



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM
CITOPENIA CLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO,
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E NEOPLASIAS MIELÓIDES RELACIONADAS**

LUCIENE DA CRUZ OLIVEIRA

Salvador - Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PERFIL DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM
CITOPENIA CLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO,
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E NEOPLASIAS MIELÓIDES RELACIONADAS**

LUCIENE DA CRUZ OLIVEIRA

Orientadora: Dra. Dalila Lucíola Zanette

Co-orientador: Dr. Marco Aurélio Salvino Araújo

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para obtenção do grau de
Mestre.

Salvador - Bahia

2018

Dedico este trabalho à minha família e amigos que me ajudaram a torná-lo possível.

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe
no que você não conhece como eu
mergulhei. Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento”.*

Clarice Lispector.

AGRADECIMENTOS

À minha queridíssima orientadora Dra. Dalila Lucíola Zanette

Por estar do meu lado e me ajudar em simplesmente tudo que precisei.

Aos meus pais Jandira da Cruz Oliveira e Raimundo Almeida de Oliveira

Por sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão Luciano da Cruz Oliveira, minha cunhada Karla Mendes Aragão e minha sobrinha Luiza Mendes Oliveira

Por também sempre acreditarem em mim.

À Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Por ter me recebido em seu grupo de pesquisa.

Ao meu co-orientador Dr. Marco Aurélio Salvino Araújo

Por ter me acolhido em minha volta para Salvador.

Aos professores da banca

Por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Às minhas colegas de trabalho Marie e Ivana

Por acreditarem e me ajudarem na execução do projeto.

À minha amiga e colega de pós-graduação Taís Sena

Pelo grande presente que é sua amizade e todo o apoio durante esta jornada.

Aos meus colegas de trabalho Larissa Lucas, Paula Caldas, Alessandro Moura e Tiago Freitas

Por me estenderem a mão todas às vezes que precisei me ausentar em atividades da assistência hospitalar.

À toda equipe da Biblioteca IGM/Fiocruz-Ba
Pela revisão cuidadosa para publicação deste trabalho.

À toda equipe da plataforma de sequenciamento IGM/Fiocruz-Ba
Pelo cuidado na execução do trabalho.

Aos professores do PgPat
Por todo conhecimento compartilhado.

À equipe CBTC/HSR em especial Ciro Pereira
Pela imensa ajuda com a análise citogenética.

Agradecimento especial ao meu estimado colega Vitor Lisboa e toda equipe do STS
Por nos receberem de portas abertas.

Aos meus eternos professores do serviço de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp.
Em especial, Bruno Kosa e Fernando Pericole
Por me ensinarem a ser a hematologista que sou hoje.

O meu eterno agradecimento para minhas amigas e colegas de residência: Paola,
Pamella e Eliana
Pelos dois anos de grande aprendizado que passamos juntas.

À cada paciente participante deste projeto
Pela compreensão e pelo simples ato de doar.

À música...
Por me trazer paz e calma para edição final deste manuscrito.

À Deus
Por permitir que tudo isso fosse possível.

OLIVEIRA, Luciene da Cruz. Perfil de mutações em pacientes com citopenia clonal de significado indeterminado, síndrome mielodisplásica e neoplasias mielóides relacionadas. 99 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Mutações em inúmeros genes são descritas em neoplasias mielóides. O avanço de técnicas de sequenciamento contribuiu para a identificação destas mutações em pacientes com citopenias e sem critérios diagnósticos para neoplasia mielóides. **OBJETIVO:** Avaliar a prevalência de mutações nos genes: *SF3B1*, *TET2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *TP53*, *OGG1*, *XRCC1* e *APEX1* em pacientes com citopenias, síndrome mielodisplásica e neoplasias mielóides relacionadas. **MATERIAL E MÉTODOS:** A extração de DNA foi realizada a partir de sangue da medula óssea de pacientes maiores de 18 anos e com diagnóstico de citopenias e neoplasias mielóides relacionadas sem tratamento específico no momento da coleta. Foi realizado o sequenciamento por PCR dos fragmentos que continham as principais mutações. Os dados foram analisados com o *software IBM SPSS Data Analysis and Statistical Software*, versão 21.0. **RESULTADOS:** Foram avaliados 47 pacientes, 22 pacientes com diagnóstico de citopenia sem critérios para diagnóstico de neoplasias mielóides, 18 pacientes com Síndrome Mielodisplásica, 5 pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa não classificada e dois casos com Leucemia Mielóide Aguda Secundária. A mediana de idade do grupo total de casos foi 65 anos, com leve predomínio do sexo masculino (57,4%). Trinta e quatro pacientes (72,3%) apresentaram pelo menos um gene mutado. Os principais genes mutados em ordem decrescente de frequência foram: *APEX1* (58,8%), *XRCC1* (47%), *U2AF1* (31,2%), *OGG1* (29,4%), *TET2* (28,1%), *TP53* (9,4%), *SF3B1* (6,7%) e *IDH2* (6,2%). O grupo com Síndrome Mielodisplásica apresentou o maior número de casos com genes mutados ($p=0,042$). Vinte e seis casos, com pelo menos uma mutação identificada, tinham cariótipo normal ($p=0,319$) e os pacientes com idade superior a 60 anos apresentaram maior taxa de pelo menos um gene mutado ($p=0,021$). A presença de mutação foi maior com níveis de hemoglobina maiores que 10g/dL ($p=0,035$) e porcentagem de blastos menor que 2% na medula óssea ($p=0,023$). No grupo de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, a presença de mutação também foi mais associada a porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2% ($p=0,007$). **CONCLUSÕES:** O perfil de mutações nos genes avaliados neste trabalho apresentou frequência diferente em relação a dados previamente publicados em relação aos genes *SF3B1* e *U2AF1*. Isto pode estar relacionado a diferenças étnicas populacionais de nossa amostra estudada. A frequência alta de mutações germinativas nos genes de reparo: *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1* foi um resultado relevante e chama a atenção a presença destas mutações no grupo de pacientes com citopenia clonal de significado indeterminado. Estudos adicionais são necessários para melhor avaliação deste resultado e suas implicações em evolução prognóstica.

Palavras-chave: Citopenia, Síndrome Mielodisplásica, Mutações.

OLIVEIRA, Luciene da Cruz. Mutations profile in patients with clonal cytopenia of undetermined significance, myelodysplastic syndromes and related neoplasms. 99 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Mutations in numerous genes are described in myeloid neoplasms. The advancement of sequencing techniques contributed to the identification of these mutations in patients with cytopenias therefore without diagnostic criteria for myeloid neoplasms. **AIM:** To evaluate the prevalence of mutations in the genes: *SF3B1*, *TET2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *TP53*, *OGG1*, *XRCC1* and *APEX1* in patients with cytopenias, myelodysplastic syndrome and related myeloid neoplasms. **MATERIAL AND METHODS:** DNA extraction was performed from bone marrow blood of patients older than 18 years and diagnosed with cytopenias and related myeloid neoplasms without specific treatment at the time of collection. PCR sequencing of the fragments containing the major mutations was performed. The data were analyzed with IBM SPSS Data Analysis and Statistical Software, version 21.0. **RESULTS:** Forty seven patients were analysed, 22 patients with diagnosis of cytopenia without criteria for myeloid neoplasms, 18 patients with Myelodysplastic Syndrome, 5 patients with diagnosis of Myelodysplastic Syndrome/Mieloproliferative Syndrome unclassificable and two cases with Secondary Acute Myeloid Leukemia. The median age of the total group of cases was 65 years, with a slight predominance of males (57.4%). Thirty-four patients (72.3%) had at least one mutated gene. The major mutated gene in order of decreasing frequency were: *APEX1* (58,8%), *XRCC1* (47%), *U2AF1* (31,2%), *OGG1* (29,4%), *TET2* (28,1%), *TP53* (9,4%), *SF3B1* (6,7%) and *IDH2* (6,2%). The group with Myelodysplastic Syndrome had the highest number of cases with mutated genes ($p=0.042$). Twenty-six cases, with at least one mutation identified, had normal karyotype ($p=0.319$) and patients aged over 60 years had a higher rate of at least one mutated gene ($p=0.021$). The presence of mutation was higher with hemoglobin levels greater than 10 g / dL ($p=0.035$) and blasts less than 2% in the bone marrow ($p=0.023$). In the group of patients diagnosed with Myelodysplastic Syndrome, the presence of mutation was also more associated with less than 2% of blasts in bone marrow ($p = 0.007$). **CONCLUSION:** The profile of mutations in the genes evaluated in this study presented different frequency in relation to data previously published in relation to *SF3B1* and *U2AF1* genes. This may be related to ethnic population differences in our sample. The high frequency of germline mutations in DNA repair genes: *XRCC1*, *OGG1* and *APEX1* was a relevant result and the presence of these mutations in the group of patients with clonal cytopenia of undetermined significance is important. Further studies are needed to better evaluate this outcome and its implications for prognostic evolution.

Keywords: Cytopenia, Myelodysplastic Syndrome, Mutations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Sobrevida global e sobrevida livre de leucemia.....	20
Figura 2.	Exemplos de alterações morfológicas de mielodisplasia em aspirado de medula óssea.....	21
Figura 3.	Aquisição temporal de mutações em Síndrome Mielodisplásica.....	22
Figura 4.	Mutações em genes que codificam o complexo proteico do spliceossomo.....	23
Figura 5.	Papel das proteínas codificadas por genes mutados na Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda na metilação do DNA do DNA.....	23
Figura 6.	Distribuição de pacientes com SMD em um estudo populacional Sulamericano.....	24
Figura 7.	Sobrevida global e sobrevida livre de leucemia - <i>IPSS-R</i>	27
Figura 8.	Fração de pacientes com diagnóstico de SMD e identificação de pelo menos 1 mutação detectada por citogenética, sequenciamento e combinação das duas técnicas.....	28
Figura 9.	Distribuição de mutações recorrentes e anormalidades citogenéticas na Síndrome Mielodisplásica.....	29
Figura 10.	Frequência de mutações somáticas em <i>CCUS</i> e SMD.....	38
Figura 11.	Frequência de genes mutados na <i>CHIP</i>	39
Figura 12.	Modelo de expansão e evolução clonal.....	40
Figura 13.	Exemplo de mutação K700E detectada no gene <i>SF3B1</i>	47
Figura 14.	Tipos de citopenias e linhagem acometida no total de pacientes.....	50
Figura 15.	Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo citopenias.....	51

Figura 16. Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo SMD.....	52
Figura 17. Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo SMD/SMP.....	54
Figura 18. <i>IPSS-R</i> no grupo SMD.....	56
Figura 19. Frequência do número de genes mutados.....	58
Figura 20. Associação entre presença de pelo menos um gene mutado e diagnóstico	60
Figura 21. Associação entre número de genes mutados e diagnóstico.....	60
Figura 22. Associação entre presença de genes mutados e citogenética.....	61
Figura 23. Associação entre presença de genes mutados e sexo e idade.....	62
Figura 24. Associação entre presença de genes mutados e tipo de citopenia e números de linhagens celulares acometidas.....	62
Figura 25. Associação entre presença de genes mutados e Hb, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	64
Figura 26. Associação entre presença de genes mutados e Hb, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea no grupo citopenias.....	65
Figura 27. Associação entre presença de genes mutados e Hb, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea no grupo SMD.....	66
Figura 28. Associação entre <i>U2AF1</i> mutado e idade e sexo.....	67
Figura 29. Associação entre <i>U2AF1</i> mutado e hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	68
Figura 30. Associação entre <i>U2AF1</i> mutado e tipo de citopenia.....	69
Figura 31. Associação entre <i>TET2</i> mutado com idade e sexo.....	70

Figura 32. Associação entre <i>TET2</i> mutado e hemoglobina, neutrófilos, Plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	71
Figura 33. Associação entre <i>TET2</i> mutado e tipo de citopenia.....	72
Figura 34. Associação entre <i>XRCC1</i> mutado com idade e sexo.....	72
Figura 35. Associação entre <i>XRCC1</i> mutado e hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	73
Figura 36. Associação entre <i>XRCC1</i> mutado e tipo de citopenia.....	74
Figura 37. Associação entre <i>OGG1</i> mutado com idade e sexo.....	75
Figura 38. Associação entre <i>OGG1</i> mutado e hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	76
Figura 39. Associação entre <i>OGG1</i> mutado e tipo de citopenia.....	77
Figura 40. Associação entre <i>APEX1</i> mutado com idade e sexo.....	78
Figura 41. Associação entre <i>APEX1</i> mutado e hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	79
Figura 42. Associação entre <i>APEX1</i> mutado e tipo de citopenia.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação Síndrome Mielodisplásica.....	19
Tabela 2.	<i>IPSS-R</i>	27
Tabela 3.	Mutações mais comuns em SMD e SMD/SMP.....	34
Tabela 4.	Critérios diagnósticos <i>CCUS</i>	37
Tabela 5.	Características Epidemiológicas da população.....	49
Tabela 6.	Características Laboratoriais da população.....	55
Tabela 7.	Frequência e perfil de genes mutados.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEX1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1</i>
ASXL1	<i>Additional Sex Combs Like 1</i>
CBTC	Centro de Biotecnologia e Terapia Celular
CCUS	Citopenia Clonal de Significado Indeterminado
CHIP	Hematopoiese Clonal de potencial indeterminado
CMV	Citomegalovírus
DNMT3A	<i>DNA Methyltransferase 3 Alpha</i>
EB	Excesso de blastos
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HB	Hemoglobina
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSR	Hospital São Rafael
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
ICUS	Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado
IDH1/2	<i>Isocitrate dehydrogenases 1 and 2</i>
IGM	Instituto Gonçalo Muniz
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>
JAK2	<i>Janus quinase 2</i>
LIGHT	Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMAs	Leucemia Mielóide Aguda Secundária
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
MO	Medula Óssea

NAACCR	<i>North American Association of Central Cancer Registries</i>
NGS	<i>Next-Generation sequencing</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
OGG1	<i>8-Oxoguanine DNA Glycosylase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SA	Sideroblastos em anel
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3b Subunit 1</i>
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD/SMP	Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP	Sangue Periférico
SRSF2	<i>Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2</i>
STS	Serviço de Transfusão de Sangue
T4	Tiroxina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TSH	Hormônio Tireoestimulante
U2AF1	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WHO	<i>World Health Organization</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
ZRSR2	<i>Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.....	18
1.1.1 Conceito e Classificação	18
1.1.2 Patogênese	21
1.4.3 Epidemiologia	24
1.1.4 Manifestações Clínicas	25
1.1.5 Diagnóstico	25
1.1.6 Prognóstico	26
1.1.7 Citogenética e Biologia Molecular	28
1.1.8 Mutações em Genes Reguladores do Splicing	30
1.1.9 Mutações em Genes Reguladores da Epigenética	31
1.1.10 Mutações em Genes ee Reparo de DNA	32
1.1.11 Tratamento	34
1.1.12 Perspectivas Futuras	35
1.2 CITOPENIA IDIOPÁTICA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (IDIOPATHIC CYTOPENIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE ICUS).....	36
1.3 CITOPENIA CLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (CLONAL CYTOPENIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE - CCUS).....	37
1.4 HEMATOPOESE CLONAL DE POTENCIAL INDETERMINADO (CLONAL HEMATOPOIESIS OF INDETERMINATE POTENTIAL - CHIP).....	38
2. JUSTIFICATIVA	41

3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO.....	43
4.2 SUJEITOS E MÉTODOS	43
4.3 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	45
4.4 SELEÇÃO DE GENES E <i>SNPs</i>	45
4.5 EXTRAÇÃO DNA.....	46
4.6 PADRONIZAÇÃO <i>PRIMERS</i> E <i>PCR</i>	46
4.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE.....	46
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	47
5. RESULTADOS	48
5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	48
5.1.1 Perfil epidemiológico da população	48
5.1.2 Características Laboratoriais: hemograma, porcentagem de blastos na medula óssea e citogenética	49
5.1.3 Classificação de Risco (<i>IPSS-R</i>) no grupo SMD	56
5.1.4 Frequência e perfil de genes mutados	57
5.2 ANÁLISES DAS MUTAÇÕES.....	59
5.2.1 Associação entre presença e número de mutações e diagnóstico	59
5.2.2 Associação entre presença de mutações e dados citogenéticos	60

5.2.3	Associação entre presença de mutações e sexo e idade.....	61
5.2.4	Associação entre presença de mutações e tipo e número de citopenia.....	62
5.2.5	Associação entre presença de mutações e níveis de hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea.....	63
5.3	ANÁLISES DO GENE <i>U2AF1</i>.....	67
5.3.1	Análise do perfil epidemiológico e gene <i>U2AF1</i> mutado.....	67
5.3.2	Análise do perfil laboratorial e gene <i>U2AF1</i> mutado.....	68
5.4	ANÁLISES DO GENE <i>TET2</i>.....	69
5.4.1	Análise do perfil epidemiológico e gene <i>TET2</i> mutado.....	69
5.4.2	Análise do perfil laboratorial e gene <i>TET2</i> mutado.....	70
5.5	ANÁLISES DO GENE <i>XRCC1</i>.....	72
5.5.1	Análise do perfil epidemiológico e gene <i>XRCC1</i> mutado.....	72
5.5.2	Análise do perfil laboratorial e gene <i>XRCC1</i> mutado.....	73
5.6	ANÁLISES DO GENE <i>OGG1</i>.....	74
5.6.1	Análise do perfil epidemiológico e gene <i>OGG1</i> mutado.....	74
5.6.2	Análise do perfil laboratorial e gene <i>OGG1</i> mutado.....	74
5.7	ANÁLISES DO GENE <i>APEX1</i>.....	77
5.7.1	Análise do perfil epidemiológico e gene <i>APEX1</i> mutado.....	77
5.7.2	Análise do perfil laboratorial e gene <i>APEX1</i> mutado.....	77
6.	DISCUSSÃO.....	81
7.	CONCLUSÕES.....	89
8.	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

1.1.1 Conceito e Classificação

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogêneo de doenças de origem clonal hematopoiética, com expressão clínica variável, caracterizada por citopenias em sangue periférico, mielodisplasia, eritropoiese ineficaz e risco de progressão para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). O aumento do índice de apoptose de células precursoras na medula óssea contribui para a citopenia encontrada na SMD e pelo menos um tipo de citopenia é critério obrigatório para o diagnóstico. Os limites de definição de citopenias em sangue periférico foi estabelecido no *International Prognostic Scoring System (IPSS)* para estratificação de risco: hemoglobina menor que 10 g/dL, contagem de neutrófilos menores que 1800/ μ L e contagem de plaquetas menor que 100 000/ μ L. A maioria dos pacientes apresentarão contagens inferiores às citadas, contudo o diagnóstico de SMD pode ser confirmado em casos com níveis superiores aos mencionados, mas abaixo de valor de referência normal para idade e sexo do paciente (SWERDLOW et al., 2008; ARBER et al., 2016).

SMD primária ou *de novo* ocorre sem história prévia de exposição a quimioterapias ou radiação. Fatores etiológicos possíveis para SMD são riscos ocupacionais, como contato direto com derivados do benzeno e agentes químicos utilizados na agricultura. Outros possíveis riscos são tabagismo e história familiar de neoplasias mielóides (STROM et al., 2005).

Conforme revisão recente de definições de neoplasias mielóides pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 2016, a SMD é classificada em seis subtipos: SMD com displasia unilinhagem, SMD com displasia multilinhagem, SMD com sideroblastos em anel, SMD com del(5q) isolada, SMD com excesso de blastos e SMD não classificada (ARBER et al., 2016). Esses subtipos são classificados de acordo com o número de citopenias em sangue periférico, a porcentagem de blastos na medula óssea e a presença de sideroblastos em anel (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação Síndrome Mielodisplásica. (Adaptado OMS, 2016).

Nome	Linhasgens Displásicas	Citopenias*	Sideroblastos em Anel (%)	Blastos em MO ou SP	Citogenética (análise cariótipo convencional)
SMD com displasia unilinhagem	1	1 ou 2	<15%/<5%**	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações exceto del(5q) isolada
SMD com displasia multilinhagem	2 ou 3	1-3	<15%/<5%**	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações exceto del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA)					
SMD-SA com displasia unilinhagem	1	1 ou 2	≥15%/≥5%**	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações exceto del(5q) isolada
SMD-SA com displasia multilinhagem	2 ou 3	1-3	≥15%/≥5%**	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações exceto del(5q) isolada
SMD com del(5q) isolada	1-3	1-2	Ausente/poucos	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	del(5q) isolada ou com uma alteração adicional, exceto -7 ou del(7q)
SMD com excesso de blastos (SMD-EB)					
SMD-EB-1	0-3	1-3	Ausente/poucos	MO 5-9% ou SP 2- 4%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações
SMD-EB-2	0-3	1-3	Ausente/poucos	MO 10-19% ou SP 5-19% ou presença de bastonetes de Auer	Quaisquer alterações
SMD não classificada					
com 1% blastos SP	1-3	1-3	Ausente/poucos	MO <5%, SP=1%***, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações
com displasia unilinhagem e pancitopenia	1	3	Ausente/poucos	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	Quaisquer alterações
baseada em alterações citogenéticas definidoras	0	1-3	< 15%****	MO <5%, SP <1%, sem bastonetes de Auer	SMD- anormalidades definidoras
Citopenia Refratária da Infância	1-3	1-3	Ausente	MO <5%, SP <2%	Quaisquer alterações

* Citopenias são definidas como: hemoglobina <10 g/dL, contagem absoluta de neutrófilos <1.8 x 10⁹/L e contagem plaquetária <100 x 10⁹/L. Raramente, SMD pode apresentar anemia ou plaquetopenia acima desses valores. Contagem de monócitos em SP deve ser <1 x 10⁹/L.

** Se a mutação no gene *SF3B1* estiver presente.

*** 1% de blastos no SP deve ser avaliado em duas ocasiões diferentes.

**** Casos com ≥15% de sideroblastos em anel por definição possuem displasia eritróide significativa e são classificados como SMD-SA com displasia unilinhagem.

A nomenclatura supracitada foi revisada recentemente (OMS, 2016). Uma das principais alterações nas definições é a retirada do termo anemia refratária da classificação. Alguns pacientes podem apresentar citopenias em sangue periférico que não correspondem à linhagem hematopoiética displásica na medula óssea. Outro dado adicional nesta nova classificação é a incorporação de informações oriundas da biologia molecular como critério diagnóstico para SMD com sideroblastos em anel. A mutação no gene *SF3B1* foi incluída como critério diagnóstico de SMD-SA independente da baixa contagem de sideroblastos em anel na medula óssea. A classificação anterior (OMS, 2008) classificava SMD em: citopenias refratárias com displasia unilinhagem (RCUD), anemia refratária com sideroblastos em anel (RARS), citopenias refratárias com displasia multilinhagem (RCMD), anemia refratária com excesso de blastos 1 (RAEB-1), anemia refratária com excesso de blastos 2 (RAEB-2), síndrome mielodisplásica não classificável (MDS-U) e síndrome mielodisplásica com del(5q) isolada (SWERDLOW et al., 2008). A figura 1 mostra as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de progressão para LMA nos diferentes subtipos de SMD (CAZZOLA et al., 2013).

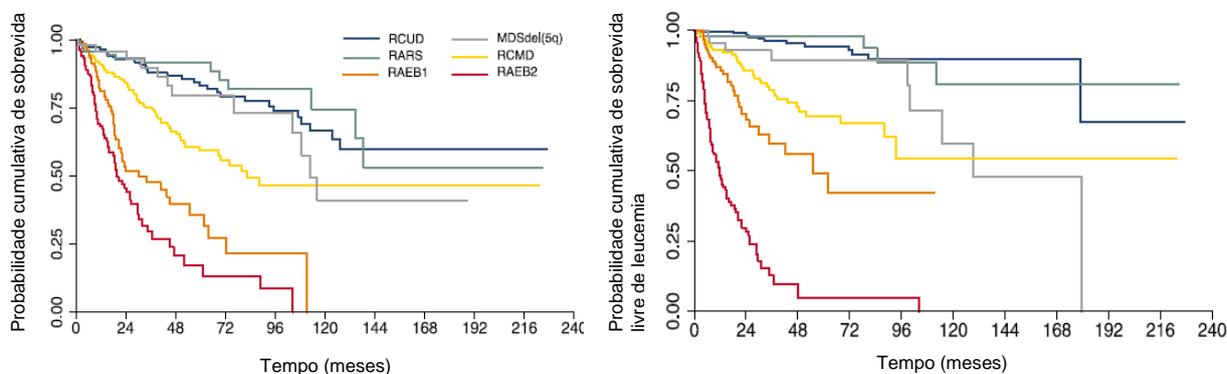


Figura 1. Sobrevida Global e sobrevida livre de leucemia em 1110 pacientes diagnosticados com SMD no Departamento de Onco-Hematologia, Fundação IRCCS, Policlínica San Matteo, Pavia, Itália, entre 1990 e 2012. (Adaptado de CAZZOLA et al., 2013).

