA trouxe importantes avanços para a definição do prognóstico, sendo que sua presença indica um prognóstico desfavorável (DÖHNER et al., 2010). Ademais, a compreensão de que a presença desta mutação está relacionada à ativação constitutiva do receptor tirosino quinase permitiu o desenvolvimento e utilização de moléculas inibitórias, capazes de desativar este receptor (FISCHER et al., 2010; KOTTARIDIS et al., 2001).

Mutações em JAK2 não foram encontradas na população analisada neste trabalho. A ocorrência desta alteração molecular é rara em pacientes com SMD, estando presente em menos de 10% dos casos (STEENSMA et al., 2005; JEKARL et al., 2010). Em SMD/NMP e no subgrupo ARSA-T a incidência é maior, estando próxima a 22% e 13%, respectivamente (JEKARL et al., 2010). Entretanto, nenhum dos nossos pacientes foi classificado como ARSA-T e apenas um paciente de nossa coorte foi classificado como SMD/NMP LLMC, o que provavelmente justifica a ausência da mutação JAK2 em nossa coorte.

A mutação JAK2 V617F é encontrada predominantemente em NMP BCR/ABL negativas, sendo utilizada como critério diagnóstico neste grupo (KLAMPFL et al., 2013). Em politemia vera, a incidência da mutação é superior a 90%, enquanto que em mielofibrose primária e trombocitopenia essencial, 50-60% dos pacientes apresentam o alelo mutado para JAK2 V617F (CAMPBELL & GREEN, 2006). Este marcador molecular foi descoberto em 2005 (KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005), contribuindo significativamente para

o diagnóstico de MPN e para o desenvolvimento de inibidores para este alvo terapêutico (LEVINE & GILLIAND, 2008).

As mutação *indel* no gene CALR foram recentemente descritas em cerca de 73% dos pacientes com NMP, do subgrupo trombocitopenia essencial e mielofibrose primária, negativos para as mutações JAK2 V617F e MPL (KLAMPFL et al., 2013). Em nosso estudo, os 40 pacientes analisados através da reação da PCR apresentaram fragmentos de tamanho normal, indicando a ausência da mutação. Destes 40 pacientes, 15 tiveram a confirmação da negatividade da mutação através da análise de fragmentos. Os demais casos serão submetidos ao sequenciamento para confirmação. Estes resultados estão de acordo com os achados de Klampfl e colaboradores, que relataram que nenhum dos 73 casos de SMD pesquisados para CALR apresentaram mutações neste gene (KLAMPFL et al., 2013). Estas mutações foram identificadas somente em cerca de 10% dos pacientes com SMD/NMP subgrupo leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (KLAMPFL et al., 2013). Já em outro trabalho, publicado por Nangalia e colaboradores, mutações em CALR foram identificadas em 8% dos pacientes com SMD, nos subgrupos AR, ARSA e AREB. (NANGALIA et al., 2013). Apesar de nenhum de nossos pacientes terem apresentado mutação CARL, a padronização da pesquisa desta mutação é de grande valia, pois auxilia a implementação da pesquisa desta mutação em pacientes com NMP de nossa Instituição.

**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, o presente trabalho demonstrou que mutações nos genes FLT3, JAK2 e CALR são raras em pacientes com SMD da nossa Instituição. Os 40 pacientes analisados foram identificados como triplo negativos para as mutações de interesse. A realização deste trabalho representou um passo inicial na identificação e seleção sistematizada dos pacientes com diagnóstico de SMD e doenças relacionadas em seguimento em nossa Instituição, e foi de grande valia para a padronização de métodos moleculares para a investigação de mutação JAK2 V617F e mutação *indel* no gene CALR com potencial uso na rotina de atendimento aos pacientes com hipótese diagnóstica de SMD, SMD/NMP, LMA com alterações mielodisplásicas, e NMP. A padronização da investigação de outras mutações e a ampliação da coorte de pacientes com SMD são necessários para avançarmos nas pesquisas e no estabelecimento de correlações entre o perfil genético e as características fenotípicas da SMD.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014; 383(9936): 2239-2252.
- BENNET, J. M. The myelodysplastic syndromes: a personal recollection of four decades of classification and prognostic scoring systems. *Leukemia & Lymphoma*. 2013; 54(12): 2588–2591.
- BENNETT J. M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982; 51:189-99.
- BRUNNING, R. D. et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, eds. *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008: 88-107.
- CAMPBELL, P. J. & GREEN, A.R. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2452-66.
- CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011; 117: 5019-5032.
- CAZZOLA, M. & KRALOVICS, R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123 (24): 3714-3719.
- CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M. G. & MALVOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013.
- CHI, J. et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*. 2014; 28: 1152–1154.
- DAS, M., CHAUDHURI, S., LAW, S. Unveiling the paradoxical nature of myelodysplastic syndromes (MDS): Why hypercellular marrow strongly favors accelerated apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 91( 999): 1-6.
- DAVER, N. et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2013; 88(1): 56-59.
- DAVIDS, M. S., & STEENSMA, D. P. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer biology & therapy*. 2010; 10(4): 309-319.
- 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; 115: 453–474.