A mielodisplasia (alterações displásicas na linhagem mielóide) pode ocorrer em outras neoplasias mielóides como Leucemia Mielomonocítica Crônica e em outras patologias não hematológicas como por exemplo, doenças reumatológicas. Uma demonstração disto é a presença de alterações displásicas na medula óssea de um paciente com Lúpus Eritematoso Sistêmico em atividade de doença. O que conceitualmente define SMD é a presença de displasia em mais de 10% das séries eritrocitária, granulocítica e/ou megacariocítica na medula óssea (Figura 2), a

documentação de sua natureza clonal demonstrada por citogenética e/ou biologia molecular e a presença de citopenia(s) em sangue periférico.

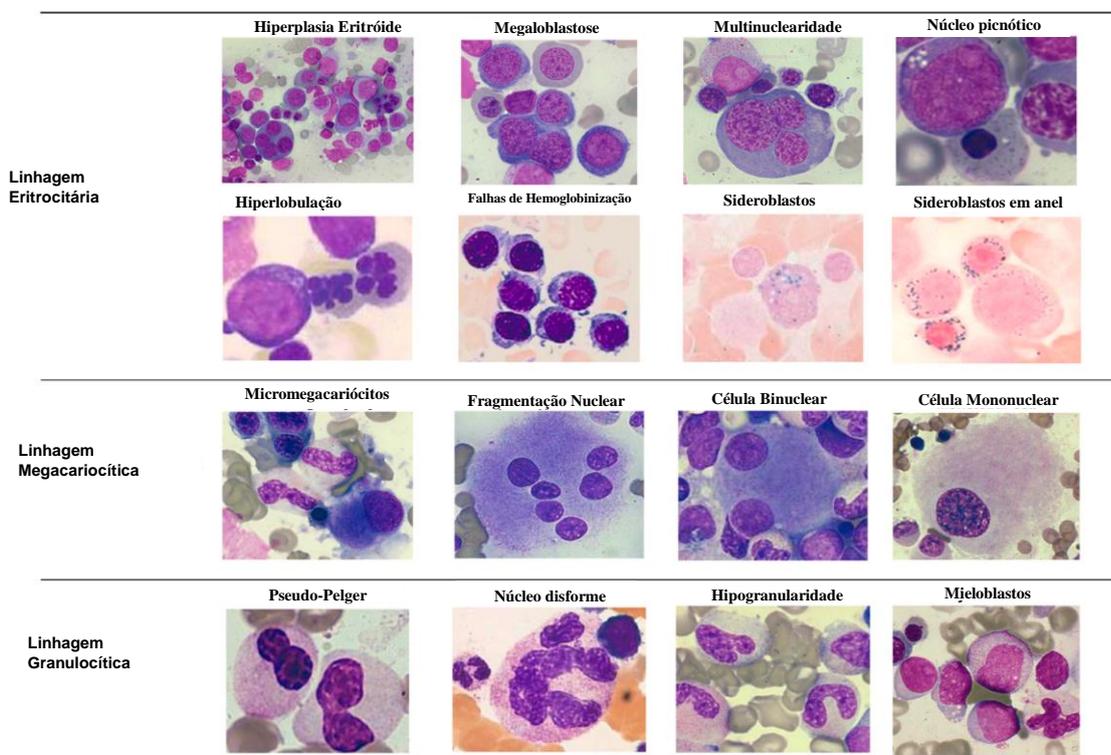


Figura 2. Exemplos de alterações morfológicas de mielodisplasia em aspirado de medula óssea. (Adaptado de CAZZOLA et al., 2013).

1.1.2 Patogênese

A fisiopatologia da SMD inclui várias etapas ou mecanismos: capacidade de autorrenovação da célula tronco hematopoiética, aumento da capacidade de proliferação do clone mutado relacionado à doença, bloqueio na diferenciação celular na medula óssea, instabilidade genética e epigenética, mecanismos anti-apoptóticos, evasão do sistema imune e supressão da hematopoese normal (BEJAR et al., 2011).

A expansão clonal é capaz de gerar células com capacidades evolutivas e de sobrevivência que as transformam no clone dominante na medula óssea. Essas mutações iniciais geralmente envolvem mutações em genes da maquinaria de *splicing* e metilação de DNA. Ao longo do tempo e do desenvolvimento celular, ocorrem novas mutações (genes relacionados a fatores de transcrição e vias de sinalização) e a formação de subclones com mutações adicionais, constituindo um conjunto de células-tronco hematopoiéticas com alterações que podem exemplificar o conceito de

intraclonalidade tumoral e o desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos da Síndrome Mielodisplásica e sua transformação para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) MALCOVATI et al., 2013; WALTER et al., 2013. BEJAR et al., 2013 elegantemente esquematiza a expansão clonal na SMD (Figura 3).

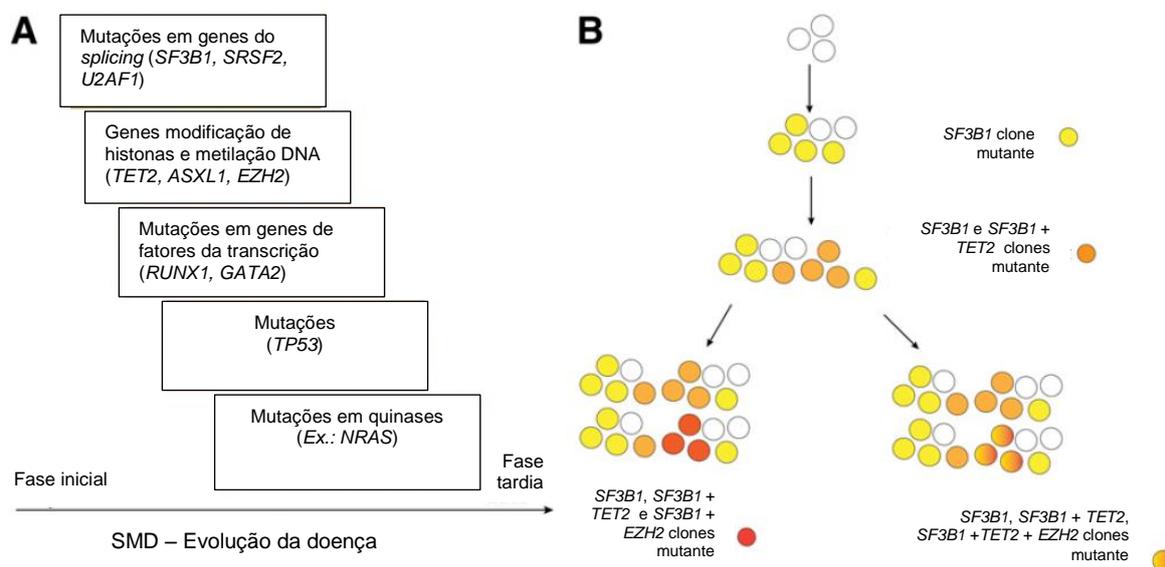


Figura 3. Aquisição temporal de mutações em SMD baseado em dados de Papaemmanuil et al. (A) Análise de variações alélicas em 111 genes sequenciados em 738 pacientes com SMD e neoplasias mielóides relacionadas produzem um padrão comum de aquisição de mutações na história natural da SMD. Baseado neste trabalho, parece que mutações nos genes que codificam componentes do spliceossomo ocorrem precocemente na patogênese da SMD e mutações epigenéticas e na regulação da transcrição ocorrem posteriormente. Mutações nas vias de sinalização e ativação de citocinas parecem ocorrer mais tardiamente na SMD. (B) Os autores identificaram que cerca de metade dos pacientes com SMD possuem > 2 genes mutados simultaneamente. Nestes indivíduos, 1/3 possuem múltiplos subclones e uma tentativa de construir uma hierarquia clonal com 1 indivíduo com as mutações *TET2*, *SF3B1*, e *EZH2* foi mostrado. (Adaptado de BEJAR et al., 2013).

A formação do RNA mensageiro envolve o processo de *splicing*, que consiste na retirada dos exons e união dos destes no pré-RNA mensageiro. Os spliceossomos são complexos protéicos responsáveis pela remoção dos exons e, conseqüentemente, são peças fundamentais na produção de RNA mensageiro (CONNIE et al., 2013). Doenças associadas a alterações no mecanismo de *splicing* são conseqüências de mutações em genes que codificam as proteínas formadoras do complexo supracitado (SINGH et al., 2012). Mutações nos genes *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2* e *U2AF1* são frequentes em pacientes com neoplasias mielóides, em destaque SMD (Figura 4).

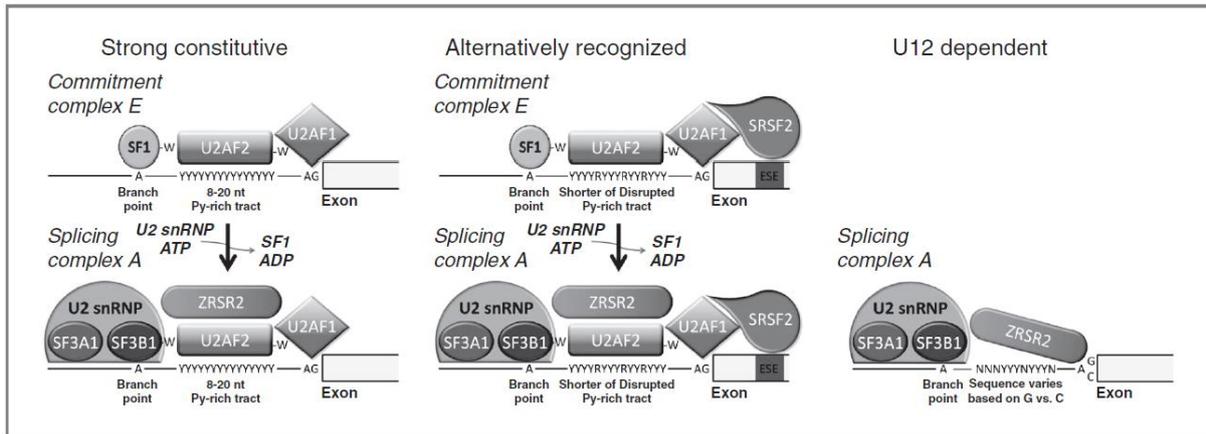


Figura 4. Mutações em genes que codificam o complexo protéico do spliceossomo associadas ao sítio de reconhecimento inicial 3'. Mutações somáticas foram identificadas em todos os principais genes envolvidos no sítio de reconhecimento inicial 3'. Isto inclui SF1, U2AF2 a U2AF1 que são importantes na formação do complexo E no U2 *splicing* dependente, assim como, SF3A1, SF3B1 e ZRSR2 são proteínas essenciais para a estabilização com complexo spliceossomo. (Adaptado de LARSSON et al., 2013).

A regulação da expressão gênica por meio de alterações epigenéticas é fundamental para o desenvolvimento e diferenciação celular. Alterações de metilação do DNA e das histonas modificam a conformação da cromatina e alteram a expressão gênica, sem mudanças na sequência genômica. Em neoplasias mielóides como a SMD, a metilação aberrante do DNA e alterações nas histonas modificam a expressão gênica nestes pacientes, o que resulta em silenciamento de genes supressores tumorais e/ou ativação de oncogenes (CONNIE et al., 2013). Alterações de metilação de DNA já são alvos atuais de tratamento desta doença, com a classe de medicamentos denominadas hipometilantes, como azacitidina e decitabina (MALCOVATI et al., 2013) Figura 5.

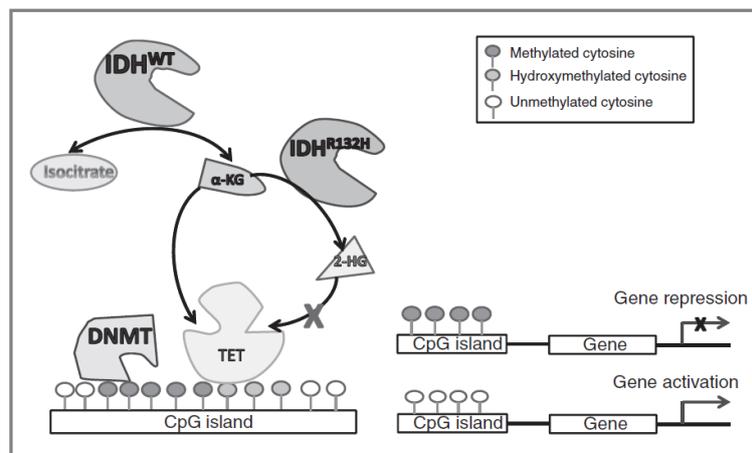


Figura 5. Papel das proteínas codificadas por genes mutados na SMD e LMA na metilação do DNA. DNMTs (DNA metiltransferase) catalisa a adição do radical metil a citosina. Enzimas IDH são responsáveis por catalisar a reação reversível de isocitrato em α -KG e CO_2 em uma reação em duas etapas. α -KG é necessário pela proteína TET para oxidação de 5-mC em 5-hmC, um intermediário da metilação do DNA. Proteínas IDH mutantes metabolizam α -KG em 2-HG, um oncometabólito que inibe a atividade enzimática de TET. (Adaptado de LARSSON et al., 2013).

1.1.3. Epidemiologia

A síndrome Mielodisplásica ocorre mais comumente na população idosa, média de idade de 70 anos e leve predominância no sexo masculino. Na Europa, estima-se que a incidência de SMD na população geral, seja de 5 casos/100.000 pessoas-ano. Na população com mais de 60 anos, essa incidência aumenta para 20 a 50 casos/100.000 pessoas-ano (MALCOVATI et al., 2013). A prevalência nos Estados Unidos da América (EUA) é de 3-4 pessoas/10⁷. Este número aumenta para 7-35 pessoas/10⁶ na população com idade maior que 60 anos. Aproximadamente 10.000 novos casos são diagnosticados nos EUA de acordo com dados do *SEER* (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) e *NAACCR* (*North American Association of Central Cancer Registries*) (HOWLADER et al., 2017; ROLLISON et al., 2008). Contudo, dados provenientes de registros clínicos no país estimam incidência anual de 45.000 novos casos em pessoas com mais de 65 anos. Esses dados corroboram a preocupação das entidades médicas e hematologistas com o tema diante da grande possibilidade de SMD se tornar um desafio em saúde pública com o atual perfil demográfico de envelhecimento da população mundial, inclusive em países em desenvolvimento como o Brasil.

Belli et al., 2015 realizaram um estudo multinacional com avaliação de 1080 pacientes com diagnóstico de SMD no Brasil, Chile e Argentina. O perfil etário de prevalência nestas populações é mostrado na Figura 6 (BELLI et al., 2015).

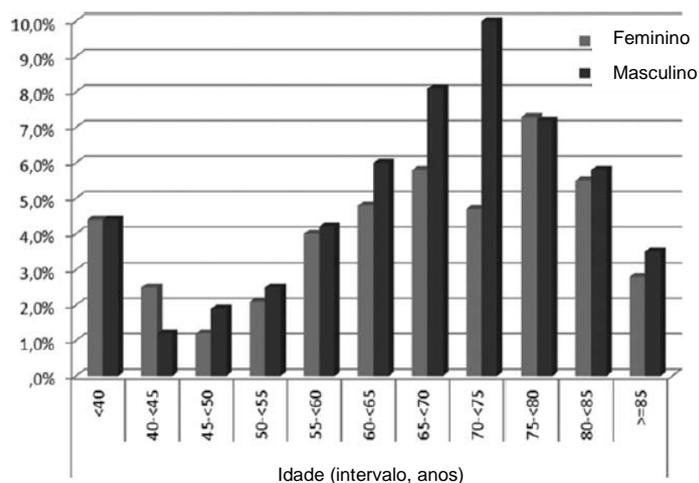


Figura 6. Distribuição de pacientes com SMD em um estudo populacional Sul-americano de acordo com a idade e gênero (Adaptado BELLI et al., 2015).

1.1.4 Manifestações Clínicas

Os principais sinais e sintomas de SMD estão relacionados ao tipo de citopenia em sangue periférico que a patologia causa em determinado paciente. A maioria dos pacientes são anêmicos, enquanto neutropenia e plaquetopenia são menos comuns. Os sintomas relacionados à anemia, como fadiga e sonolência; infecções de repetição associados à leucopenia (neutropenia) e sangramentos leves a graves diante de plaquetopenia ocorrem em graus variáveis (MALCOVATI et al., 2013). Aproximadamente 1/3 dos pacientes são dependentes transfusionais de concentrado de hemácias ao diagnóstico, organomegalias raramente são observadas (SWERDLOW et al, 2016).

Ressalta-se que esta doença tem um espectro de apresentação clínica muito variável, desde pacientes com citopenias leves e assintomáticos, até pacientes com grande necessidade transfusional. Diante desta ampla variação de sintomas, torna-se imperativo a existência de índice prognóstico que consiga melhor estratificar esta população e adequar terapêutica.

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de SMD exige bastante cautela do médico hematologista visto que muitas doenças de natureza não hematológica podem causar citopenias em sangue periférico e displasias na medula óssea. Frequentemente é muito difícil identificar a causa da displasia em pacientes com múltiplas comorbidades e usuários de várias medicações, perfil da maioria dos pacientes com SMD.

A avaliação da história clínica e exame físico são extremamente importantes para o diagnóstico de SMD. São exemplos de dados importantes na anamnese: duração dos sintomas, histórico de doenças hematológicas, histórico de exposição ocupacional, medicações de uso de rotina, comorbidades e histórico familiar. Ao exame físico, achados como palidez, petéquias e sinais clínicos de infecção são dados que podem sugerir anemia, plaquetopenia e neutropenia, respectivamente (HOFFMAN, et al., 2013).

Exames laboratoriais com o objetivo de descartar as principais causas de citopenias devem ser realizados. Dosagem sérica de ferro, vitamina B12, ácido fólico, zinco e cobre devem ser documentadas para o diagnóstico de SMD. Deficiências

vitamínicas são umas das principais causas de citopenias, principalmente carência de ferro e anemia em mulheres jovens com alteração do fluxo menstrual. Outras causas importantes de anemias são a presença de comorbidades como doença renal crônica e doenças autoimunes como Artrite Reumatóide, que configuram causas de anemia de doença crônica. O perfil hormonal tireoidiano, dosagem de TSH e T4 livre devem ser coletados visto que hipertireoidismo ou hipotireoidismo estão relacionados à anemia. Para finalizar a exclusão de diagnósticos diferenciais é necessária a coleta de sorologias para HIV, HTLV, HBV, HCV, CMV e EBV. Hepatite C é causa comum de anemia e plaquetopenia e deverá ser excluída para o diagnóstico de SMD. A análise da morfologia do sangue periférico é fundamental para avaliação de displasias nas séries eritrocitária e granulocítica (MALCOVATI et al., 2013).

O estudo medular com coleta de aspirado de medula óssea para mielograma e coleta de cariótipo são essenciais para o diagnóstico de SMD. Estudo imunofenotípico por citometria de fluxo e estudo de biologia molecular são complementares no auxílio diagnóstico. A biópsia de medula óssea e imuno-histoquímica são importantes para definição de celularidade, graus de fibrose medular, agregados de células imaturas e melhor avaliação de displasia na série megacariocítica. (DELLA PORTA, et al., 2015; HOFFMAN, et al., 2013).

1.1.6 Prognóstico

Diante da expressão clínica bastante heterogênea, modelos prognósticos foram desenvolvidos e revisados ao longo dos anos, com o objetivo de estratificar os pacientes de acordo com risco de evolução para Leucemia Mielóide Aguda e, conseqüentemente, guiar a terapêutica adaptada ao risco. Terapia esta que, compreende grande espectro, desde apenas observação clínica (*watching and waiting*) até suporte transfusional, quelação de ferro em casos selecionados, tratamento quimioterápico até transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico (MALCOVATI et al., 2013).

O modelo prognóstico atual é o *IPSS-R (Revised international prognostic scoring system)*, que considera as variáveis: citogenética, porcentagem de blastos na medula óssea, níveis de hemoglobina, neutrófilos e plaquetas para estratificar o risco do paciente em muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto. Sobrevida média em anos (intervalo): 8,8 (7,8-9,9); 5,3 (5,1-5,7); 3,0 (2,7-3,3); 1,6 (1,5-1,7) e 0,8 (0,7-

0,8) em ordem crescente para as categorias de risco supracitadas (GREENBERG et al., 2012) Tabela 2 e Figura 7.

Tabela 2. IPSS-R. (Adaptado GREENBERG et al., 2012).

Variável	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Prognóstica							
Citogenética	Muito Bom	---	Bom	---	Intermediário	Pobre	Muito Pobre
Blastos (%) MO	≤ 2	---	> 2%- < 5%	---	5%-10%	> 10%	---
Hemoglobina	≥ 10	---	8- < 10	< 8	---	---	---
Plaquetas	≥ 100	50-< 100	< 50	---	---	---	---
Neutrófilos	≥ 0,8	< 0,8	---	---	---	---	---

Subgrupos prognósticos	Anormalidades Citogenéticas	Sobrevida (anos)	Progressão para LMA (anos)	OS/LMA
Muito Bom	-Y, del(11q)	5,4	NR	0,7/0,4
Bom	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duas alterações incluindo del(5q)	4,8	9,4	1/1
Intermediário	del(7q), +8, +19, i(17q), quaisquer alterações	2,7	2,5	1,6/2,2
Pobre	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duas alterações incluindo -7/del(7q), complexo: 3 anormalidades	1,5	1,7	2,3/2,3
Muito Pobre	Complexo: > 3 anormalidades	0,7	0,7	3,8/3,6

Categoria de Risco	Escore	Sobrevida (anos)
Muito Baixo	≤ 1,5	8,8 (7,8 - 9,9)
Baixo	> 1,5 - 3	5,3 (5,1 - 5,7)
Intermediário	> 3 - 4,5	3,0 (2,7 - 3,3)
Alto	> 4,5 - 6	1,6 (1,5 - 1,7)
Muito Alto	> 6	0,8 (0,7 - 0,8)

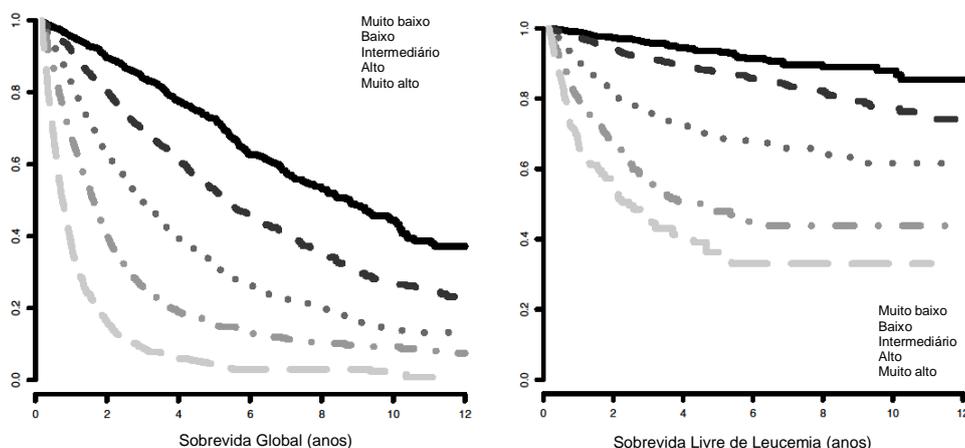


Figura 7. Sobrevida Global e sobrevida livre de leucemia baseado no IPSS-R. (Adaptado GREENBERG et al., 2012).

1.1.7 Citogenética e Biologia Molecular

A documentação de sua natureza clonal é parte fundamental para o diagnóstico de SMD e para tanto, o exame de citogenética (cariótipo banda G) consegue detectar alterações cromossômicas em cerca de 50% dos pacientes com SMD. Bejar et al., 2011 documentou que 52% dos pacientes com SMD e cariótipo normal possuíam pelo menos uma mutação genética comprovando clonalidade (BEJAR et al., 2011). Em outro trabalho, Papaemmanuil e colaboradores (2013), esta porcentagem aumenta para 74% dos pacientes com diagnóstico de SMD com cariótipo normal, contudo com mutações detectadas por diversas técnicas de sequenciamento genômico (Figura 8). Esses dados mostram a importância da biologia molecular na complementação diagnóstica de SMD (PAPAEMMANUIL et al., 2013).

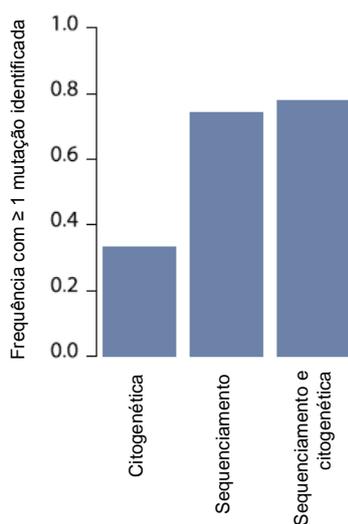


Figura 8. Fração de pacientes com diagnóstico de SMD e identificação de pelo menos 1 mutação detectada por citogenética, sequenciamento e combinação das duas técnicas. (Adaptado PAPAEMMANUIL et al., 2013).

Além da importância para o diagnóstico de SMD, estudos recentes têm demonstrado que mutações em determinados genes conferem risco prognóstico independente do *IPSS-R*, ressaltando a importância clínica do estudo de tais mutações (CAZZOLA et al., 2013). Mutações nos genes *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *U2AF1* e *IDH1/2*, entre outras, foram descritas com ocorrência variada e prevalência de mais de 10 a 30% a depender do estudo analisado (CAZZOLA et al., 2013; DELHOMMEAU et al., 2009; LANGEMEIJER et al., 2009; PAPAEMMANUIL et al., 2011; YOSHIDA et al., 2011) Figura 9.

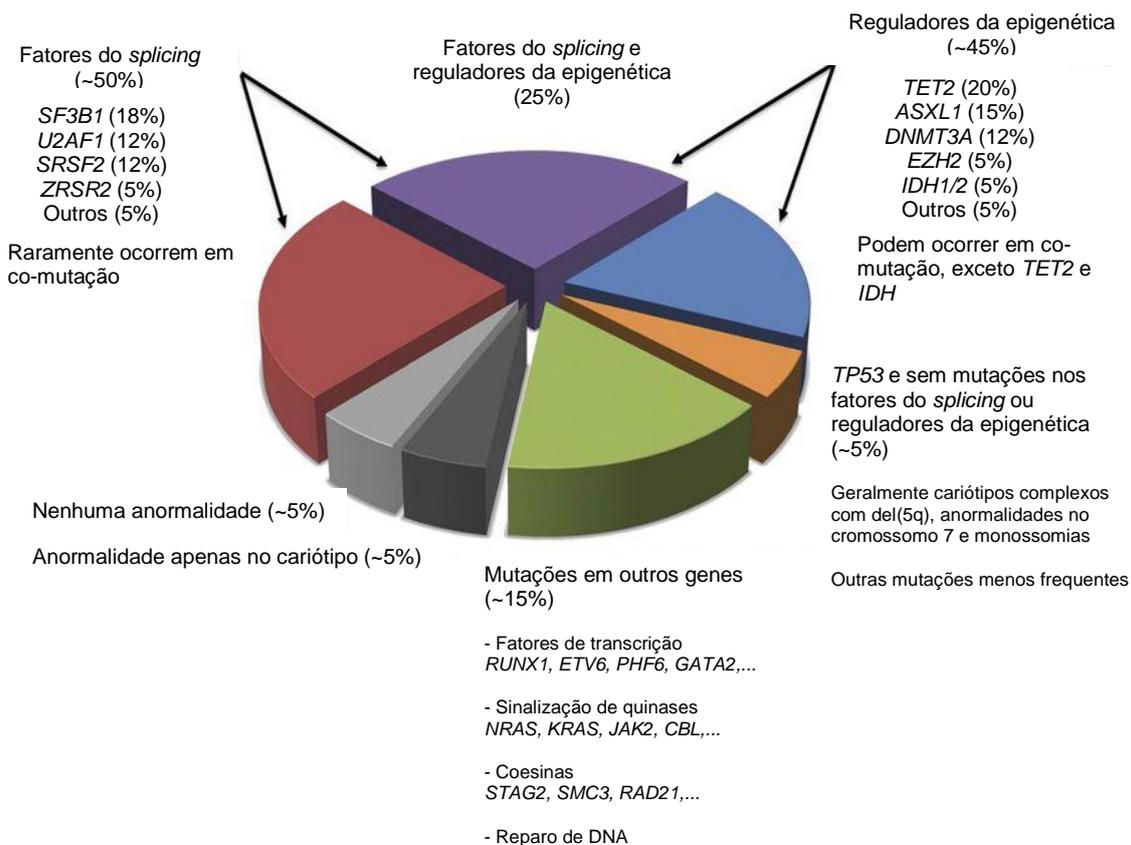


Figura 9. Distribuição de mutações recorrentes e anormalidades citogenéticas em SMD. 50% das células clonais na SMD possuem mutações nos genes que codificam proteínas do spliceossomo (SF) e um número similar possuem mutações em genes reguladores da epigenética (ER). Aproximadamente 25% dos pacientes apresentam mutações nos genes de ambos os grupos. Pacientes com mutações no *TP53* apresentam poucas associações com outras mutações, contudo apresentam altas taxas de anormalidades cromossômicas, incluindo cariótipo complexo frequentemente. Muitos outros genes podem estar co-mutados com SF e ER, mas também podem ocorrer na ausência de mutações SF e ER em 15% dos pacientes. Apenas cerca de 10% dos pacientes não apresentam mutações nos genes mais frequentes. (Adaptado de BEJAR et al., 2014).

O conhecimento sobre as bases moleculares da SMD aumentou bastante nos últimos dez anos, principalmente devido à utilização do sequenciamento genômico em larga escala. O primeiro grande achado na área foi a identificação de mutação somática no gene *TET2* (DELHOMMEAU et al., 2009). Desde então, novos trabalhos com pesquisa de mutações por plataformas de alta resolução (*Next-Generation sequencing*), espectrofotometria em massa e análise de exoma aumentaram a identificação de mutações em diversos genes (CAZZOLA et al., 2013).

1.1.8 Mutações em Genes Reguladores do *Splicing*

Mutações em genes que codificam proteínas do mecanismo de *splicing* ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica. Essas mutações são em sua maioria mutuamente exclusivas e são eventos iniciais na patogênese da SMD. O alelo mutante corresponde a 40 a 50% dos genes na medula óssea sugerindo ser o clone dominante nesta patologia. Os principais genes mutados são *SF3B1*, *SRSF2* e *U2AF1*, e os tipos de mutações descritas são, em sua maioria, *missense*. Diferentes mutações em genes envolvidos no *splicing* são associadas com diferentes fenótipos, evolução clínica e prognóstico como descrito na Tabela 3 (CAZZOLA et al., 2013).

Mutações no gene *SF3B1* ocorrem com uma frequência de 15 a 30% na SMD. Mutações neste gene estão relacionadas com a presença de sideroblastos em anel na medula óssea e com o subtipo de SMD: SMD com sideroblastos em anel, OMS, 2016 (ARBER et al., 2016). O gene *SF3B1* mutado está associado a bom prognóstico, altas taxas de sobrevida global e baixo risco de progressão para leucemia mieloide aguda (CAZZOLA et al., 2013; MALCOVATI et al., 2011; PAPAEMMANUIL et al., 2011). Esta mutação também está presente na entidade descrita pela OMS (ARBER et al., 2016): Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa com Sideroblastos em Anel e Trombocitose, o que sugere um fenótipo específico relacionado com esta mutação.

Mutações nos genes *SRSF2* e *U2AF1* estão presentes em pacientes com SMD em cerca de 20% e 10%, respectivamente. Ambos estão relacionados com baixa sobrevida global e alto risco de transformação para LMA. Mutações no *SRSF2* são mais comuns em pacientes com SMD com displasia multilinhagem e SMD com excesso de blastos. Este gene também se encontra mutado em aproximadamente 40 a 50% dos pacientes com Leucemia Mielomonocítica Crônica - LMMC (ITZYKSON et al., 2013) e na entidade classificada pela OMS (SWERDLOW et al., 2008; ARBER et al., 2016) como Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa não classificada (SMD/SMP). Frequentemente encontra-se mutado juntamente com *TET2* na LMMC (CAZZOLA et al., 2013). Mutações no gene *U2AF1* são encontradas em vários subtipos de SMD e estão relacionadas com alto risco de progressão para LMA, baixa sobrevida global e evolução clínica desfavorável após transplante de células

tronco hematopoiéticas (TCTH) (DAMM et al., 2012; MAKISHIMA et al., 2009; MAKISHIMA et al., 2012; THOL et al., 2012).

1.1.9 Mutações em Genes Reguladores da Epigenética

Síndrome Mielodisplásica é uma doença clonal caracterizada por aumento da proliferação da célula tronco hematopoiética e alteração da diferenciação desta célula o que resulta alta taxa de apoptose e sintomas relacionados às citopenias em sangue periférico. Diferenciação celular é um processo epigenético baseado em metilação de DNA e modificações das histonas. A diferenciação celular aberrante encontrada na SMD pode ser oriunda da metilação anormal do DNA através de mutações nos genes *TET2*, *DNMT3A* (genes envolvidos na metilação de DNA) assim como, mutações em genes relacionados às alterações na cromatina como *EZH2* e *ASXL1*. A natureza epigenética da SMD consegue explicar em parte a resposta ao tratamento com medicamentos hipometilantes (azacitidina e decitabina) utilizados para o tratamento destes pacientes (ISSA et al., 2013).

Mutações no gene *TET2* ocorrem com frequência 20 a 30% em todos os subtipos de SMD, sem identificação de impacto na sobrevida dos pacientes até o momento. Apesar disso, mutações neste gene parecem prever a resposta ao tratamento com agentes hipometilantes (ITZYKSON et al., 2013; BEJAR et al., 2013). Polimorfismos no *TET2* também estão presentes em outras neoplasias mieloides: LMMC (30 a 50%) e LMAs (25%) (DELHOMMEAU et al., 2009; KOSMIDER et al., 2009; LANGEMEIJER et al., 2009; MULLIGHAN et al., 2009). A presença de mutações no *TET2* em doenças mieloproliferativas como a LMMC, sugere que estas alterações genéticas podem ser uma etapa comum na fisiopatogênese das neoplasias mieloides (BEJAR et al., 2011). Mutações no gene *TET2* são frequentemente encontradas em pacientes com cariótipo normal o que, conseqüentemente, representa um marcador útil de clonalidade nestes casos (BEJAR et al., 2011). Estudos recentes não mostram relação do prognóstico dos pacientes com SMD com *TET2* mutado, contudo em LMA e LMMC, esta mutação está associado a uma evolução clínica desfavorável (SMITH et al., 2010).

Mutações nos genes *IDH1/2* estão presentes em 4 a 11% dos pacientes com SMD (THOL et al., 2010). Esta frequência é maior nos pacientes com diagnóstico de LMA e sua ocorrência concomitante com mutações no gene *NPM1* confere bom

prognóstico (PATEL et al., 2012). Em contraste, para os portadores de SMD, mutações no *IDH1* sugerem pior prognóstico e maior risco de progressão para LMA (PATNAIK et al., 2012).

1.1.10 Mutações em Genes de Reparo de DNA

Mutações em genes relacionados a mecanismos de reparo de DNA já foram identificados em inúmeros tipos de cânceres, incluindo neoplasias mieloides e, entre elas, a SMD. As vias de reparo de DNA são importantes para a remoção de bases de DNA danificadas e consequente manutenção da integridade do genoma. Os principais tipos de reparo de DNA são: reparo de excisão de bases (BER), reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e reparo de quebra de cadeia dupla (DSB). Mutações são eventos iniciais na carcinogênese e alterações nas vias de reparo podem ser fatores de risco para várias neoplasias malignas (RONEN et al., 2001; VODICKA et al., 2007; ZHOU et al., 2015; JANKOWSKA et al., 2008).

TP53 é um gene supressor tumoral frequentemente mutado em neoplasias sólidas (~50%) e conhecido como preditor de mau prognóstico. Em condições de estresse genômico, a proteína p53 é fosforilada e promove pausa no ciclo celular para o reparo do DNA, prevenindo assim, o acúmulo de mutações potencialmente oncogênicas. Mutações *missense* em *TP53* promovem propriedades oncogênicas que contribuem para a patogênese tumoral (BIEGING et al., 2014; RIVLIN et al., 2011; WANG et al., 2017). A frequência de mutações no *TP53* em síndrome mielodisplásica é de aproximadamente 5 a 8% e estão associadas com cariótipos complexos, aberrações no cromossomo 5 e prognóstico reservado (KULASEKARARAJ et al., 2013; SALLMAN et al., 2016; GOEL et al., 2016; OK et al., 2015).

O gene *OGG1* codifica uma proteína que possui papel fundamental no reparo de DNA por meio do mecanismo de excisão de bases (BER). Polimorfismos neste gene já foram descritos em diversos trabalhos associados com tumores sólidos, como câncer de mama e câncer colorretal. Defeitos no reparo do DNA constituem uma hipótese para um dos mecanismos fisiopatológicos da SMD e outras neoplasias mieloides, conforme descrito em estudos que demonstram uma provável relação entre mutações em genes de reparo de DNA e o diagnóstico de SMD e sua evolução para LMA (BOITEUX et al., 2000; KOHNO et al., 1998; WEISS et al., 2005).

O gene *XRCC1* está envolvido no reparo de DNA por meio da via de reparo de cadeia dupla (DSB). Polimorfismos no gene *XRCC1* já foram descritos em vários tipos de cânceres e em neoplasias mieloides (AKTUĞLU et al., 2014; BSNESECU et al., 2014; EL-DIN et al., 2012; JOSEPH et al., 2005). Joshi et al., 2015 analisaram a prevalência de mutações neste gene em SMD e observaram uma relação entre a presença de mutações no gene *XRCC1* e formas avançadas de SMD (SMD com excesso de blastos I, OMS 2016), corroborando a utilização destes polimorfismos como possíveis marcadores prognósticos nesta doença (JOSHI et al., 2015).

Outro gene envolvido no reparo do DNA é o *APEX1* por via da excisão de bases (BER). Mutações no mesmo já foram relatadas em neoplasias do trato biliar e colorretal (KIM MH et al., 2013). Recentemente, Aktuglu e colaboradores descreveram polimorfismos neste gene em pacientes com SMD na Turquia (AKTUĞLU et al., 2014).

Tabela 3. Mutações mais comuns em SMD e SMD/SMP. (Adaptado de CAZZOLA et al., 2013).

Via Biológica e Gene	Frequência (%)*	Tempo de aquisição da mutação**	Relação entre o gene mutado e fenótipo clínico	Relevância prognóstica do gene mutado
RNA splicing				
<i>SF3B1</i>	15-30%	Mutação Inicial	Associada a presença de sideroblastos em anel (SMD SA, SMD SA e trombocitose)	Associada com elevada sobrevida global e baixo risco de progressão para leucemia
<i>SRSF2</i>	10-20%	Mutação Inicial	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos, co-mutada com <i>TET2</i> na LMMC	Associada com baixa sobrevida global e alto risco de progressão para leucemia
<i>U2AF1</i>	<10%	Mutação Inicial	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos	Associada com alto risco de progressão para leucemia
<i>ZRSR2</i>	<10%	Mutação Inicial	Não definido	Não definido
Metilação de DNA				
<i>TET2</i>	20-30%	Mutação Inicial	Encontrada em todos os subtipos de SMD, frequência elevada (50-60%) em LMMC	Sem impacto na sobrevida global, pode predizer resposta aos agentes hipometilantes
<i>DNMT3A</i>	~10%	Mutação Inicial	Encontrada em todos os subtipos de SMD, co-mutada com <i>SF3B1</i> na SMD com sideroblastos em anel	Associada a evolução clínica desfavorável. Efeito no prognóstico desfavorável é reduzido quando co-mutada com <i>SF3B1</i> em SMD com sideroblastos em anel
<i>IDH1/2</i>	~5%	Mutação Inicial	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos	Associada a evolução clínica desfavorável
Modificação de Cromatina				
<i>ASXL1</i>	15-20%	Mutação subclonal	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos, frequência elevada (40%) em LMMC	Associada a evolução clínica desfavorável em todas as neoplasias mielóides (SMD, SMD/SMP, SMP)
<i>EZH2</i>	~5%	Mutação subclonal	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos	Associada a evolução clínica desfavorável em todas as neoplasias mielóides
Transcrição				
<i>RUNX1</i>	~10%	Mutação subclonal	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos	Associada a evolução clínica desfavorável
<i>BCOR</i>	<5%	Mutação subclonal	Associada com SMD com displasia multilineagem e SMD com excesso de blastos	Associada a evolução clínica desfavorável
Reparo DNA				
<i>TP53</i>	~5%	Mutação subclonal	Associada com doença avançada e cariótipo complexo, mutado em 20% dos pacientes com SMD del(5q)	Associada com baixa sobrevida global e alto risco de progressão para leucemia, prediz baixa resposta a lenalidomida quando em SMD del(5q)

* Proporção aproximada de pacientes com SMD e mutações somáticas em estudos publicados até o presente momento.

** Baseado na frequência de alelos mutados.

1.1.11 Tratamento

O tratamento de SMD é um desafio para os hematologistas visto que a maioria dos pacientes são idosos e com múltiplas co-morbidades que interferem na escolha da terapia adequada. Como esta doença tem um espectro de apresentação clínica

muito amplo, o tratamento atualmente é direcionado de acordo com os grupos de risco classificados pelo *IPSS* (GREENBERG et al., 1997).

Pacientes classificados como baixo risco e assintomáticos podem ser seguidos e apenas observados, sem tratamento específico. Os pacientes com citopenias sintomáticas podem ser tratados com fatores de crescimento como eritropoetina e fatores de crescimentos de granulócitos. Pacientes com del(5q) apresentam boa resposta a lenalidomida e, por outro lado, aqueles com medula óssea hipocelular podem apresentar resposta com terapias imunossupressoras como timoglobulina e ciclosporina (MALCOVATI et al., 2013).

Pacientes classificados como riscos intermediários 1 e 2, sintomáticos e aptos para terapia com transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico deverão ser considerados para tal tratamento. O uso de hipometilantes (azacitidina ou decitabina) poderá ser considerado como terapia ponte antes do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Pacientes com citopenias assintomáticas no risco intermediário 1 podem ser permanecer sem terapia específica. Aqueles não aptos para TCTH (única terapia curativa na atualidade para SMD) serão encaminhados para terapia de suporte paliativo com suporte transfusional regular e quelação de ferro. Pacientes com *IPSS* alto risco deverão ser encaminhados para TCTH e terapia hipometilante como ponte para tal tratamento (MALCOVATI et al., 2013).

1.1.12 **Perspectivas Futuras**

A biologia molecular não exclui ou diminui a importância da análise morfológica e citogenética no diagnóstico desafiador de Síndrome Mielodisplásica, mas sim adiciona dados auxiliares para melhor estratificação dos pacientes e sua terapêutica. No futuro, provavelmente o escore de risco *IPSS-mol* (CAZZOLA et al., 2013) será uma ferramenta para aperfeiçoar a classificação de risco destes pacientes e otimizar seu tratamento. Mutações são alvo de estudo para terapias alvo em vários tipos de neoplasias e em SMD não seria diferente. O conhecimento das bases moleculares destas doenças contribuirá para o desenvolvimento de drogas alvo específicas, menos tóxicas e mais eficazes para o perfil de pacientes com SMD, em sua maioria idosos com múltiplas co-morbidades e sem performance status para terapia curativa com TCTH.

1.2 CITOPENIA IDIOPÁTICA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (*IDIOPATHIC CYTOPENIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE - ICUS*)

A denominação citopenia de significado indeterminado (*ICUS*) refere-se ao grupo de pacientes com uma ou mais citopenia detectada em análise de sangue periférico e sem critérios para diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica. Pacientes com *ICUS*, portanto não possuem displasia na medula óssea e não apresentam evidências de clonalidade. Conceitualmente, *ICUS* não possui alteração em análise citogenética ou mutações somáticas. (BAIN, 2006; MUFTI et al., 2007). Esta definição ainda não está presente na classificação da OMS 2016 (ARBER et al., 2016).

Os níveis de citopenia para diagnóstico de *ICUS* são hemoglobina menor que 11g/dL, contagem de neutrófilos menor que 1500/ μ L e plaquetas menor que 100 000/ μ L (MUFTI et al., 2007). A exclusão de causas comuns de citopenias deve ser realizada com presteza para confirmação de *ICUS*. A avaliação de carências polivitamínicas com dosagens de vitamina B12, ferro sérico e ácido fólico devem ser pesquisadas. Outras causas como toxicidade medicamentosa, infecções virais (HIV, hepatites B e C), doenças autoimunes, disfunções renais e hepáticas e hiperesplenismo são exemplos de diagnósticos diferenciais de citopenias e que deverão ser avaliados e excluídos para o diagnóstico final de citopenia de significado indeterminado (JAIN et al., 2017).

Pacientes com *ICUS* são geralmente mais jovens quando comparados aos pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD) e a(s) citopenia(s) são leves e não acarretam sintomas clínicos.

Até o presente momento não há dados em literatura que confirmem a evolução de *ICUS* para SMD ou outras neoplasias mielóides como Leucemia Mielóide Aguda (JAIN et al., 2017). Estudos prospectivos são necessários para o seguimento destes pacientes e análise de sua possível relação com evolução para SMD no futuro.

A grande utilização de ferramentas de biologia molecular com sequenciamento genético em larga escala na última década conseguiu detectar alterações somáticas em parte dos pacientes supracitados com diagnóstico prévio de *ICUS*. Como definição, *ICUS* não apresenta evidência de clonalidade, logo este grupo de pacientes foi classificado em uma nova categoria denominada Citopenia Clonal de Significado Indeterminado (*Clonal Cytopenia of undetermined significance - CCUS*), JAIN et al., 2017.

1.3 CITOPENIA CLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (*CLONAL CYTOPENIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE - CCUS*)

CCUS é o termo utilizado para denominar pacientes com citopenias idiopáticas com evidência de clonalidade e que não preenchem critérios da OMS para neoplasias hematológicas (Tabela 4). Os genes mutados são semelhantes àqueles encontrados em SMD, mas com frequências diferentes entre os genes. Os principais genes mutados são *TET2*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *ASXL1* e *TP53* (JAIN et al., 2017).

Tabela 4. Critérios diagnósticos – Citopenia Clonal de Significado Indeterminado. (Adaptado de KWOK et al., 2015).

Achados em Sangue Periférico	Achados em Medula Óssea	Alterações Genéticas
1 ou mais das seguintes: Hemoglobina < 11 g/dL	Nenhum dos seguintes: ≥ 10% de displasia nas séries eritrocitária, granulocítica ou plaquetária	1 ou mais das seguintes: Anormalidade cromossômica não relacionada a neoplasia hematológica
Neutrófilos < 1500/μL	≥ 5% de mieloblastos	Presença de mutação somática com frequência de variação alélica ≥ 2% em um gene relacionado a neoplasia hematológica no sangue periférico ou medula óssea
Plaquetas < 100 000/μL	Anormalidade cromossômica específica de SMD/LMA	
Critério adicional: nenhuma outra causa provável para as citopenias ou evidência de outras doenças hematológicas.		

KWOK et al., 2015 conduziram estudo prospectivo com pacientes com citopenias e suspeita de SMD, nos quais foram avaliados a frequência e o tipo de mutações presentes. Um grupo de 144 pacientes foram avaliados e após avaliação medular o grupo foi categorizado em pacientes com diagnóstico de SMD (17%), *ICUS* e alguma displasia (15%) e *ICUS* sem displasia (69%). Vinte e dois genes frequentemente mutados em SMD foram pesquisados com extração de DNA de sangue de medula óssea. Mutações somáticas foram detectadas em 71% dos pacientes com diagnóstico de SMD, 62% no grupo *ICUS* e alguma displasia e 20% no grupo *ICUS* sem displasia (Figura 10). No geral 35% dos casos com citopenias idiopáticas portavam mutações somáticas semelhantes ao perfil de mutações presentes sem SMD. *CCUS* foi mais comum que SMD e apresentou frequência de variância alélica e contagens hematimétricas comparáveis a SMD (KWOK et al., 2015).