FISCHER, T.; et al. Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS- Like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients with Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome with Either Wild-Type or Mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28 (28): 4339-4345.

GERMING, U. et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004; 89: 905-910.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100(5): 1532-1542.

GRAF, C. et al. A neo-epitope generated by a FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*. 2007; 109: 2985-2988.

GREENBERG, P.L. et al. Myelodysplastic Syndromes: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011. 9 (1): 30-56.

GREENBERG, P.L. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120(12): 2454-2465.

HAASE, D. et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110: 4385-4395.

HELLSTROM-LINDBERG, E; CAZZOLA, M. The role of JAK2 mutations in RARS and other MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008. 52-59.

HOFFBRAND, A. V. & MOSS, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia*. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.

JAMES, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037): 1144-1148.

JEKARL, D. W. et al. JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia. *Korean J Hematol*. 2010; 45(1): 46-50.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013; 369(25): 2379-2390.

KOTTARIDIS, P. D. et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001; 98(6): 1752-1759.

- KRALOVICS, R. et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1779-1790.
- LEVINE, R. & GILLIAND, D. G. Myeloproliferative disorders. *Blood.* 2008; 112 (6): 2190-2198.
- LEVINE, R. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7(4): 387-97.
- LINDSLEY, R. C. & EBERT, B. L. (a) Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2013; 8: 21-47.
- LINDSLEY, R. C. & EBERT, B. L. (b) The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. Prepublished online August 16, 2013. *Blood.*
- LORAND-METZE, I. Síndromes Mielodisplásicas. Conceito e Classificação. Diagnóstico. Evolução e Complicações. Tratamento. In: Zago, M.A. (Org.); Falcao, R.P. (Org.) ; Pasquini R. (Org.) . *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Editora Atheneu, 2004; 519-536.
- MALCOVATI, L. et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood.* 2014; 124: 1513-1521.
- MORAES, A. C. R. et al. Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais ea classificação OMS 2008. *Rev bras hematol hemoter.* 2009; 31(6): 463-70.
- NANGALIA J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25): 2391–2405.
- O'SHEA, J. J., HOLLAND, S. M., & STAUDT, L. M. (2013). JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *New England Journal of Medicine.* 2013; 368(2): 161-170.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013; 122 (22): 3616-3627.
- PINHEIRO, R. F. et al. FLT3 internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008; 183: 89-93.
- RAZA, A. et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1995; 86: 268–76.
- REGO, E. M. Hematopoese: Regulação e microambiente. In: Zago, M.A. (Org.);Falcao, R. P. (Org.) ; Pasquini R. (Org.) . *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Editora Atheneu, 2004; 15-22.
- RUMI, E. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood.* 2014; 123 (10): 1544-1551.

SHIH, L. Y. et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004, 18(3): 466-475.

SOUZA, M. C. L. Detecção de alterações genético-moleculares em neoplasias mieloproliferativas crônicas: correlações com a clínica e escores prognósticos em mielofibrose idiopática. 2013. 108p. Dissertação (Mestrado em Hematologia). Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

STEENSMA, D. P. et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005; 106(4): 1207-1209.

TEFFERI, A. & VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009; 361(19): 1872-85.

TIU, R. V. et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011; 117 (17): 4552-4560.

VAN DEN BERGHE H, et al. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*. 1974; 251(5474): 437-438.

VARDIMAN J.W., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5): 937-51.

WALTER, M.J et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1090–98.

WEINBERG, O. K. et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009; 113(9): 1906-1908.

WOLL, P. S. et al. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2014; 25(6): 794-808.

YAMAMOTO, Y. et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001; 97: 2434-2439.



## ANEXO A- Ficha Clínica

**Ficha Clínica****Registro de Identificação:** \_\_\_\_\_**Data da coleta:** \_\_\_\_\_ **Amostra (s):** \_\_\_\_\_

Data de nascimento:

Idade atual:

Data do diagnóstico:

MO ou SP:

Material:    ( ) DNA            ( ) RNA            ( ) Células

Conclusão do Diagnóstico:

Data da Progressão:

Data da última avaliação:

Data do óbito:

Tratamentos prévios:

Protocolo de exclusão:

Ferritina	Ferro sério	UIBC
Dosagem de ácido fólico		Vitamina B12
Sorologias: HIV	HCV	HBV
TGO	TGP	FALC
	GGT	BI
		BD
		BT
Eletroforese de proteínas séricas		TTPA / TP
NA	K	Ureia
		Crea
TSH	T4 livre	
FAN	Fator reumatóide	
LDH	HPN	
RX de tórax		
Ultrassonografia de abdômen		



**Anexo B** - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.



Ribeirão Preto, 27 de setembro de 2006

Ofício nº 2753/2006  
CEP/SPC

**Prezado Professor,**

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a solicitação de criação do banco de amostras de células de medula óssea e sangue no Laboratório de Hematologia.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 234ª Reunião Ordinária realizada em 25.09.2006, analisou a proposta de criação e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 8723/2006.

Atenciosamente.

**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

**PROF. DR. EDUARDO MAGALHÃES REGO**

Depto. de Clínica Médica – Laboratório de Hematologia