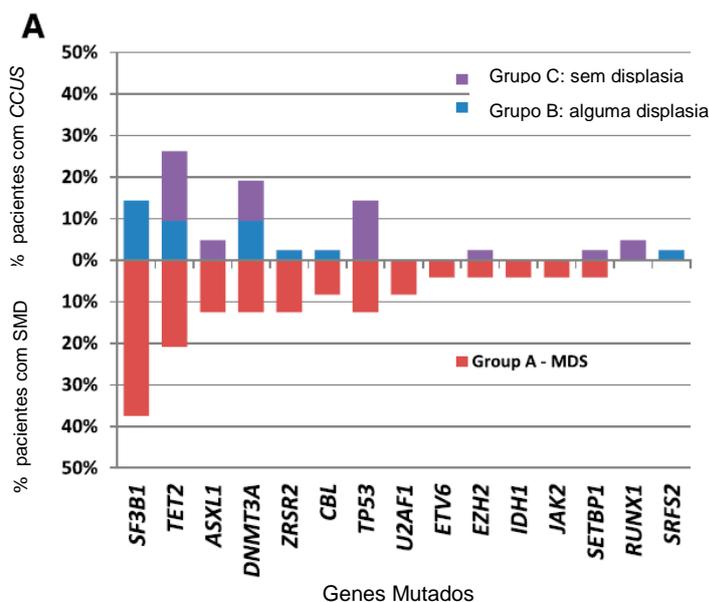


Figura 10. Frequência de mutações nos genes listados em coorte de pacientes com SMD e CCUS com presença ou não de displasia. (Adaptado de KWOK et al., 2015).

A história natural destes pacientes é desconhecida até o momento em consequência da falta de estudos prospectivos, mas acredita-se que haja um risco aumentado de evolução para SMD e outras neoplasias mielóides. Não há uma recomendação clara de seguimento destes pacientes. O acompanhamento dependerá dos graus das citopenias e sintomas relacionados às mesmas e também do tipo de mutações presentes. Recomenda-se avaliação trimestral ou mensal caso o paciente apresente mutação de alto risco ou citopenia grave (KWOK et al., 2015).

1.4 HEMATOPOESE CLONAL DE POTENCIAL INDETERMINADO (*CLONAL HEMATOPOIESIS OF INDETERMINATE POTENTIAL - CHIP*)

Hematopoese clonal de potencial indeterminado (*CHIP*) refere-se aos pacientes sem diagnóstico de neoplasias hematológicas ou outras doenças clonais, contudo possuem mutações somáticas em genes previamente descritas em neoplasias hematológicas. Estes pacientes são saudáveis e não apresentam citopenias em sangue periférico (STEENSMA et al., 2015).

A hematopoese clonal foi demonstrada pela primeira vez em estudos com inativação do cromossomo X em 25% de mulheres com mais de 65 anos (BUSQUE et al., 1996; CHAMPION et al., 1997). Com o uso de ferramentas de sequenciamento genômico, a quantidade de estudos na área de hematopoese clonal relacionada à

idade aumentou e, em 2014, dois grandes estudos detectaram mutações somáticas em genes relacionados à neoplasias hematológicas em pessoas saudáveis (JAISWAL et al., 2014; GENOVESE et al., 2014).

JAISWAL et al. identificaram 805 mutações somáticas em 73 genes em 17.182 pessoas saudáveis. A maior parte das mutações ocorreram em genes frequentemente mutados em síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda. Os genes mutados mais prevalentes em ordem de frequência foram *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1*. Outros genes mutados foram *TP53*, *JAK2* e *SF3B1*. A presença de mutações somáticas foi associada com aumento do risco de neoplasias hematológicas, mortalidade no geral e doenças cardiovasculares.

GENOVESE et al. detectaram hematopoese clonal em 10% de pessoas com mais de 65 anos e 1% nas pessoas com menos de 50 anos. Os genes mais frequentemente mutados foram *DNMT3A*, *ASXL1* e *TET2*. Assim como no trabalho supracitado, hematopoese clonal foi associada ao aumento de risco de neoplasia hematológica e eventos adversos cardiovasculares como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio.

Os principais genes mutados na *CHIP* estão representados na figura 11. Os principais genes mutados, assim como no *CCUS*, são o *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1* (reguladores de processos da epigenética). Estes genes também se encontram, com frequências diferentes, mutados na *SMD* como descreveremos em item subsequente.

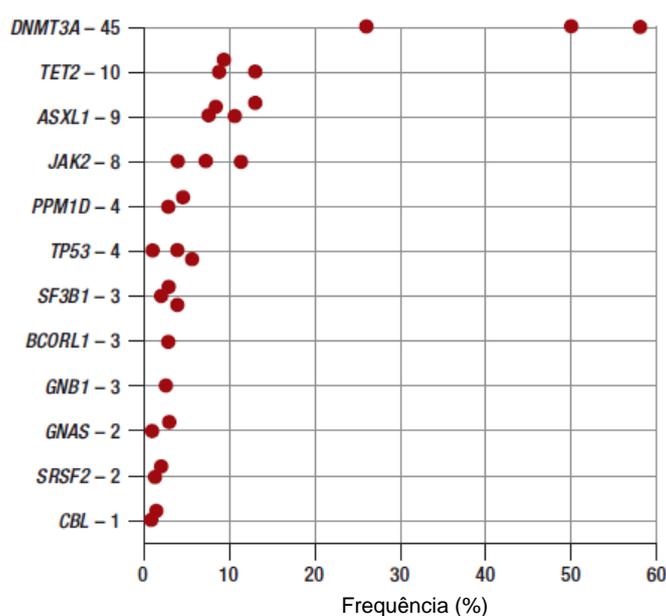


Figura 11. Frequência de genes mutados na *CHIP*. Os números seguidos dos genes representam a frequência em porcentagem. (Adaptado de HEUSER et al., 2016).

Indivíduos com diagnóstico de *CHIP* possuem um risco aumentado de progressão para neoplasias hematológicas como Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mielóide Aguda quando comparados a indivíduos sem mutações somáticas. Assim como na gamopatia monoclonal de significado indeterminado, a taxa de progressão de *CHIP* para neoplasias hematológicas é de 0,5-1% ao ano. Essa progressão parece estar relacionada com a aquisição de novas mutações ao longo dos anos e com a expansão do clone mutado na medula óssea (STEENSMA et al., 2015) Figura 12.

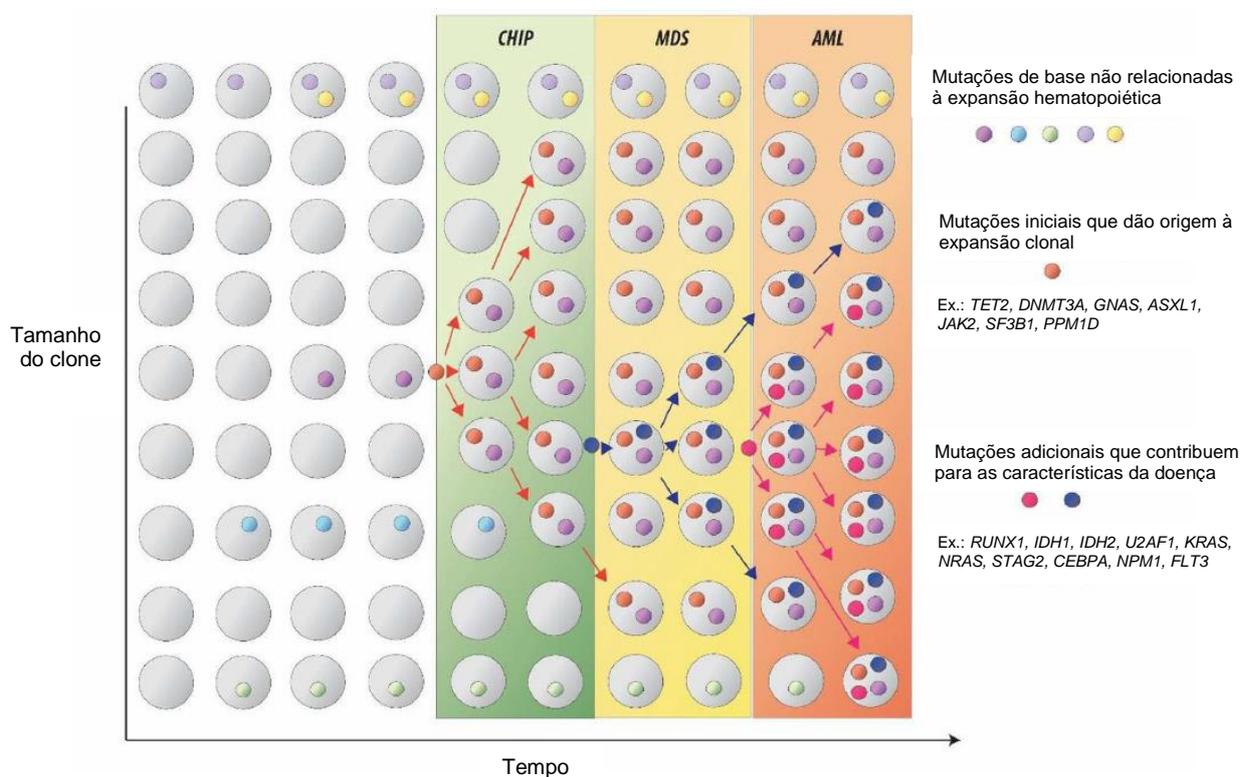


Figura 12. Modelo de expansão e evolução clonal de hematopoese normal para Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado, Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mielóide Aguda. (Adaptado de STEENSMA et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

O objetivo deste estudo é avaliar o perfil de mutações nos genes *SF3B1*, *TET2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *TP53*, *OGG1*, *XRCC1* e *APEX1* em uma amostra de pacientes da cidade de Salvador, com diagnósticos de citopenias, SMD, SMD/SMP e LMA secundária. A avaliação deste perfil de mutações na população descrita tem importância diante de grandes diferenças étnicas entre a população brasileira, e, em especial da cidade de Salvador, e as populações norte-americanas e europeias, com as quais a imensa maioria dos estudos foram conduzidos.

O estudo de mutações somáticas em pacientes com citopenia idiopática de significado indeterminado e o consequente, diagnóstico de citopenia clonal de significado indeterminado, abre caminho para o melhor entendimento da expansão e evolução clonal como base da patogênese das neoplasias mielóides.

O aprofundamento do conhecimento no campo da biologia molecular em SMD e outras neoplasias mieloides é cada vez mais importante diante de evidências crescentes da importância das alterações moleculares no diagnóstico, prognóstico e identificação de potenciais alvos terapêuticos.

A incidência de hematopoese clonal, SMD e outras neoplasias mielóides aumenta com o envelhecimento populacional com bases em dados epidemiológicos dos Estados Unidos da América e o continente europeu. No Brasil, a pirâmide demográfica cada vez mais se assemelha com países desenvolvidos e o aumento da frequência de doenças relacionadas à idade avançada certamente aumentará, dentre elas SMD. O estudo do perfil de mutações em nossa população poderá auxiliar o manejo clínico destes pacientes no futuro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência de mutações em pacientes com diagnósticos de Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado, Síndrome Mielodisplásica e neoplasias mielóides relacionadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a prevalência das mutações nos seguintes genes: *SF3B1*, *TET2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *TP53*, *OGG1*, *XRCC1* e *APEX1* em pacientes com diagnóstico de Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado, Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda secundária (LMAs) e Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa (SMD/SMP).
- Avaliar a frequência de Citopenia Clonal de Significado indeterminado na amostra analisada e o perfil de mutações neste grupo.
- Avaliar a associação entre a presença de mutações e dados clínicos dos pacientes: idade, gênero, citogenética, porcentagem de blastos na medula óssea e tipo de citopenia em sangue periférico.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO

Os sujeitos do estudo são pacientes com diagnóstico citopenia idiopática de significado indeterminado, Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda secundária e Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa (SMD/SMP). Estes pacientes foram avaliados no Hospital São Rafael, no STS – Banco de Sangue, Hematologia Clínica e Laboratório e centros de Hematologia colaboradores. Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e concordaram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado antes da coleta de amostra.

4.2 SUJEITOS E MÉTODOS

- **Especificação do tipo de estudo:** observacional, do tipo corte transversal.
- **Critérios para suspensão ou encerramento da pesquisa:** não se aplica.
- **Local da Pesquisa:** Hospital São Rafael, STS – Banco de Sangue, Hematologia Clínica e Laboratório e serviços de Hematologia colaboradores (entrevista, aplicação do *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* e coleta de amostras); Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT)/IGM – Fiocruz (processamento das amostras e análise dos resultados).
- **Critérios de inclusão:** pacientes com diagnóstico ou suspeita de SMD (citopenia de etiologia em investigação), SMD/SMP e LMAs que ainda não tenham iniciado terapia quimioterápica ou outras terapias como uso de fatores estimuladores de crescimento de séries hematopoiéticas como filgrastima e eritropoietina.

- **Critérios de exclusão:** pacientes em andamento de quaisquer terapias específicas.

- **Tamanho amostral:** foram analisados 47 pacientes com suspeita de SMD (pacientes com citopenias) e indivíduos com diagnósticos de SMD, SMD/SMP e LMAs.
 - ✓ 18 pacientes com diagnóstico de SMD.
 - ✓ 22 pacientes com diagnóstico de citopenia idiopática de significado indeterminado.
 - ✓ 5 pacientes com diagnóstico de SMD/SMP.
 - ✓ 2 pacientes com diagnóstico de LMA secundária.

- **Seleção de amostras:** as amostras selecionadas para análise correspondem a pacientes avaliados pelo especialista hematologista que indicou o exame de estudo medular para investigação de uma determinada citopenia ou citopenias ou ainda pacientes com diagnóstico prévio de SMD em reavaliação medular e em tratamento expectante. Todos os pacientes realizaram adequada avaliação de mielograma no centro de referência orientado pelo médico hematologista assistente do caso. Nove pacientes foram excluídos da análise por diagnóstico de outras patologias durante investigação de citopenias:
 - ✓ 1 paciente com diagnóstico de mieloma múltiplo.
 - ✓ 1 paciente com diagnóstico de Macroglobulinemia de Waldeström.
 - ✓ 2 pacientes com diagnóstico de hepatite C.
 - ✓ 1 paciente com diagnóstico de anemia de doença crônica associada a disfunção renal crônica.

- ✓ 1 paciente com diagnóstico de infiltração medular por neoplasia sólida de mama.
- ✓ 1 paciente com diagnóstico de Linfoma não Hodgkin Difuso de Grandes Células B em progressão de doença.
- ✓ 1 paciente com diagnóstico de Aplasia Pura de Série Vermelha.

4.3 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de aspirado de medula óssea foram coletadas após aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras foram coletadas em regime ambulatorial ou hospital-dia (sob sedação anestésica) no Hospital São Rafael, STS – Banco de Sangue, Hematologia Clínica e Laboratório e serviços de Hematologia colaboradores seguindo normas de execução do procedimento destas instituições. As amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas para o LIGHT para extração de DNA e posterior análise das mutações.

4.4 SELEÇÃO DE GENES E SNPS

Os nove genes foram selecionados utilizando-se como critério principal a relação com neoplasias mieloides definidas na literatura. Critérios complementares utilizados foram a evidência prévia de implicação em prognóstico independente do *IPSS-R* (*SF3B1*) e a avaliação de genes envolvidos em diferentes processos da síntese de DNA e com alterações epigenéticas. Foram selecionados genes que codificam proteínas formadoras do complexo de spliceossomo (*SF3B1* e *U2AF1*), genes envolvidos na metilação (*TET2* e *IDH1/2*) e reparo DNA (*TP53*, *OGG1*, *XRCC1* e *APEX1*).

De cada gene, foram amplificados por PCR, os fragmentos que continham as principais mutações para as quais havia descrição prévia de relação com o desenvolvimento de câncer, com base em banco de dados genômicos como o dbSNP (ncbi.nlm.nih.gov/dbsnp) e com base em citações em literatura. Foram amplificados quatro fragmentos para o gene *SF3B1*, doze fragmentos para o gene *TET2*, quatro fragmentos para o gene *U2AF1*, quatro fragmentos para o gene *IDH1*, dois fragmentos

para o gene *IDH2*, oito fragmentos para o gene *TP53* e dois fragmentos para cada um dos seguintes genes, *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1* (Tabela 1, anexo).

4.5 EXTRAÇÃO DNA

O DNA foi extraído das amostras de aspirados de medula óssea coletadas em tubo de EDTA com o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) baseado no método de extração em coluna conforme descrito previamente por BARTLETT et al., 2003. Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme orientações no protocolo do fabricante.

4.6 PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* E *PCR*

Os *primers* foram desenhados com auxílio da ferramenta *Primer Quest Tool* (IDT DNA Technologies), em regiões adjacentes às mutações de interesse. A posição exata das mutações baseou-se na literatura e na confirmação da posição e da nomenclatura das SNPs segundo o dbSNP (ncbi.nlm.nih.gov/dbsnp) e o mapeamento com a ferramenta Blat (www.genome.ucsc.edu/blat). As reações de PCR foram otimizadas testando-se as temperaturas de anelamento próximas à temperatura de melting determinada para cada primer, com a ferramenta *Tm Calculator* (*Thermo Fischer Scientific*). As reações foram consideradas padronizadas quando um produto único, de tamanho correspondente ao esperado era encontrado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe. O ciclo padrão de amplificação constituiu-se de um *hold* de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos na temperatura de anelamento otimizada e 1 minuto de extensão a 72°C e um hold final de 72°C por 5 minutos. Todas as reações foram feitas em equipamento termociclador Veriti™ Applied Biosystems.

4.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE

Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados com o kit QIAquick *PCR Purification*, diluídos a 20ng/uL e utilizados em reações de sequenciamento com um

dos primers e reagente *Big Dye Terminator* v3.1 de acordo com a padronização da Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA do Instituto Gonçalo Moniz. As sequências foram analisadas em software Finch TV v.1.5.0 (Geospiza Inc.) ou Sequence Analyzer (Thermo Scientific). Quando necessário, foram realizados alinhamentos com a ferramenta MUSCLE (*Multiple Sequence Alignment tool*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). A figura 13 exemplifica sequenciamento realizado neste estudo.

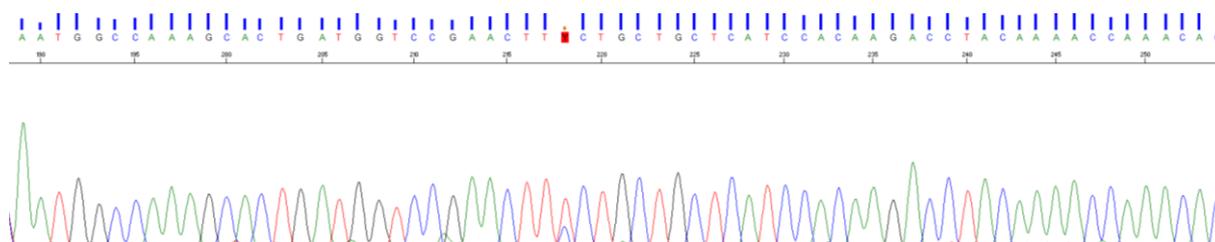


Figura 13. Exemplo de mutação K700E detectada no gene *SF3B1* em um caso da população estudada.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e laboratoriais foram inseridos em planilhas, e apresentados de forma descritiva, como mediana (salvo se destacado o contrário), desvio-padrão (DP), valores mínimos e máximos, e de forma gráfica. Os dados foram analisados com o *software IBM SPSS Data Analysis and Statistical Software*, versão 21.0. O teste Exato de Fisher foi utilizado para análise e associação das variáveis categóricas. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael, Monte Tabor Bahia, processo: 48209115.0.0000.0048) foi aplicado para cada participante voluntário do estudo, segundo determinações da resolução CNS 466/12. Todos os dados foram codificados de modo a preservar a privacidade dos sujeitos, durante todo o andamento do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

5.1.1 Perfil epidemiológico da população

Foram analisados um total de 47 pacientes, 22 (46,8%) pacientes com citopenias, 18 (38,3%) com diagnóstico de SMD, 5 (10,6%) com SMD/SMP e dois (4,3%) casos com LMA secundária. Vinte (42,6%) homens e 27 (57,4%) mulheres com idade variando de 22 a 84 anos. A mediana de idade no grupo total foi 65 anos (amplitude: 62 anos; mínimo: 22 anos; máximo: 84 anos; p25: 48 anos; p75: 75 anos). Frequência por faixa etária: 6 casos (12,8%) com idade entre 18 e menores que 40 anos, 14 casos (29,8%) 40 a 60 anos e 27 casos (57,4%) com idade superior a 60 anos.

O grupo citopenias com 22 pacientes é composto por 8 (36,4%) homens e 14 (63,6%) mulheres com mediana de idade de 56 anos (amplitude: 52 anos; mínimo: 29 anos; máximo: 81 anos; p25: 44,5 anos; p75: 73,25 anos). Frequência de faixas etárias neste grupo, 4 (18,2%) casos com idade entre 18 e menores que 40 anos, 10 (45,5%) casos com idade entre 40 e 60 anos e 8 (36,4%) casos com idade superior a 60 anos.

O grupo SMD possui 18 pacientes, 10 (55,6%) homens e 8 (44,4%) mulheres com idade variando de 23 a 84 anos, mediana de idade de 65 anos (amplitude: 61 anos; mínimo: 23 anos; máximo: 84 anos; p25: 52 anos; p75: 74,75 anos). Frequência de faixas etárias neste grupo, um (5,6%) casos com idade entre 18 e menores que 40 anos, 4 (22,2%) casos com idade entre 40 e 60 anos e 13 (72,2%) casos com idade superior a 60 anos.

O grupo SMD/SMP possui 5 pacientes, um (20,0%) homem e quatro (80,0%) mulheres. Todos os casos com idade superior a 60 anos, mediana de idade de 82 anos (amplitude: 7 anos; mínimo: 76 anos; máximo: 83 anos; p25: 77,5 anos; p75: 83 anos). O grupo LMA secundária é composto por dois casos, um homem de 66 anos e uma mulher com 22 anos (Tabela 5).

Tabela 5. Características Epidemiológicas da população

Características	Grupo Citopenias (n=22)	Grupo SMD (n=18)	Grupo SMD/SMP (n=5)	Grupo LMAs (n=2)
Sexo masculino	8 (36,4%)	10 (55,6%)	1 (20,0%)	1 (50%)
Sexo feminino	14 (63,6%)	8 (44,4%)	4 (80,0%)	1 (50%)
Idade (anos)	56 (29-81)	65 (23-84)	82 (76-83)	44 (22-66)
Mediana				
Mínimo e máximo				

SMD: Síndrome Mielodisplásica, SMD/SMP: Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa, LMAs: Leucemia Mielóide Aguda Secundária.

5.1.2 Características Laboratoriais: hemograma, porcentagem de blastos na medula óssea e citogenética

O perfil de citopenias no total de casos foi avaliado e anemia foi a citopenia mais frequentemente observada, 12 (25,5%) casos, neutropenia: n=4 (8,5%), plaquetopenia: n=4 (8,5%), anemia e neutropenia: n=4 (8,5%), anemia e plaquetopenia: n=10 (21,3%), anemia, neutropenia e plaquetopenia: n=3 (6,4%), neutropenia e plaquetopenia: n=3 (6,4%). A maior parte dos pacientes apresentaram citopenia unilinhagem, n=20 (42,6%), conforme descrito anteriormente, a anemia foi a citopenia mais observada. Dezesete (36,2%) casos apresentaram bicitopenia ou citopenia bilinhagem, a combinação mais comum foi anemia e plaquetopenia; três (6,4%) pacientes apresentaram pancitopenia. Sete (14,9%) casos não foram avaliados por falta de material (Figura 14).

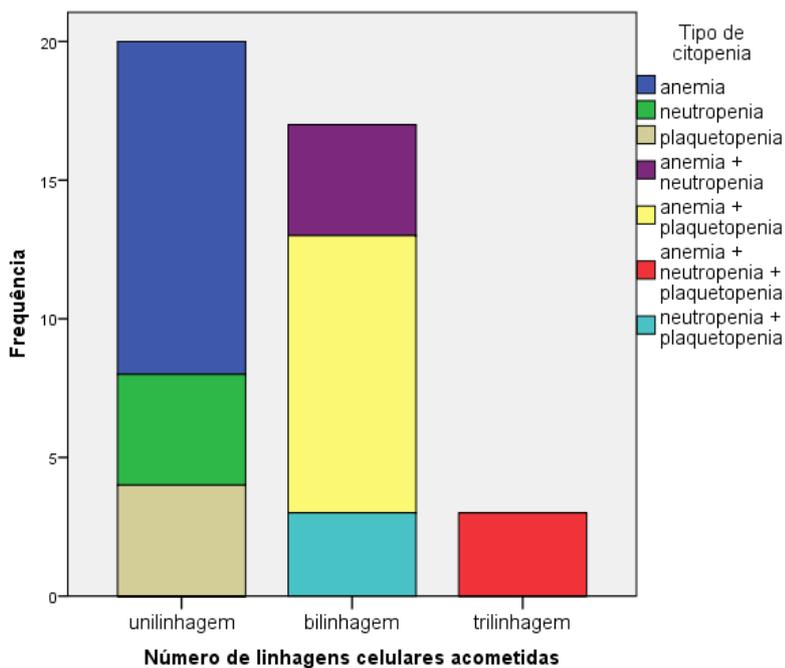


Figura 14. Tipos de citopenias e linhagem acometida no total de pacientes (n=47).

Quanto aos níveis de hemoglobina, contagens neutrofílica e plaquetária, n=20 (42,6%) possuíam níveis de hemoglobina (Hb) maior ou igual a 10,0g/dL, n=12 (25,5%): Hb entre 8,0g/dL e menor que 10,0g/dL e n=8 (17,0%): Hb menor que 8,0g/dL. Vinte e quatro (51,1%) pacientes apresentavam neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L e quinze (31,9%) casos, neutrófilos menores que 800/ μ L. Vinte e sete (57,4%) casos tinham plaquetas maiores ou igual a 100.000/ μ L, n=9 (19,1%) plaquetas entre 50.000/ μ L e 100.000/ μ L e 4 (8,5%) casos com contagem plaquetária menor que 50.000/ μ L. A porcentagem de blastos na medula óssea foi avaliada, n=26 (55,3%): menos de 2% de blastos na medula óssea, n=10 (21,3%): 2 a <5% de blastos, n=2 (4,3%): 5 a 10% de blastos e n=3 (6,4%): mais de 10% de blastos.

A frequência de citogenética alterada foi analisada no total de pacientes e em cada subgrupo diagnóstico como será exposto posteriormente. No total de 47 pacientes, apenas sete (14,9%) casos apresentaram cariótipo com alguma alteração cromossômica, n=26 (55,3%) pacientes apresentaram cariótipo normal e n=14 (29,8%) pacientes não tiveram citogenética analisada por falta de material ou exame com resultado inconclusivo. Frequência de resultados citogenéticos conforme classificação *IPSSR*, n=1 (2,1%): muito bom; n=29 (61,7%): bom; n=1 (2,1%): intermediário; n=2 (4,3%): muito pobre; n=7 (14,9%): sem material; n=7 (14,9%): resultado inconclusivo e nenhum paciente com resultado citogenético classificado como pobre segundo critérios *IPSSR*.

No grupo de citopenias, a anemia foi o tipo de citopenia mais frequentemente observada, com 5 casos (22,7%). A neutropenia apresentou-se em 4 casos (18,2%); a plaquetopenia em 3 casos (13,6%); anemia e neutropenia em 1 caso (4,5%); anemia e plaquetopenia, em 4 casos (18,2%); e finalmente, neutropenia e plaquetopenia em dois casos (9,1%). A maior parte dos pacientes apresentou citopenia unilinhagem, (n=12, 54,5%), conforme descrito anteriormente, sendo anemia a citopenia mais observada. Sete (31,8%) casos apresentaram bicitopenia ou citopenia bilinhagem, sendo a combinação mais comum anemia e plaquetopenia. Em nenhum caso neste grupo foi observado pancitopenia. Três (13,6%) casos não foram avaliados por falta de material (Figura 15).

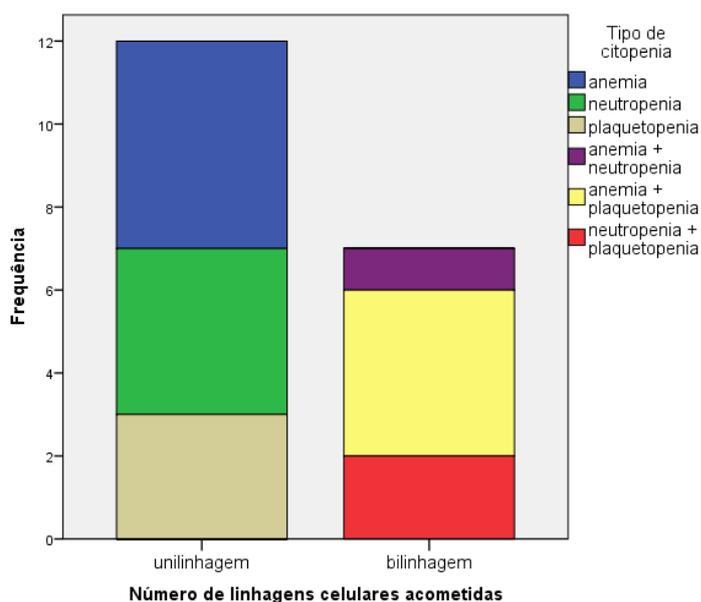


Figura 15. Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo citopenias (n=22).

Os níveis de hemoglobina, contagens neutrofílica e plaquetária também foram analisados em cada subgrupo diagnóstico, conforme resumido na tabela 6. No grupo de citopenia houve um total de 22 pacientes, n=14 (63,6%), que possuíam níveis de hemoglobina (Hb) maior ou igual a 10,0g/dL, n=4 (18,2%): Hb entre 8,0g/dL e menor que 10,0g/dL e n=1 (4,5%): Hb menor que 8,0g/dL. Onze (50,0%) pacientes apresentavam neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L e oito (36,4%) casos, neutrófilos menores que 800/ μ L. Doze (54,5%) casos tinham plaquetas maiores ou igual a 100.000/ μ L, n=4 (18,2%) plaquetas entre 50.000/ μ L e 100.000/ μ L e 3 (13,6%) casos com contagem plaquetária menor que 50.000/ μ L. Três (13,6%) pacientes não tiveram

hemogramas avaliados. A porcentagem de blastos na medula óssea foi avaliada, n=13 (59,1%): menos de 2% de blastos na medula óssea e n=5 (22,7%): 2 a <5% de blastos. Quatro (18,2%) pacientes não foram avaliados (Tabela 6).

A frequência de citogenética alterada no grupo citopenias pacientes foi de apenas um (4,5%) caso. Quinze (68,2%) pacientes apresentaram cariótipo normal e n=6 (27,3%) pacientes não tiveram citogenética analisada por falta de material ou exame com resultado inconclusivo. Frequência de resultados citogenéticos conforme classificação *IPSSR*, n=16 (72,7%): bom; n=3 (13,6%): sem material; n=3 (13,6%): resultado inconclusivo.

O perfil de citopenias no grupo de pacientes com diagnóstico de SMD (n=18) foi avaliado e anemia, assim como no grupo citopenia, foi a citopenia mais frequentemente observada, 4 (22,2%) casos, plaquetopenia: n=1 (5,6%), anemia e neutropenia: n=3 (16,7%), anemia e plaquetopenia: n=3 (16,7%), anemia, neutropenia e plaquetopenia: n= 3 (16,7%), neutropenia e plaquetopenia: n=1 (5,6%). A maior parte dos pacientes apresentou citopenia em duas linhagens celulares (bicitopenia), n=7 (38,9%), n=5 (27,8%) casos com citopenia unilinhagem e três (16,7%) casos com pancitopenia. Os três e únicos casos a apresentar pancitopenia foram observados no grupo de pacientes com diagnóstico de SMD. Três (16,7%) casos não foram avaliados por falta de material (Figura 16).

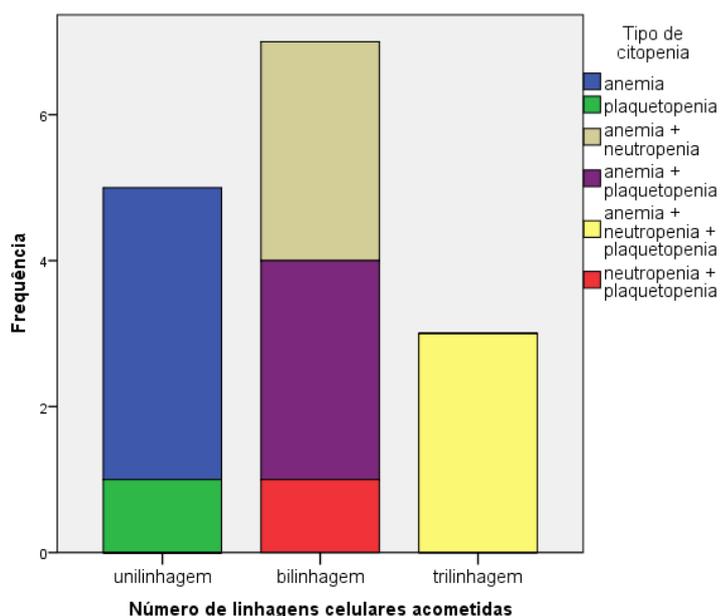


Figura 16. Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo SMD (n=18).

Os níveis de hemoglobina, contagens neutrofílica e plaquetária também foram analisados em cada subgrupo diagnóstico. No grupo SMD com um total de 18 pacientes, n=6 (33,3%) possuíam níveis de hemoglobina (Hb) maior ou igual a 10,0g/dL, n=5 (27,8%): Hb entre 8,0g/dL e menor que 10,0g/dL e n=4 (22,2%): Hb menor que 8,0g/dL. Oito (44,4%) pacientes apresentavam neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L e sete (38,9%) casos, neutrófilos menores que 800/ μ L. Onze (61,1%) casos tinham plaquetas maiores ou igual a 100.000/ μ L, n=3 (16,7%) plaquetas entre 50.000/ μ L e 100.000/ μ L e 1 (5,6%) casos com contagem plaquetária menor que 50.000/ μ L. Três (16,7%) pacientes não tiveram hemogramas avaliados. A porcentagem de blastos na medula óssea foi avaliada, n=11 (61,1%): menos de 2% de blastos na medula óssea, n=4 (22,2%): 2 a <5% de blastos e n=2 (11,1%): entre 5 e 10% de blastos. (Tabela 6).

A frequência de citogenética alterada no grupo SMD foi de quatro (22,2%) casos apresentaram cariótipo com alguma alteração cromossômica, n=8 (44,4%) pacientes apresentaram cariótipo normal e n=6 (33,3%) pacientes não tiveram citogenética analisada por falta de material ou exame com resultado inconclusivo. Frequência de resultados citogenéticos conforme classificação *IPSSR*, n=1 (5,6%): muito bom; n=9 (50,0%): bom; n=2 (11,1%): muito pobre; n=3 (16,7%): sem material; n=3 (16,7%): resultado inconclusivo.

O perfil de citopenias no grupo de pacientes com diagnóstico de SMD/SMP (n=5) também foi avaliado e bicitopenia (anemia e plaquetopenia) esteve presente em 3 (60%) casos e anemia em 2 (40,0%) casos (Figura 17). A maior parte dos pacientes, n=3 (60,0%) apresentaram Hb < 8,0g/dL, os outros dois (40,0%) casos, Hb entre 8,0g/dL e menor que 10,0g/dL. Os cinco pacientes deste grupo tinham contagem neutrofílica maior que 800/ μ L, três pacientes (60,0%) casos tinham plaquetas maiores ou igual a 100.000/ μ L e n=2 (40,0%) plaquetas entre 50.000/ μ L e 100.000/ μ L. A porcentagem de blastos na medula óssea foi avaliada, n=2 (40,0%): menos de 2% de blastos na medula óssea, n=1 (20,0%): 2 a <5% de blastos e n=2 (40,0%): >10% de blastos (Tabela 6).

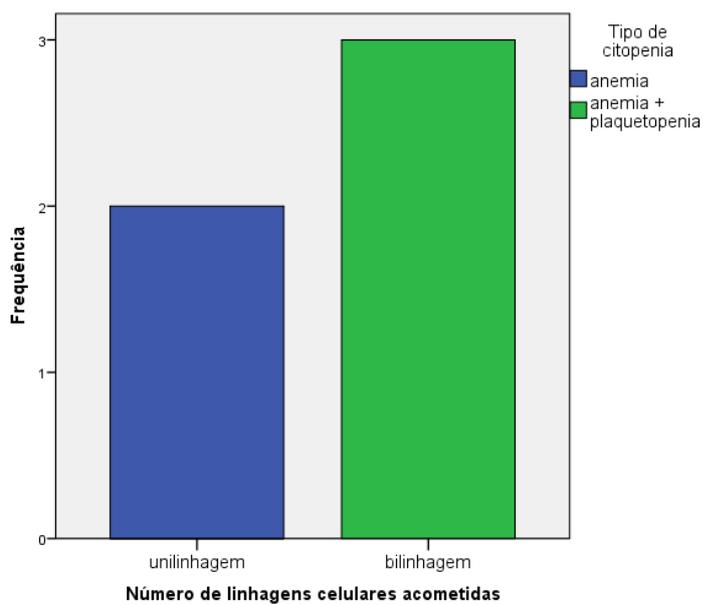


Figura 17. Tipos de citopenias e linhagem acometida no grupo SMD/SMP (n=5).

Tabela 6. Características Laboratoriais da população

Características		Total de casos (n=47)	Grupo Citopenias (n=22)	Grupo SMD (n=18)	Grupo SMD/SMP (n=5)
Hemoglobina (g/dL)	≥10g/dL	20 (42,6%)	14 (63,6%)	6 (33,3%)	--
	8 a <10g/dL	12 (25,5%)	4 (18,2%)	5 (27,8%)	2 (40,0%)
	<8g/dL	8 (17,0%)	1 (4,5%)	4 (22,2%)	3 (60,0%)
Neutrófilos (μL)	≥800/μL	24 (51,1%)	11 (50,0%)	8 (44,4%)	5 (100,0%)
	<800/μL	15 (31,9%)	8 (36,4%)	7 (38,9%)	--
Plaquetas (μL)	≥100.000/μL	27 (57,4%)	12 (54,5%)	11 (61,1%)	3 (60,0%)
	50.000 a <100.000/μL	9 (19,1%)	4 (18,2%)	3 (16,7%)	2 (40,0%)
	<50.000/μL	4 (8,5%)	3 (13,6%)	1 (5,6%)	--
Blastos na medula óssea (%)	<2%	26 (55,3%)	13 (59,1%)	11 (61,1%)	2 (40,0%)
	2 a <5%	10 (21,3%)	5 (22,7%)	4 (22,2%)	1 (20,0%)
	5 a 10%	2 (4,3%)	--	2 (11,1%)	--
	>10%	3 (6,4%)	--	--	2 (40,0%)

* SMD: Síndrome Mielodisplásica, SMD/SMP: Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa.

** O grupo Leucemia Mielóide Aguda secundária não foi representado nesta tabela.

*** Porcentagens supracitadas correspondem às frequências com inclusão de dados faltantes.

5.1.3 Classificação de Risco (*IPSS-R*) no grupo SMD

A classificação de risco dos pacientes com diagnóstico de SMD foi avaliada através do escore prognóstico de risco, *IPSS-R*. Dos 18 casos analisados, 7 (38,9%) não foram classificados pela ausência do resultado de citogenética, seja por resultados inconclusivos ou por falta de material para análise. Dos onze casos analisados, cinco (37,8%) foram classificados como *IPSS-R* muito baixo, quatro (22,2%): baixo e dois casos (11,1%): muito alto risco (Figura 18). Adicionalmente, analisamos a associação entre *IPSS-R* no grupo SMD com a presença de pelo menos um gene mutado, com a faixa etária e o tipo de citopenia. Os pacientes com idade superior a 60 anos foram classificados mais frequentemente como muito baixo risco ($p=0,01$). Não observamos uma associação estatisticamente significativa entre a presença de gene mutado e *IPSS-R* ($p=0,588$). A anemia foi a citopenia mais frequentemente associada a *IPSS-R* muito baixo e baixo, contudo sem significância estatística ($p=0,247$).

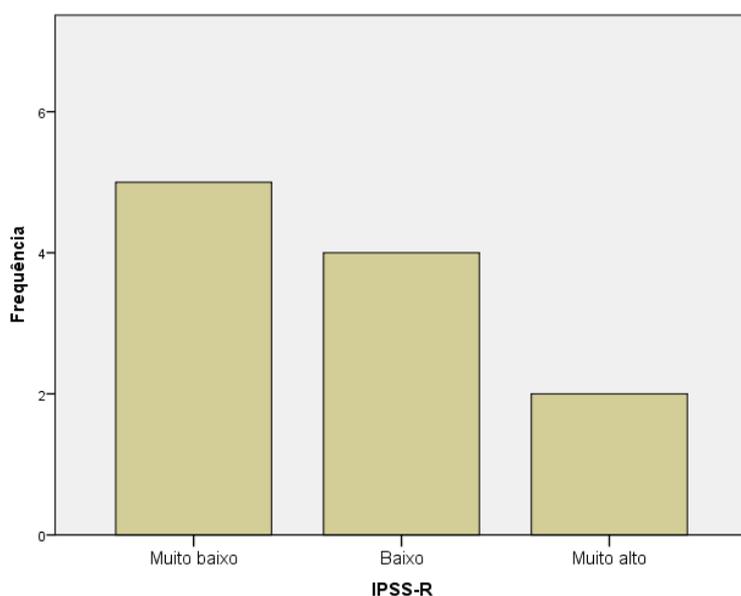


Figura 18. *IPSS-R* no grupo SMD (n=18).

5.1.4 Frequência e perfil de genes mutados

A presença de mutação em um dos nove genes estudados foi avaliada. Trinta e quatro (72,3%) casos apresentaram mutações em um dos genes e co-mutações estão incluídas nesta análise. Treze (27,7%) pacientes não apresentaram nenhuma mutação. No grupo de citopenias, 15 (68,2%) dos casos apresentaram pelo menos um gene mutado. No grupo SMD, 16 (88,9%) casos possuem pelo menos um gene mutado. Em apenas dois (11,1%) casos não foram encontrados genes mutados. No pequeno grupo de pacientes com diagnóstico de SMD/SMP, nós detectamos pelo menos um gene mutado em três (60,0%) casos. Não encontramos genes mutados nos dois pacientes com diagnóstico de LMA secundária. A frequência do número de mutações também foi avaliada no grupo total de 47 pacientes. Cinco casos (10,6%) apresentam mutação em um único gene, mas a maior parte da amostra apresentou duas mutações, (n=14; 29,8%). Oito casos (17%) apresentaram 3 mutações e sete casos (14,9%) apresentaram 4 mutações. A frequência do número de mutações nos grupos citopenias, SMD e SMD/SMP são descritos na Figura 19.

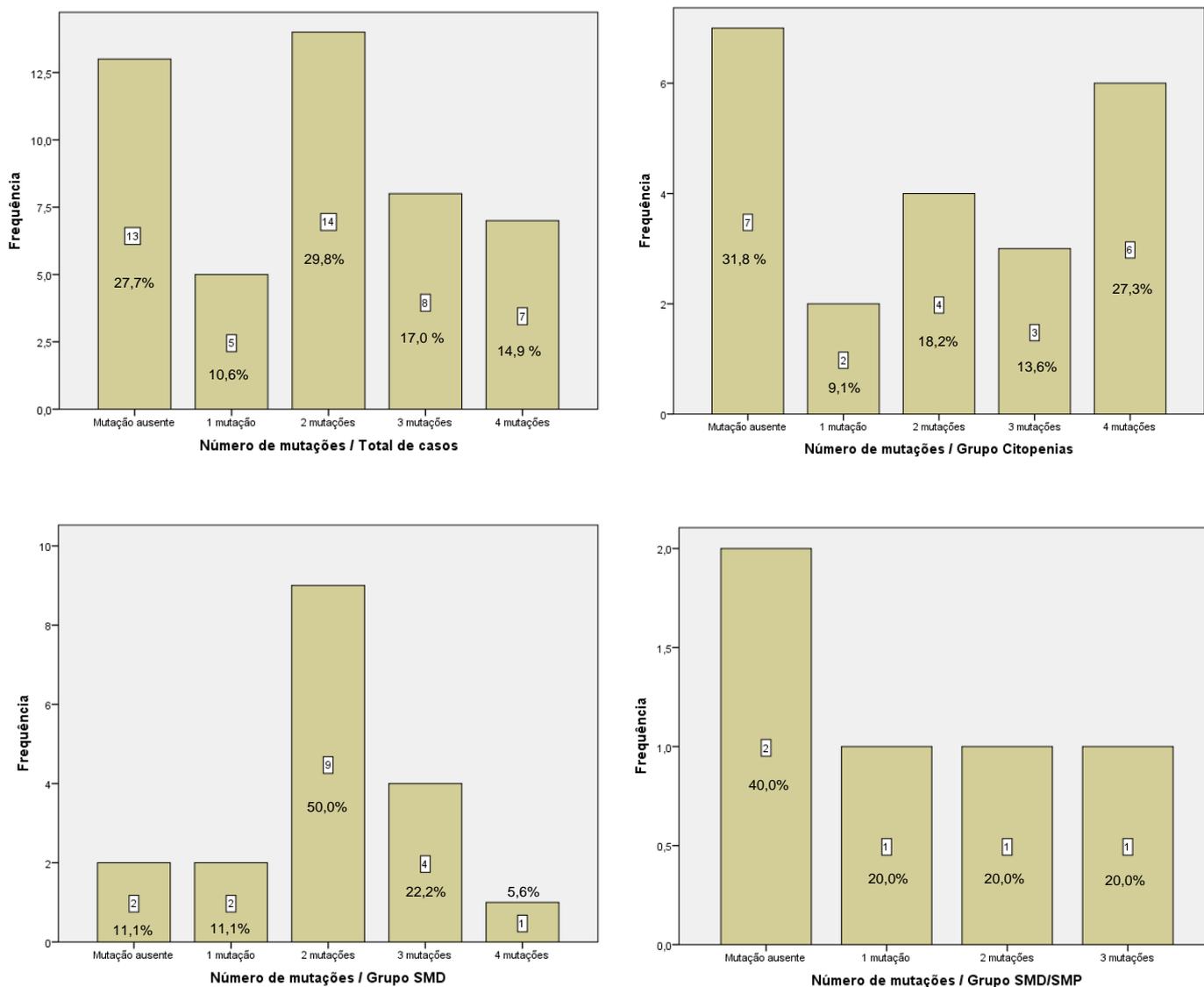


Figura 19. Frequência do número de genes mutados no total de casos (n=47), no grupo citopenias (n=22), no grupo SMD (n=18) e grupo SMD/SMP (n=5). O grupo LMA secundária (n=2) não apresentou mutação nos genes estudados.

A tabela 7 demonstra as frequências dos genes mutados na população estudada conforme especificada em legenda e o perfil de genes mutados nos subgrupos de populações do estudo conforme diagnóstico: grupo citopenias, grupo SMD e grupo SMD/SMP. O grupo LMA secundária não apresentou gene mutado conforme descrito anteriormente. Detectamos a co-mutação, *SF3B1* e *U2AF1* em um paciente no grupo SMD.

Tabela 7. Frequência e perfil de genes mutados

Gene	Total de casos	Grupo Citopenias	Grupo SMD	Grupo SMD/SMP
Frequência de mutação (%)				
<i>SF3B1</i>	6,7%	9,0%	5,5%	--
<i>U2AF1</i>	31,2%	46,6%	20,0%	--
<i>TET2</i>	28,1%	20,0%	33,3%	50,0%
<i>IDH1</i>	--	--	--	--
<i>IDH2</i>	6,2%	13,3%	--	--
<i>TP53</i>	9,4%	6,7%	13,3%	--
<i>XRCC1</i>	47,0%	66,6%	62,5%	--
<i>OGG1</i>	29,4%	46,6%	12,5%	33,0%
<i>APEX1</i>	58,8%	53,3%	68,75%	33,0%

Obs.: *SF3B1* foi analisado em um total de 47 pacientes. *TET2*, *U2AF1*, *IDH1/2* e *TP53* foram analisados em 32 pacientes. *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1* foram analisados em 34 pacientes. A diferença no n de amostras nos grupos de genes citados deve-se a questões técnicas relacionados a baixo volume de material genético para análise.

5.2 ANÁLISES DAS MUTAÇÕES

5.2.1 Associação da presença e número de mutações e diagnóstico

A presença ou ausência de mutação no total de pacientes (n=47) foi associada aos subgrupos de diagnósticos dos casos estudados e esta associação foi significativa ($p < 0,05$). O grupo SMD apresentou o maior número de casos (34,0%) com pelo menos um gene mutado em relação ao total de casos, seguido pelo grupo de citopenias com 31,9% e o grupo SMD/SMP com 6,4% ($p = 0,042$) Figura 20. O número de genes mutados também foi avaliado e associado aos subgrupos de diagnósticos, contudo não houve associação estatisticamente significativa ($p = 0,17$). Figura 21.

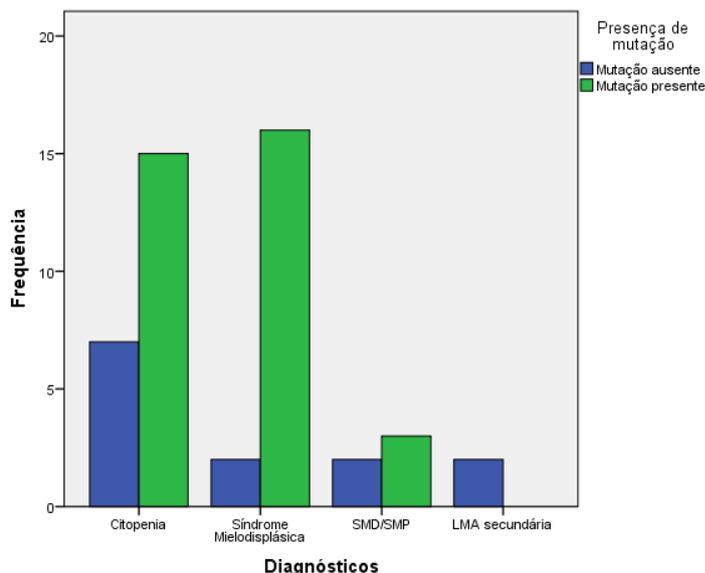


Figura 20. Associação entre presença de pelo menos um gene mutado e diagnóstico ($p=0,042$)*.

*Teste Exato de Fisher.

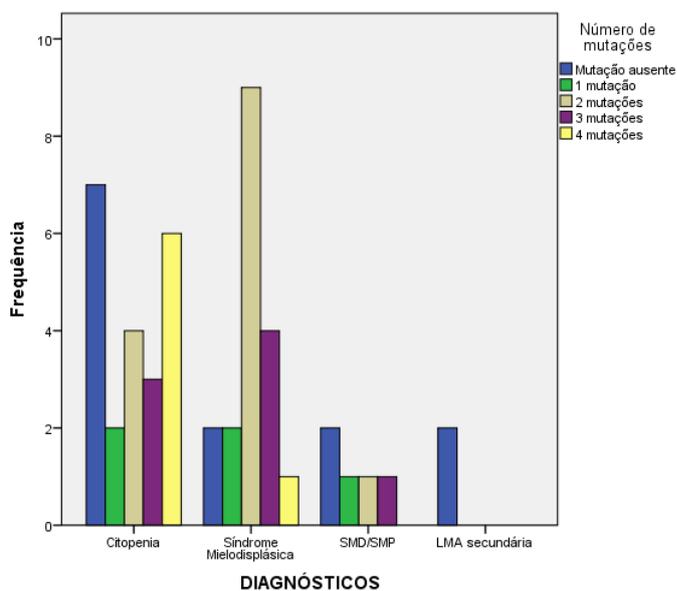


Figura 21. Associação entre número de genes mutados e diagnóstico ($p=0,17$)*.

*Teste Exato de Fisher.

5.2.2 Associação da presença de mutações e dados citogenéticos

A análise de presença ou ausência de pelo menos um gene mutado, associada à citogenética alterada (pelo menos uma alteração cromossômica) mostrou uma

grande discrepância entre o número de casos com presença de gene mutado, contudo com cariótipo normal. Dentre os 47 casos avaliados, 34 casos apresentaram pelo menos um gene mutado, e destes, 26 tinham cariótipo normal ($p=0,319$). Figura 22.

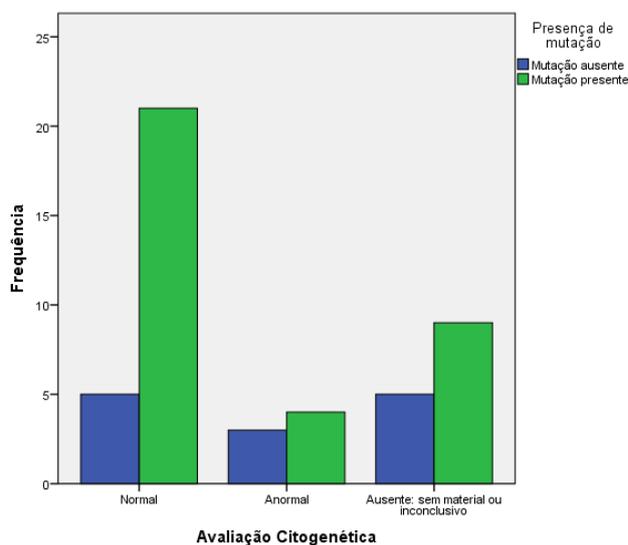


Figura 22. Associação entre presença de genes mutados e citogenética ($p=0,319$)*.

*Teste Exato de Fisher.

5.2.3 Associação da presença de mutações com sexo e idade

A presença de pelo menos um gene mutado foi associada ao sexo e idade no total de casos ($n=47$). Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e o sexo dos pacientes ($p=1,0$). A associação entre a presença de gene mutado e idade foi estatisticamente significativa, a maior parte das mutações (40,4%) foram observadas em pacientes com mais de 60 anos ($p=0,021$). Figura 23.

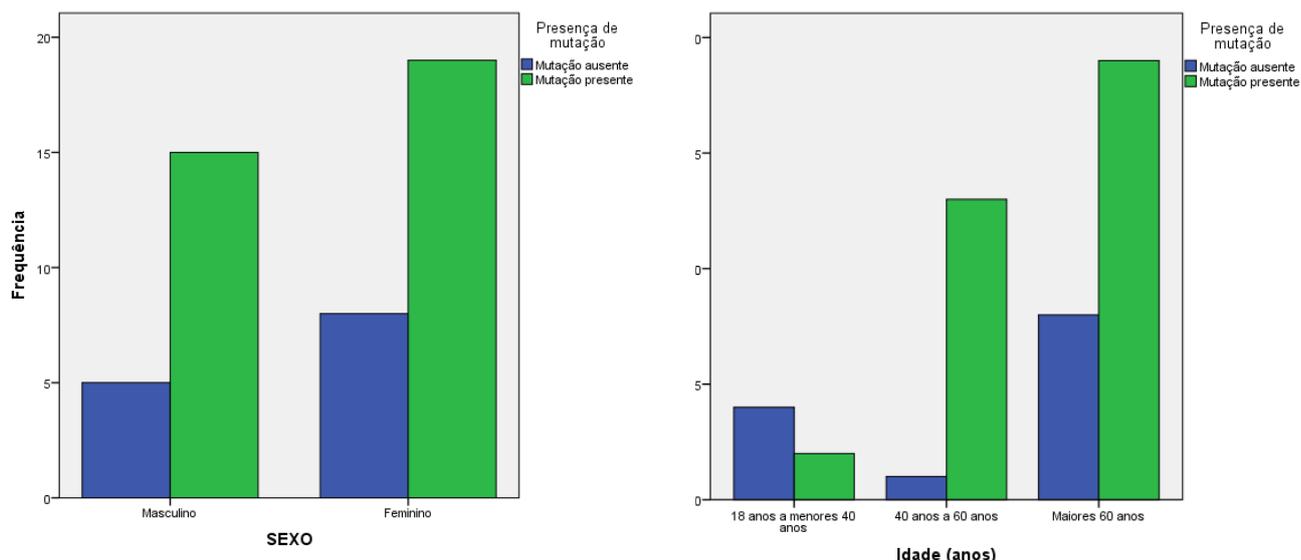


Figura 23. Associação entre presença de genes mutados e sexo ($p=1,0$)* e idade ($p=0,021$)*. *Teste Exato de Fisher.

5.2.4 Associação da presença de mutações e tipo e número de citopenia

A presença ou não de pelo menos um gene mutado foi associada às variáveis: tipos de citopenia e número de linhagens celulares comprometidas. A citopenia com maior número de mutações é anemia (17%) $p=0,7$. A associação entre a presença de gene mutado e o número de linhagens acometidas também não foi estatisticamente significativa. A presença de pelo menos um gene mutado foi maior em unilinhagem e igualmente em bilinhagem (27,7%) $p=0,78$. Figura 24.

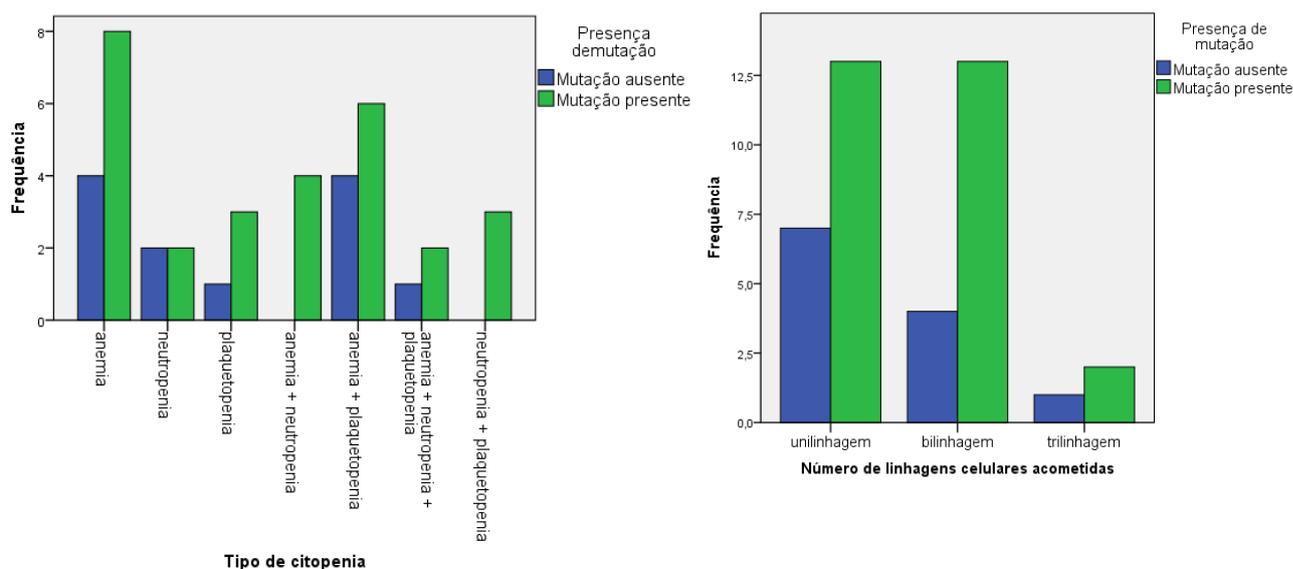


Figura 24. Associação entre presença de genes mutados e tipo de citopenia ($p=0,7$)* e números de linhagens celulares acometidas ($p=0,78$)*.

*Teste Exato de Fisher.

5.2.5 Associação da presença de mutações e níveis de hemoglobina (g/dL), neutrófilos (μ L), plaquetas (μ L) e porcentagem de blastos na medula óssea

Analisamos associação entre a presença ou ausência de pelo menos um gene mutado aos parâmetros do hemograma e porcentagem de blastos na medula óssea no total de casos (n=47) e nos grupos citopenias (n=22) e SMD (n=18).

Em relação à associação entre presença de gene mutado e níveis de hemoglobina no total de casos, a maior parte dos casos (35%) com presença de alguma mutação foi observada em associação com níveis de Hb maior ou igual a 10,0 g/dL seguido por 27,5% dos casos com níveis de Hb 8,0 a <10,0 g/dL ($p=0,035$). A contagem neutrofílica maior que 800/ μ L foi mais associada com presença de mutação, contudo sem significância estatística ($p=0,582$). Assim como a associação com neutrófilos, a associação com plaquetas e presença de pelo menos um gene mutado não foi estatisticamente significativa; 47,5% dos casos com presença de mutação apresentaram contagens plaquetárias maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=1,0$). A associação entre presença de mutação e porcentagem de blastos na medula óssea foi estatisticamente significativa, com 53,7% dos casos com gene mutado presentes em associação com contagem de blastos menor que 2% na medula óssea ($p=0,023$).
Figura 25.

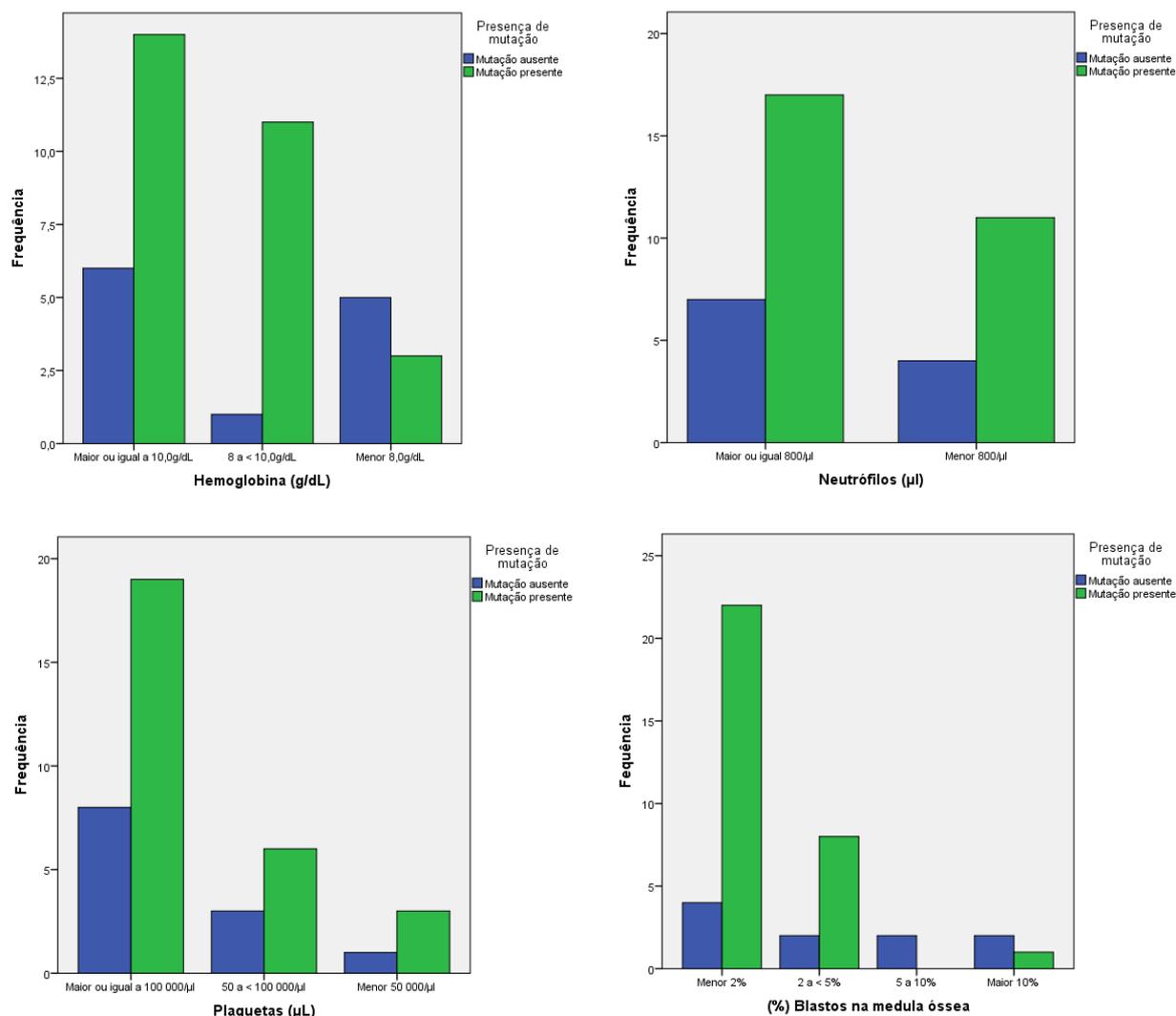


Figura 25. Associação entre presença de genes mutados e Hb ($p=0,035$)*, neutrófilos ($p=0,582$)*, plaquetas ($p=1,0$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,023$)*.

*Teste Exato de Fisher.

No grupo de pacientes com citopenias ($n=22$), a maior parte dos casos (42,1%) com presença de alguma mutação foi observada em associação com nível de Hb maior ou igual a 10,0 g/dL, seguido por 21,1% dos casos com níveis de Hb 8,0 a <10,0 g/dL ($p=0,098$). A contagem neutrofílica maior que 800/ μ L (36,8%) foi mais associada com presença de mutação, contudo sem significância estatística ($p=0,663$). Assim como a associação com neutrófilos, a associação com plaquetas e presença de pelo menos um gene mutado não foi estatisticamente significativa; 36,8% dos casos com presença de mutação apresentaram contagens plaquetárias maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=1,0$). A associação entre presença de mutação e porcentagem de blastos na medula óssea não foi estatisticamente significativa, com 50,0% dos casos com gene mutado e contagem de blastos menor que 2% na medula óssea ($p=1,0$). Figura 26.

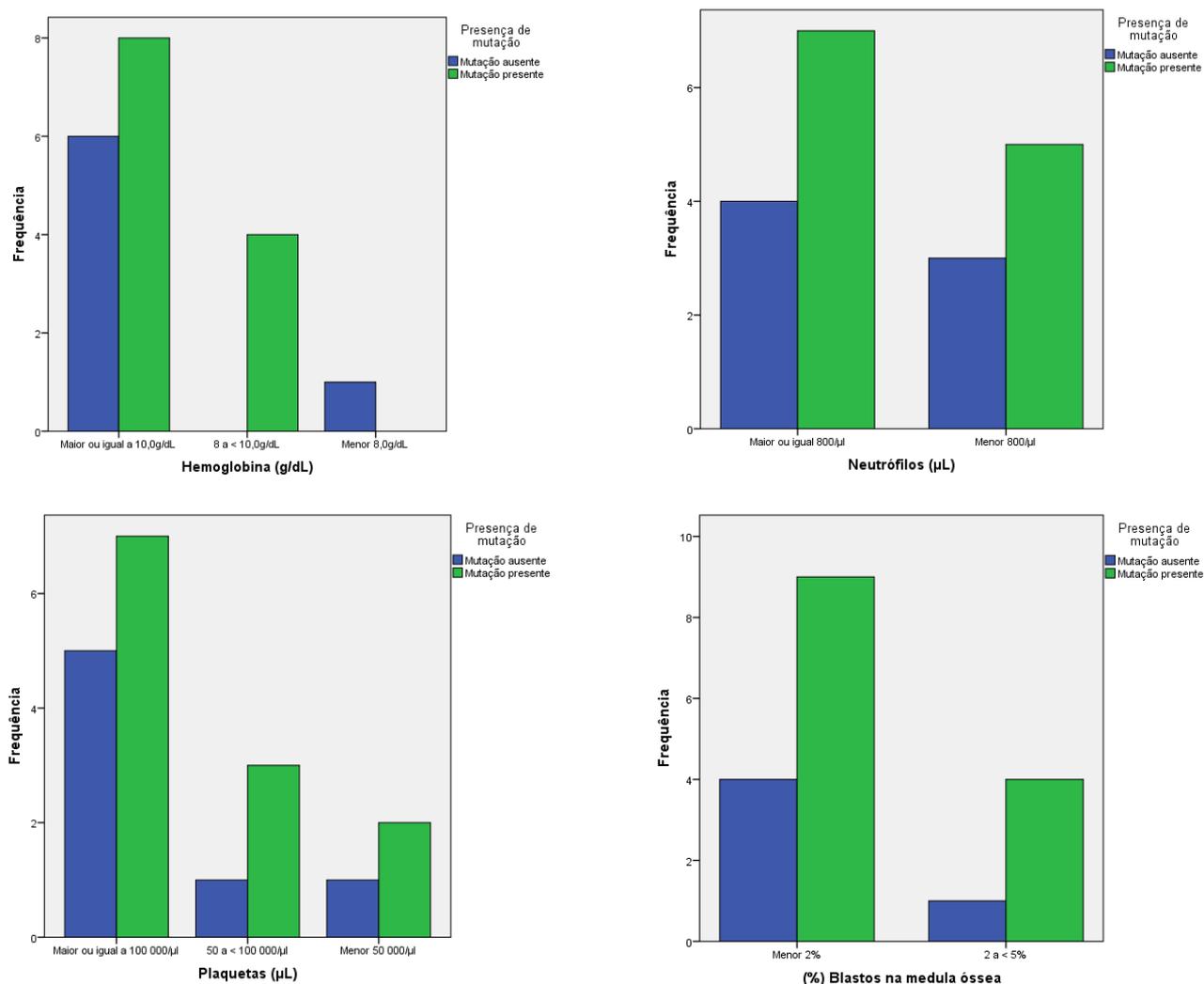


Figura 26. Associação entre presença de genes mutados e Hb ($p=0,098$)*, neutrófilos ($p=0,663$)*, plaquetas ($p=1,0$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,1$)* no grupo citopenias.

*Teste Exato de Fisher.

No grupo SMD ($n=18$), a maior parte dos casos (40,0%) com presença de alguma mutação foi observada em associação com níveis de Hb maior ou igual a 10,0 g/dL seguido por 33,3% dos casos com níveis de Hb 8,0 a <10,0 g/dL ($p=0,057$). A contagem neutr f lica maior que 800/ L (36,8%) foi mais associada com presença de mutação, contudo sem significância estatística ($p=0,733$). Assim como a associação com neutrófilos, a associação com plaquetas e presença de pelo menos um gene mutado não foi estatisticamente significante; 66,7% dos casos com presença de mutação apresentaram contagens plaquetárias maior ou igual a 100.000/ L ($p=0,476$). A associação entre presença de mutação e porcentagem de blastos na

medula óssea não foi estatisticamente significativa, com 64,7% dos casos com gene mutado e contagem de blastos menor que 2% na medula óssea ($p=0,007$). Figura 27.

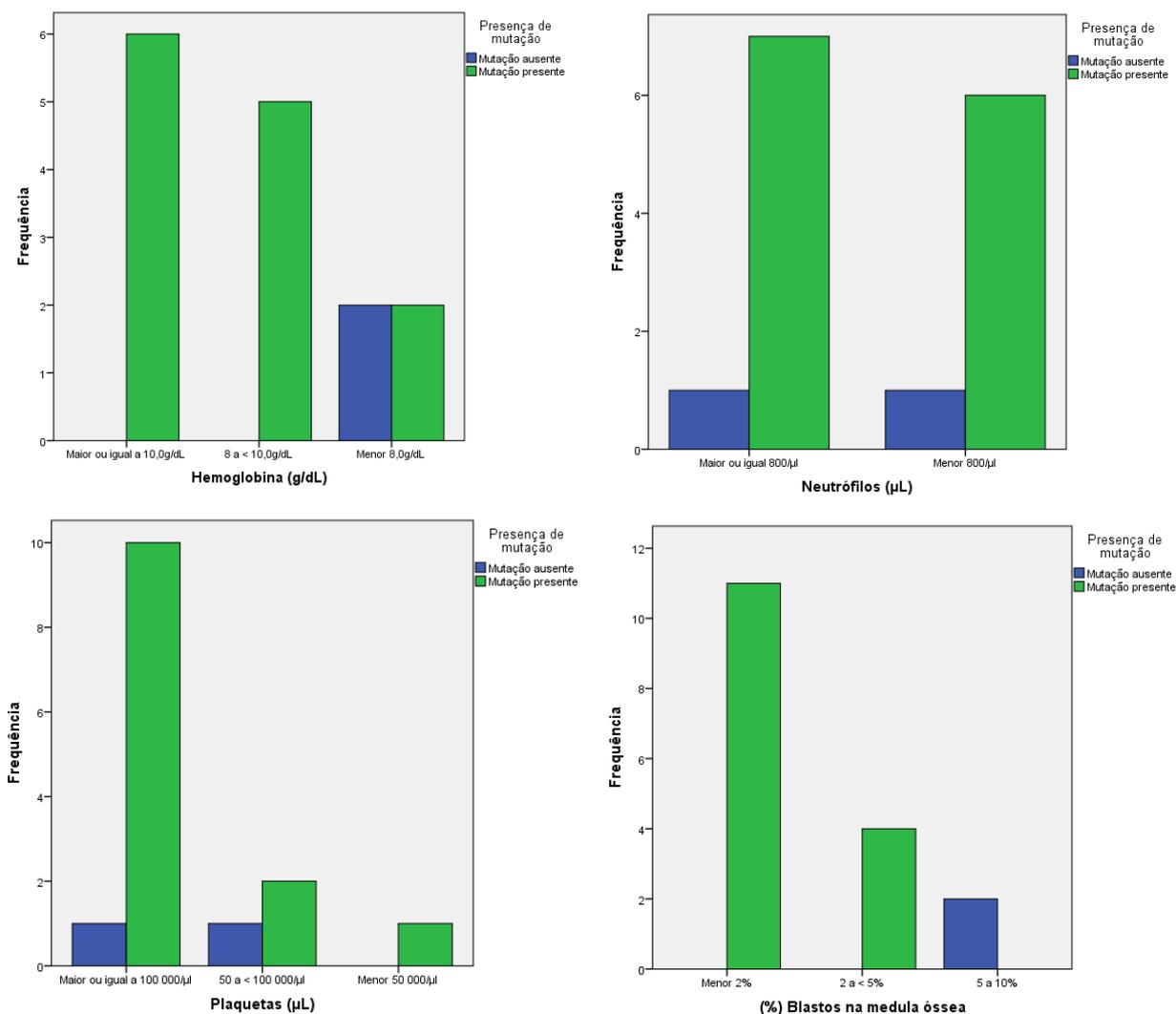


Figura 27. Associação entre presença de genes mutados e Hb ($p=0,057$)*, neutrófilos ($p=0,733$)*, plaquetas ($p=0,0476$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,007$)* no grupo SMD ($n=18$).
*Teste Exato de Fisher.

Em seguida, realizamos o aprofundamento das análises com avaliação de genes mutados específicos e sua associação com características epidemiológicas e laboratoriais da população em estudo. Os genes com maior frequência no grupo total, e nos grupos citopenias e SMD foram escolhidos para esta avaliação: *U2AF1*, *TET2*, *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1*.

5.3 ANÁLISES DO GENE *U2AF1*

5.3.1 Análise do perfil epidemiológico e gene *U2AF1* mutado

Realizamos a análise da associação entre *U2AF1* mutado e idade e sexo da população em estudo. A presença de mutação neste gene foi maior (60%) na faixa etária com idade superior a 60 anos ($p=0,102$) e maior no sexo masculino (60%) $p=0,450$ (Figura 28).

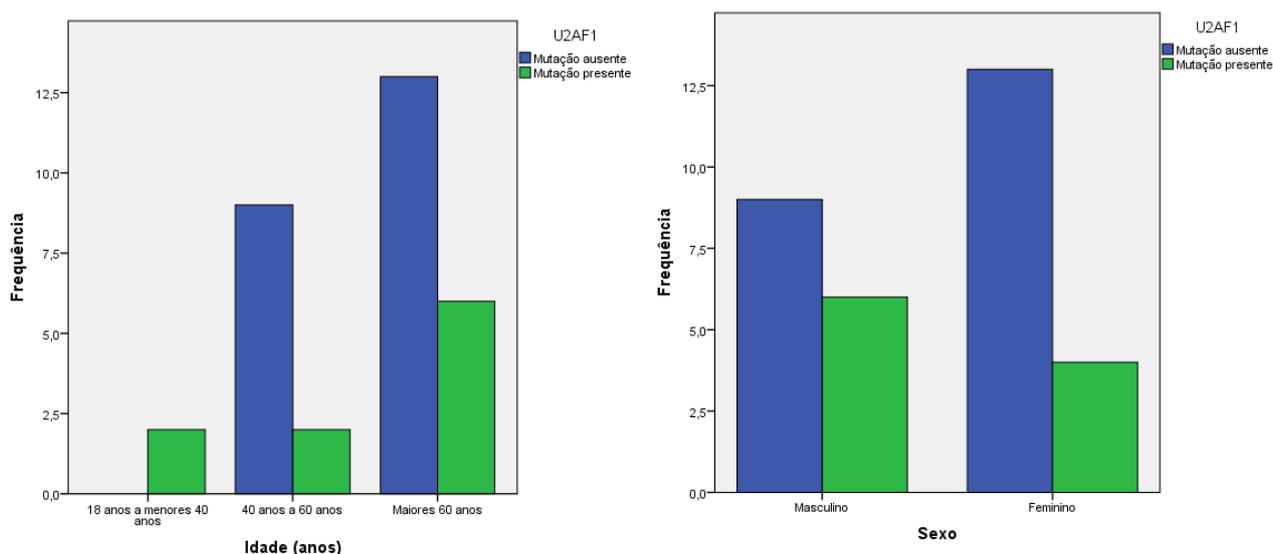


Figura 28. Associação entre *U2AF1* mutado e idade ($p=0,102$)* e sexo ($p=0,450$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=32$).

*Teste Exato de Fisher.

A análise anterior foi realizada separadamente para os grupos citopenias e SMD. No grupo citopenias, 42,9% dos casos com *U2AF1* mutado foram maiores de 60 anos ($p=0,184$) e 57,1% do sexo masculino ($p=0,1$). No grupo SMD, os resultados foram semelhantes, contudo houve uma maior porcentagem de pacientes com gene mutado na faixa etária maior de 60 anos: 75% dos casos ($p=0,484$) e 57,1% dos casos do sexo masculino ($p=0,659$).

5.3.2 Análise do perfil laboratorial e gene *U2AF1* mutado

Foi realizada avaliação de dados laboratoriais (hemoglobina, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de blastos na medula óssea) com a presença de mutação no gene *U2AF1* no grupo total avaliado para este gene (n=32). No total de casos analisados para este gene, 71,4% dos pacientes com presença de mutação possuíam Hb maior ou igual a 10,0g/dL ($p=0,568$); 57,9%, neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L ($p=0,655$), a grande maioria, 85,57%, plaquetas maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=0,805$), 77,8% dos casos com *U2AF1* mutado tinham porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2%, contudo esta associação não foi estatisticamente significativa (Figura 29).

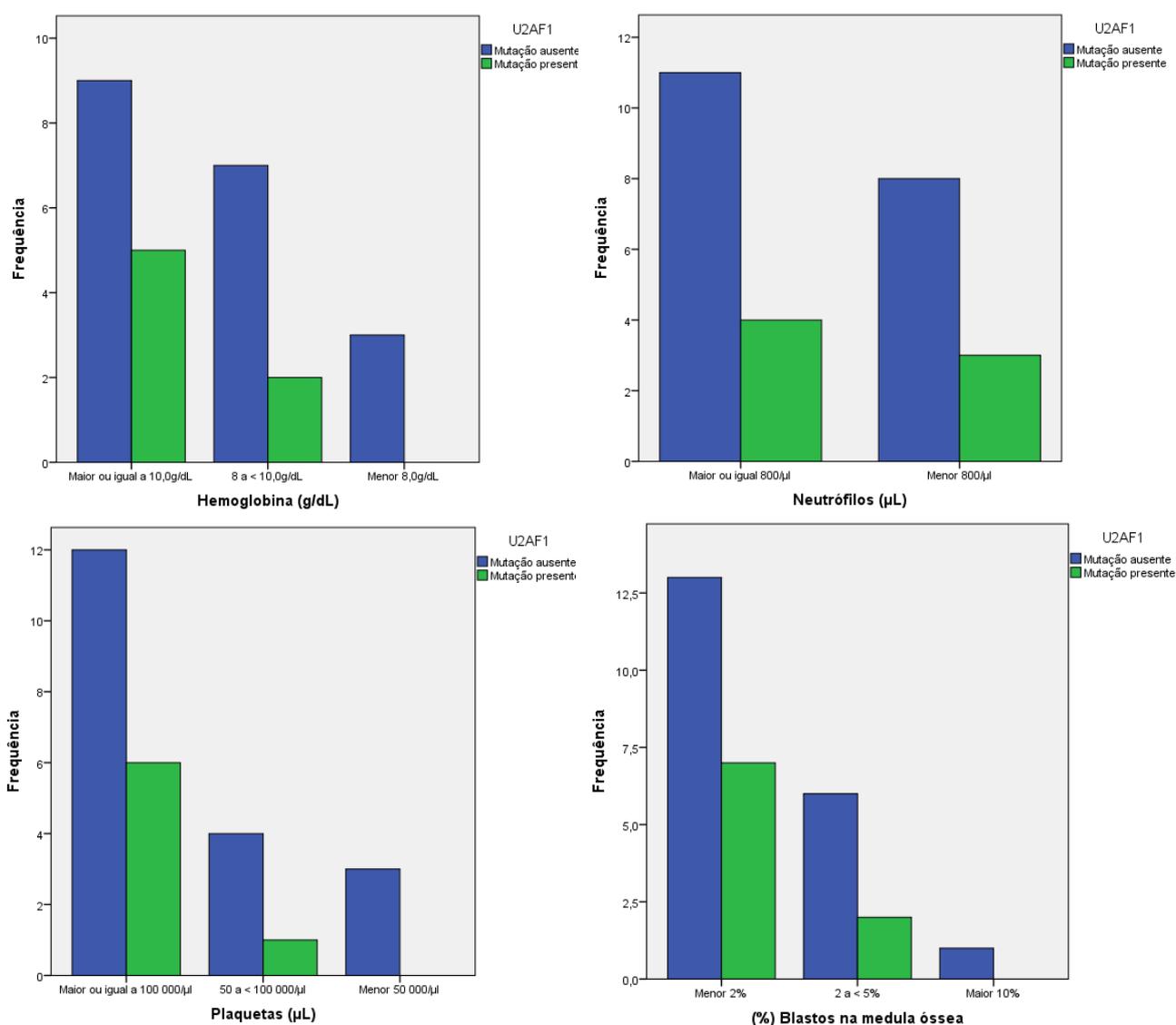


Figura 29. Associação entre *U2AF1* mutado e hemoglobina ($p=0,568$)*, neutrófilos ($p=0,655$)*, plaquetas ($p=0,805$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=1,0$)* no total de casos avaliados para este gene (n=32).

*Teste Exato de Fisher.

Em seguida realizamos a análise de associação entre a presença de *U2AF1* mutado e o tipo de citopenia. A combinação neutropenia e plaquetopenia foi mais comumente associada a este gene mutado (33,3%), contudo sem significância estatística ($p=0,405$). Figura 30.

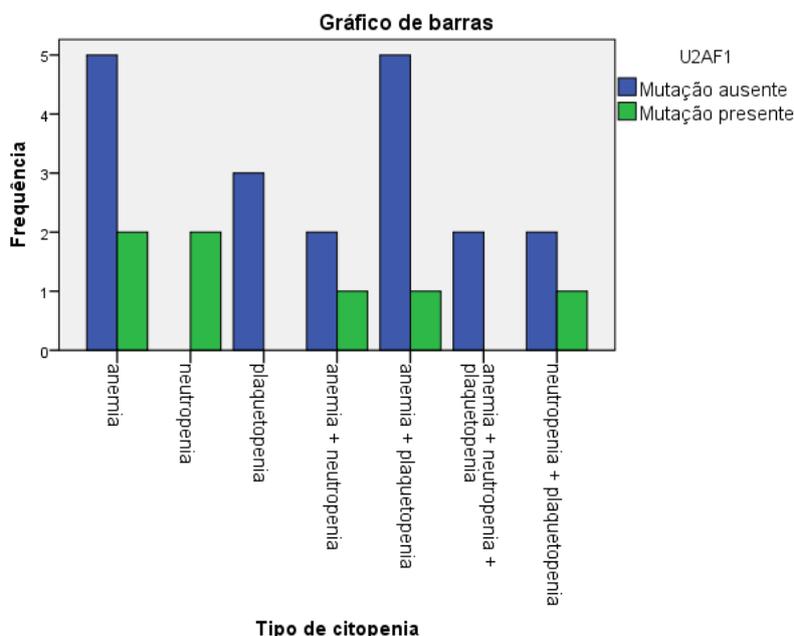


Figura 30. Associação entre *U2AF1* mutado e tipo de citopenia ($p=0,405$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=32$).

*Teste Exato de Fisher.

5.4 ANÁLISES DO GENE *TET2*

5.4.1 Análise do perfil epidemiológico e gene *TET2* mutado

Analizamos a associação entre *TET2* mutado e idade e sexo da população em estudo. A presença de mutação neste gene foi maior (66,7%) na faixa etária com idade superior a 60 anos ($p=1,0$) e maior no sexo feminino (77,8%) $p=0,087$ (Figura 31).

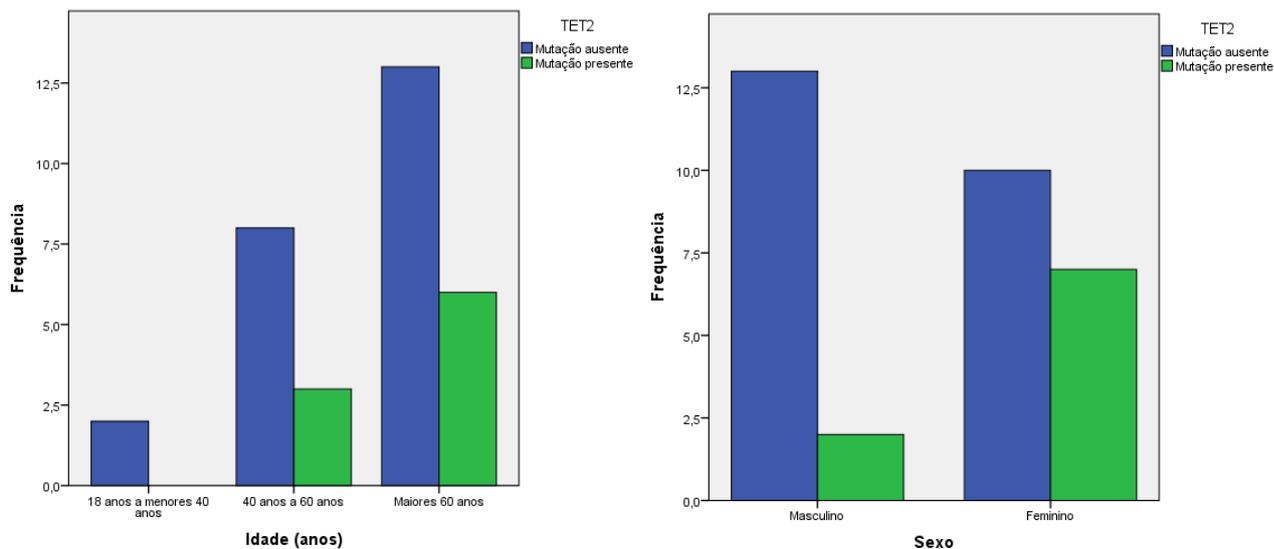


Figura 31. Associação entre *TET2* mutado e idade ($p=1,0$)* e sexo ($p=0,087$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=32$).

*Teste Exato de Fisher.

5.4.2 Análise do perfil laboratorial e gene *TET2* mutado

No total de casos analisados para este gene, 75,0% dos pacientes com presença de mutação possuíam Hb maior ou igual a 10,0g/dL ($p=0,424$); 62,5%, neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L ($p=0,543$); 62,5%, plaquetas maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=1,0$) e 75,0% dos casos com *TET2* mutado tinham porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2%, contudo, esta associação não foi estatisticamente significativa (Figura 32).

Em seguida realizamos a análise de associação entre a presença de *TET2* mutado e o tipo de citopenia. Anemia e a combinação anemia e plaquetopenia foram mais comumente associadas a este gene mutado (22,2% para ambas), contudo sem significância estatística ($p=0,858$). Figura 33.

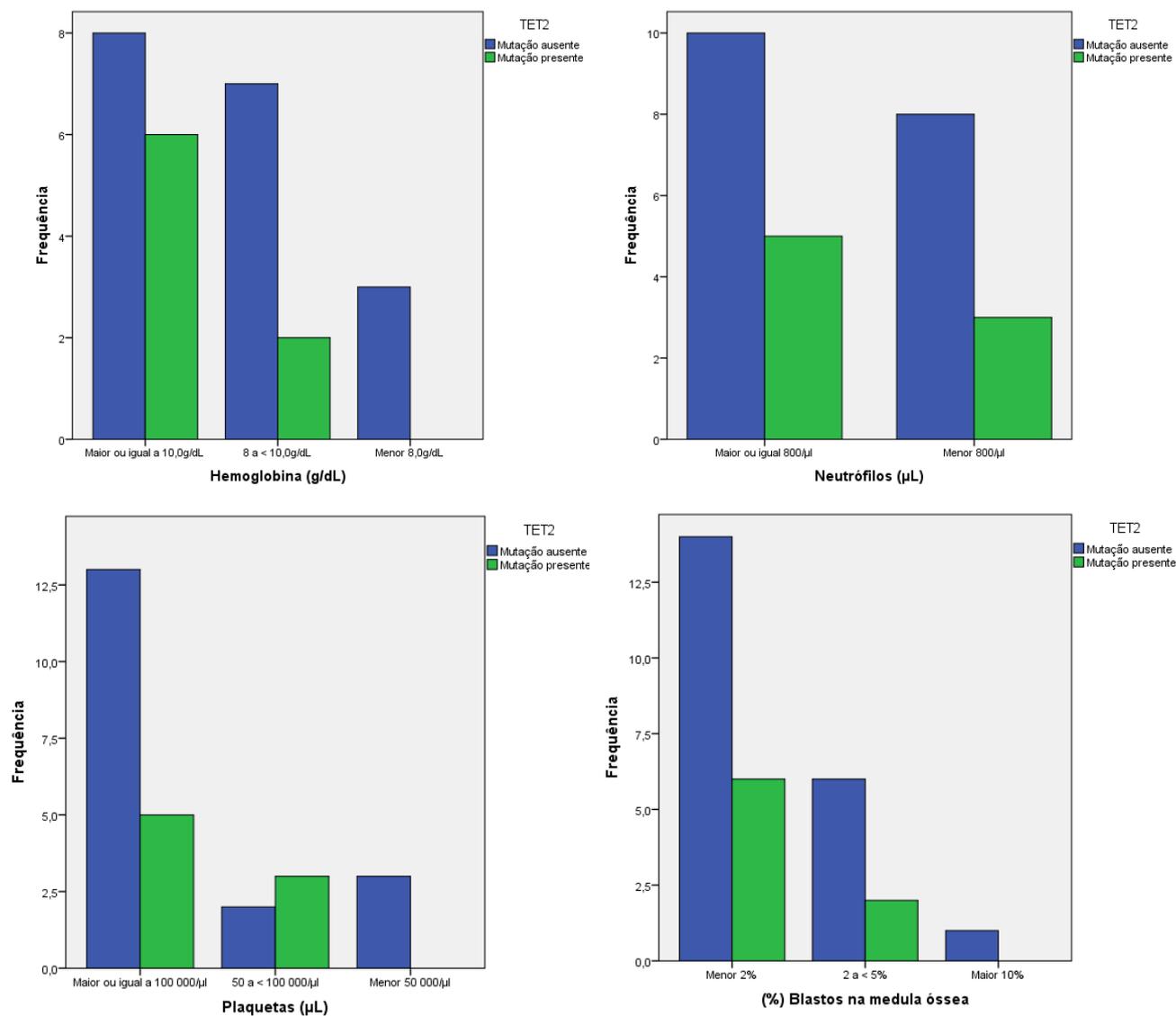


Figura 32. Associação entre *TET2* mutado e hemoglobina ($p=0,424$)*, neutrófilos ($p=0,543$)*, plaquetas ($p=0,176$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=1,0$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=32$).

*Teste Exato de Fisher.

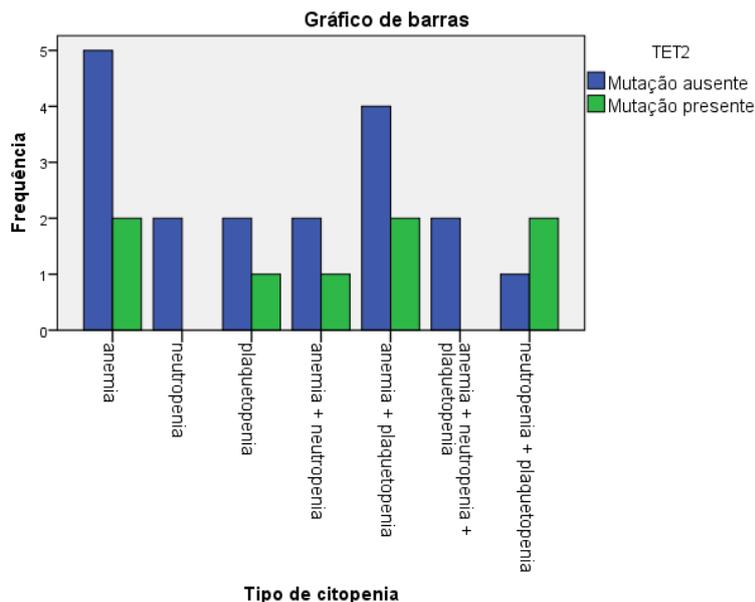


Figura 33. Associação entre *TET2* mutado e tipo de citopenia ($p=0,858$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=32$).

*Teste Exato de Fisher.

5.5 ANÁLISES DO GENE *XRCC1*

5.5.1 Análise do perfil epidemiológico e gene *XRCC1* mutado

Analizamos a associação entre *XRCC1* mutado e idade e sexo da população em estudo. A presença de mutação neste gene, assim como nos genes avaliados anteriormente, foi maior (61,9%) na faixa etária com idade superior a 60 anos ($p=0,258$) e maior no sexo feminino (57,1%) $p=1,0$ (Figura 34).

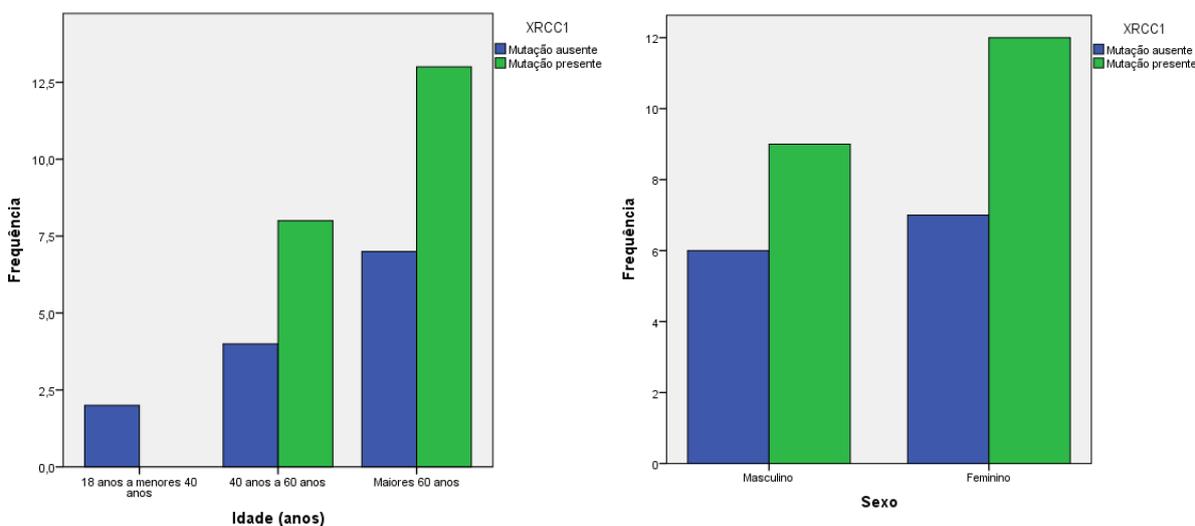


Figura 34. Associação entre *XRCC1* mutado e idade ($p=0,258$)* e sexo ($p=1,0$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

5.5.2 Análise do perfil laboratorial e gene *XRCC1* mutado

No total de casos analisados para este gene, 55,6% dos pacientes com presença de mutação possuíam Hb maior ou igual a 10,0g/dL ($p=0,63$); 66,7%, neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L ($p=0,243$); 66,7%, plaquetas maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=0,823$) e 61,1% dos casos com *XRCC1* mutado tinham porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2%, contudo esta associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,237$). Figura 35.

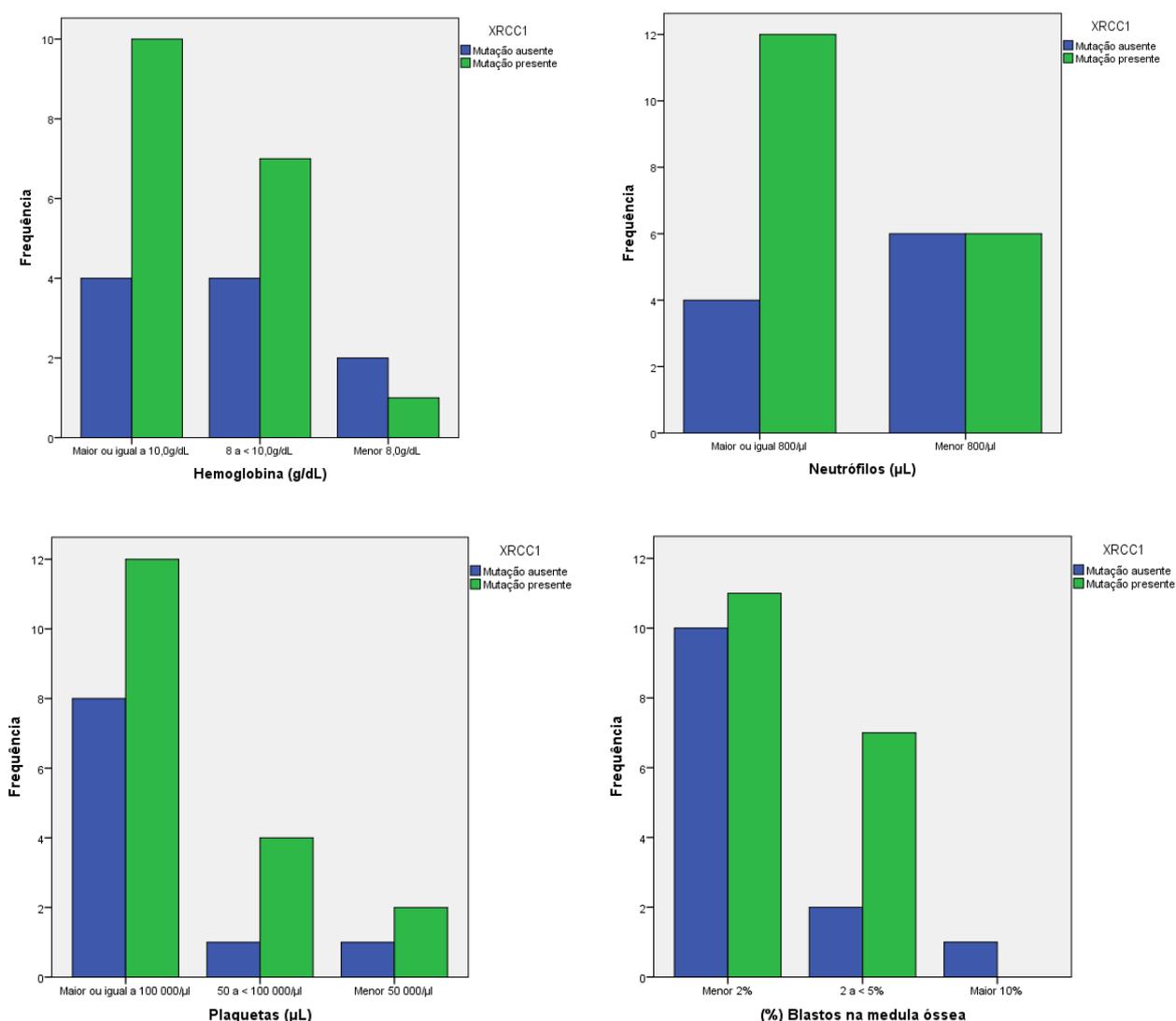


Figura 35. Associação entre *XRCC1* mutado e hemoglobina ($p=0,63$)*, neutrófilos ($p=0,243$)*, plaquetas ($p=0,823$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,237$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

A análise de associação entre a presença de *XRCC1* mutado e o tipo de citopenia também foi realizada. Anemia foi mais associada a este gene mutado (33,3%), contudo sem significância estatística ($p=0,236$). Figura 36.

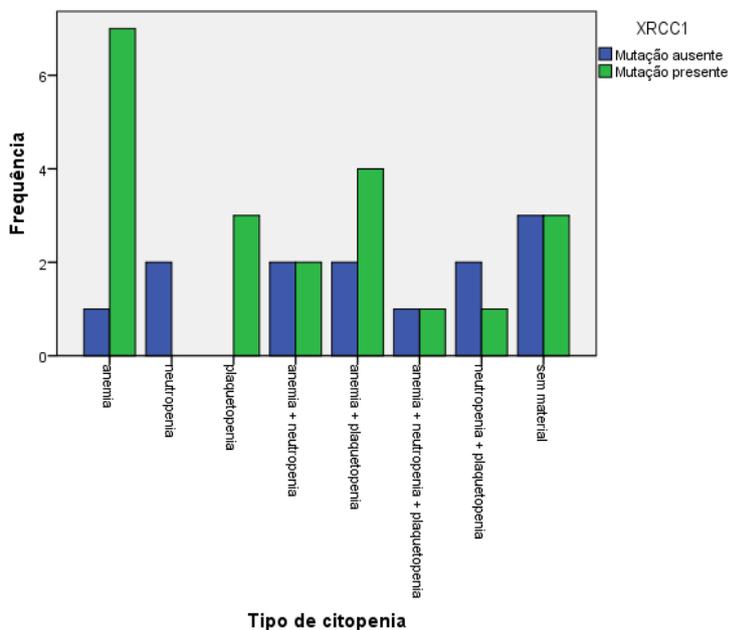


Figura 36. Associação entre *XRCC1* mutado e tipo de citopenia ($p=0,489$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

5.6 ANÁLISES DO GENE *OGG1*

5.6.1 Análise do perfil epidemiológico e gene *OGG1* mutado

Analisamos a associação entre *OGG1* mutado e idade e sexo da população em estudo. A presença de mutação neste gene foi mais associada às faixas etária, 40 a 60anos e maiores de 60 anos, com 44,4% dos casos para ambas ($p=0,366$). O sexo feminino (55,6%) foi mais frequente com este gene mutado ($p=0,640$). Figura 37.

5.6.2 Análise do perfil laboratorial e gene *OGG1* mutado

No total de casos analisados para este gene, 42,9% dos pacientes com presença de mutação possuíam Hb maior ou igual a 10,0g/dL e Hb entre 8,0g/dL e menor que 10,0g/dL ($p=1,0$); 85,7%, neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L ($p=0,091$); 71,4%, plaquetas maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=1,0$) e 66,7% dos casos com *OGG1*

mutado tinham porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2%, contudo esta associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,439$). Figura 38. O tipo de citopenia mais associada a este gene mutado foi anemia e a combinação, anemia e plaquetopenia, com 22,2% para ambas ($p=0,975$). Figura 39.

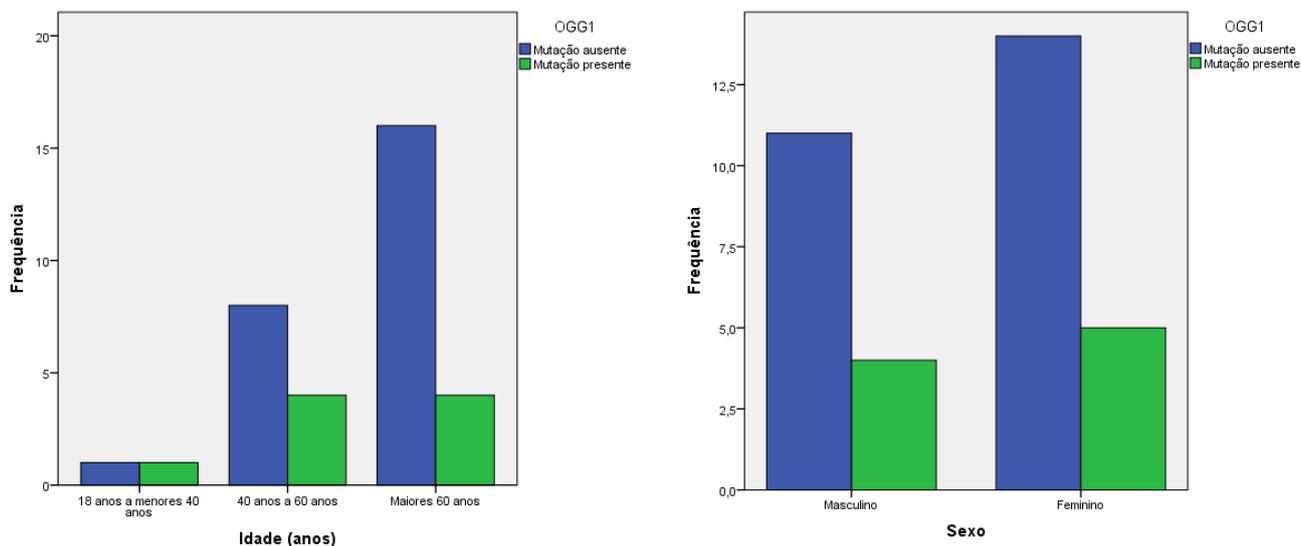


Figura 37. Associação entre *OGG1* mutado e idade ($p=0,366$)* e sexo ($p=0,640$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

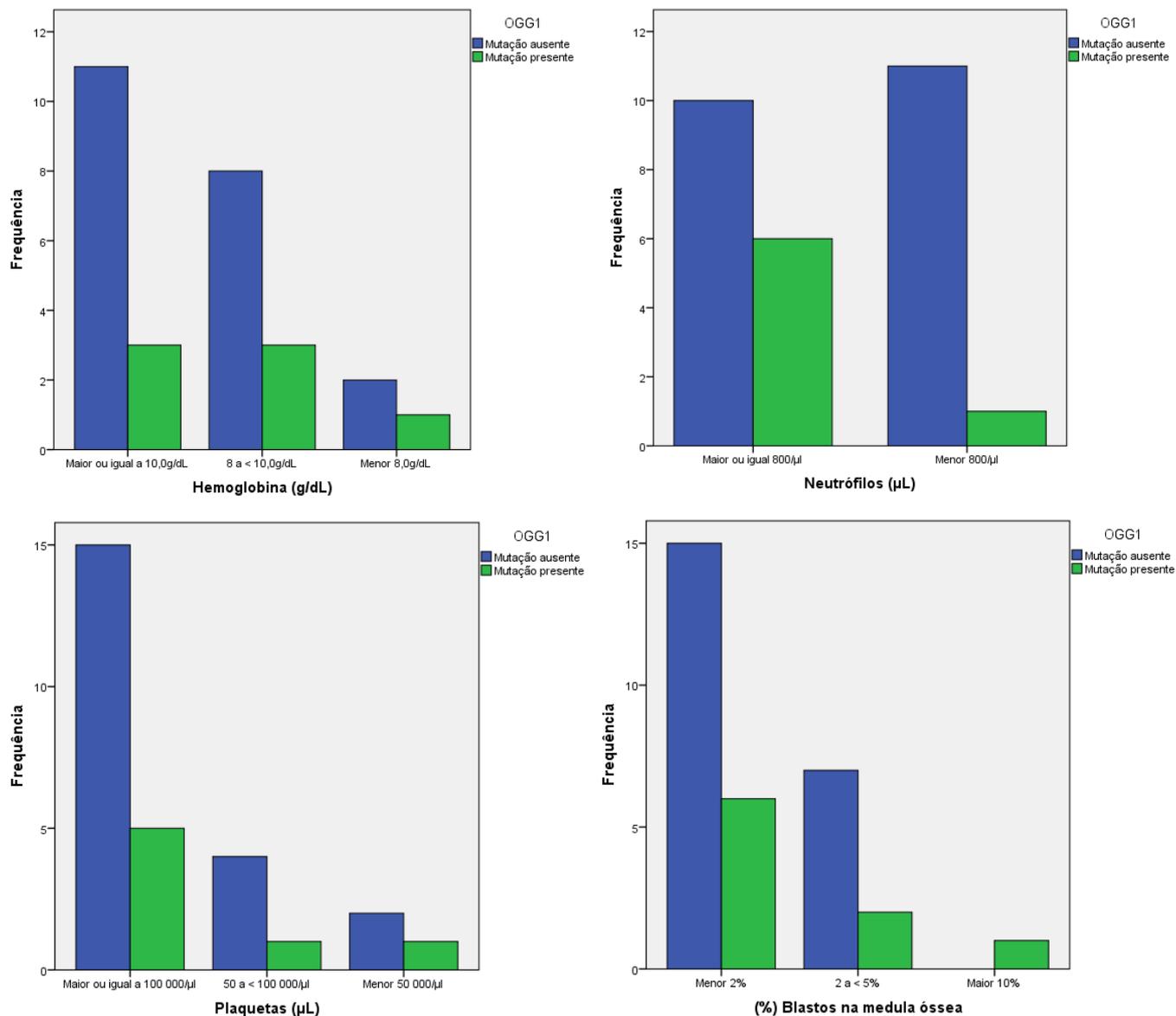


Figura 38. Associação entre *OGG1* mutado e hemoglobina ($p=1,0$)*, neutrófilos ($p=0,091$)*, plaquetas ($p=1,0$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,439$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

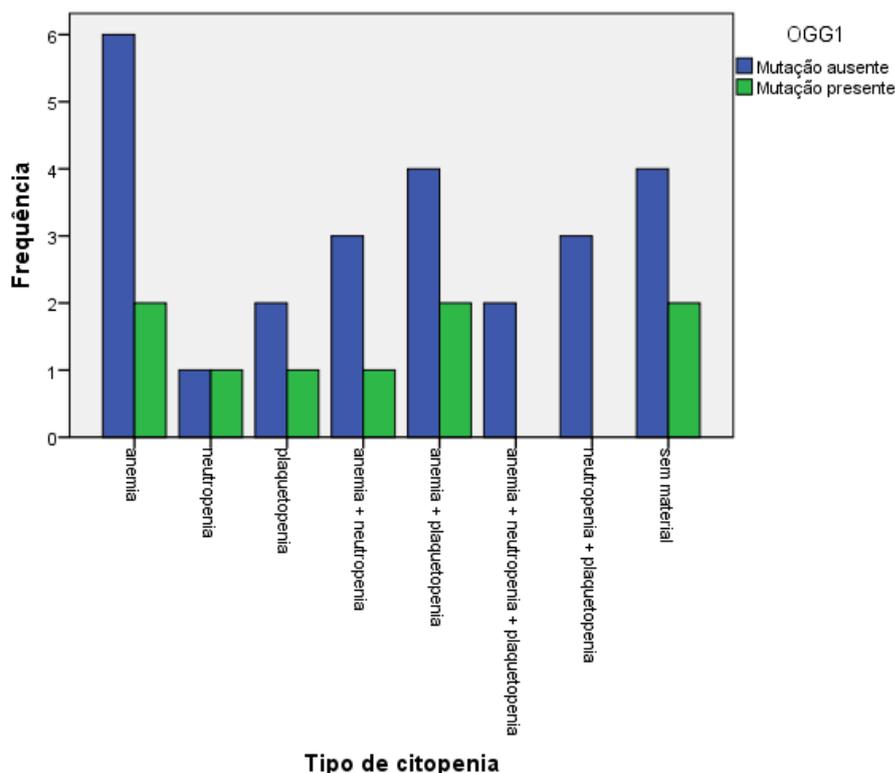


Figura 39. Associação entre *OGG1* mutado e tipo de citopenia ($p=0,975$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

5.7 ANÁLISES DO GENE *APEX1*

5.7.1 Análise do perfil epidemiológico e gene *APEX1* mutado

Analisamos a associação entre *APEX1* mutado e idade e sexo da população em estudo. A presença de mutação neste gene foi mais associada paciente com idade superior a 60 anos; 60,0% dos casos ($p=0,366$). O sexo feminino (55,0%) foi mais frequente com este gene mutado ($p=0,590$). Figura 40.

5.7.2 Análise do perfil laboratorial e gene *APEX1* mutado

No total de casos analisados para este gene, 50,0% dos pacientes com presença de mutação possuíam Hb maior ou igual a 10,0g/dL ($p=0,630$); 61,1%, neutrófilos maior ou igual a 800/ μ L ($p=0,430$); 72,2%, plaquetas maior ou igual a 100.000/ μ L ($p=0,583$) e 63,2% dos casos com *APEX1* mutado tinham porcentagem de blastos na medula óssea menor que 2%, contudo esta associação não foi

estatisticamente significativa ($p=0,225$). Figura 41. O tipo de citopenia mais associada a este gene mutado foi anemia com 25,0% dos casos ($p=0,701$). Figura 42.

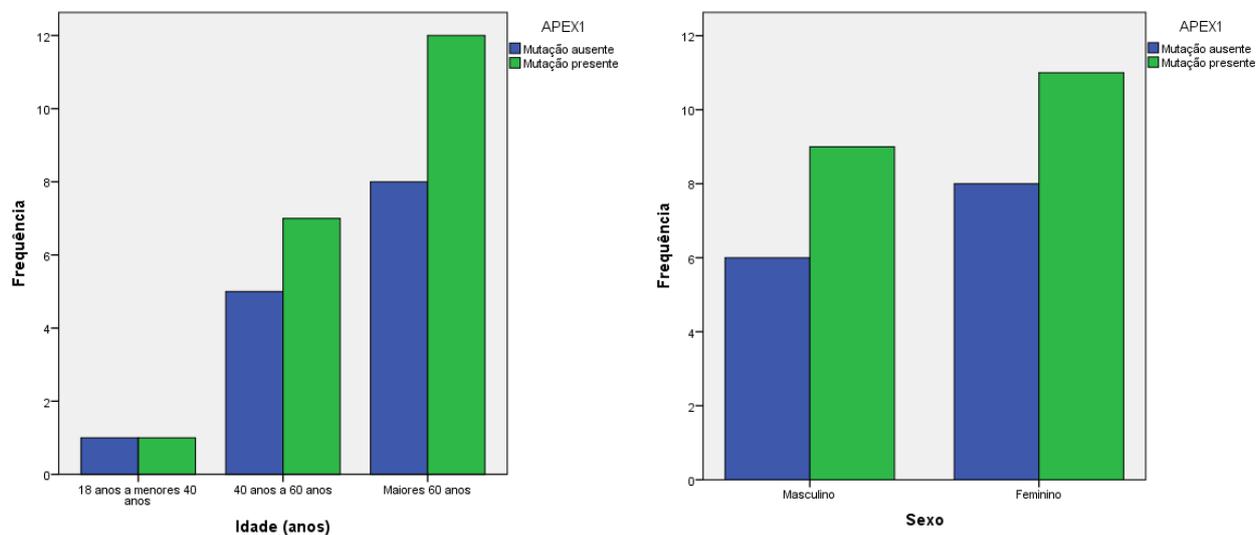


Figura 40. Associação entre *APEX1* mutado e idade ($p=1,0$)* e sexo ($p=0,590$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

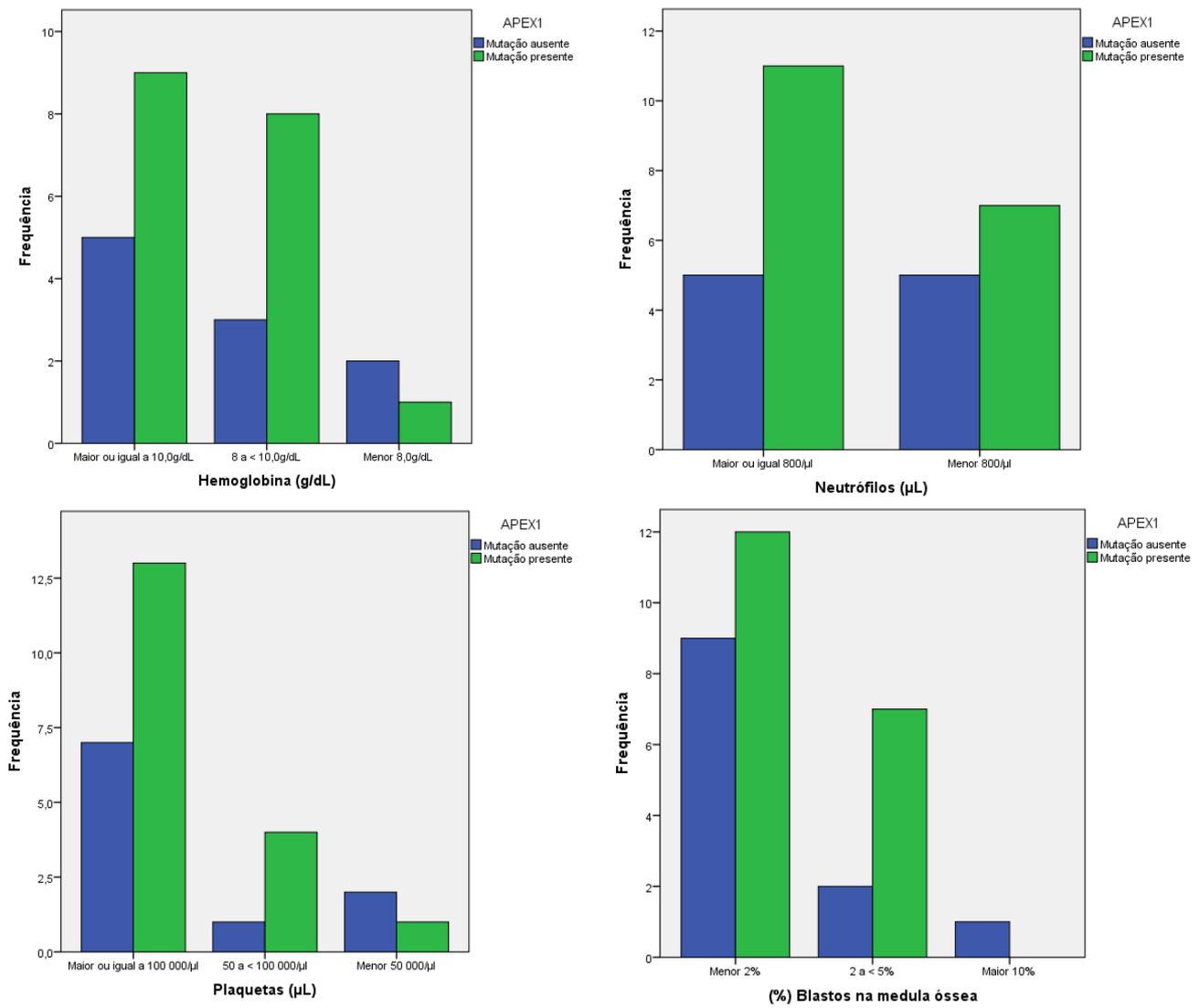


Figura 41. Associação entre *APEX1* mutado e hemoglobina ($p=0,630$)*, neutrófilos ($p=0,430$)*, plaquetas ($p=0,583$)* e porcentagem de blastos na medula óssea ($p=0,225$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

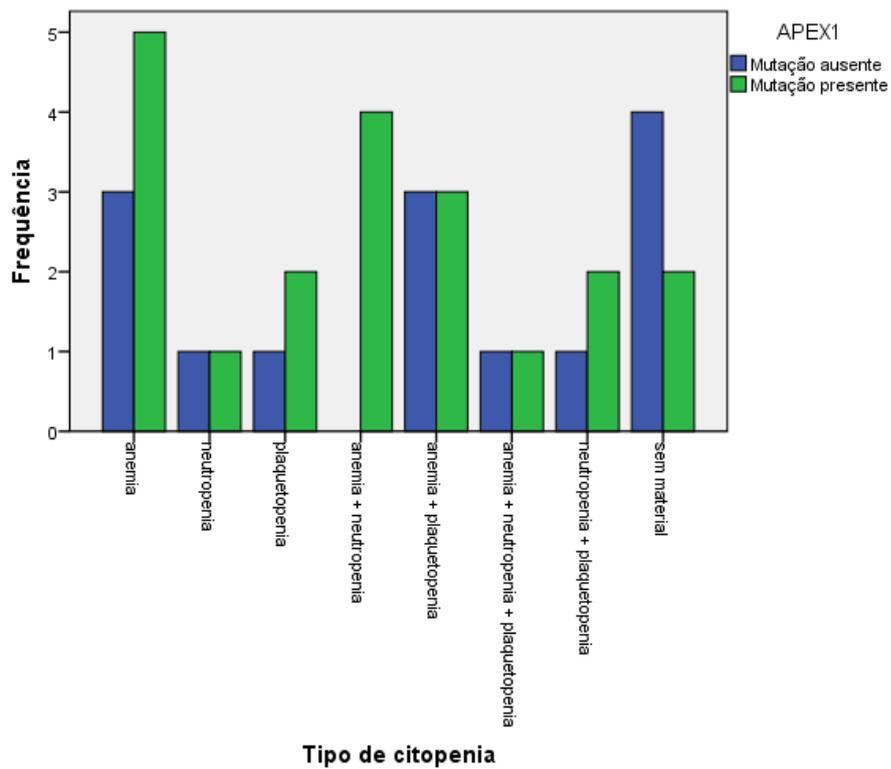


Figura 42. Associação entre *APEX1* mutado e tipo de citopenia ($p=0,701$)* no total de casos avaliados para este gene ($n=34$).

*Teste Exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

Observações Gerais

O uso em larga escala de técnicas de sequenciamento genômico no estudo do câncer, incluindo neoplasias mielóides, aumentou significativamente o número de mutações somáticas e germinativas identificadas e a possível relação destas mutações com a patogênese das doenças citadas.

Os estudos de sequenciamento genético resultaram na identificação de diversas mutações genéticas em síndrome mielodisplásica e em outras neoplasias mielóides. O avanço destes estudos contribuiu para a identificação de mutações em pacientes com citopenias sem displasia na medula óssea. Este fato gerou conceitos na área: citopenia clonal de significado indeterminado e hematopoiese clonal de potencial indeterminado.

No presente estudo foram incluídos 22 pacientes com citopenias sem critérios adicionais para o diagnóstico de síndrome mielodisplásica. A mediana de idade deste grupo foi 56 anos, em conformidade com estudos prévios nos quais a mediana de idade era menor quando comparada a pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (JAIN et al., 2017). Neste grupo de pacientes foram identificados 15 casos (68,2%) com mutações genéticas o que classifica estes pacientes como portadores de citopenia clonal de significado indeterminado (KWOK et al., 2015; SCHROEDER et al., 2010). A frequência de mutações em pacientes com citopenia clonal de significado indeterminado é maior quando comparada à população em geral; e o perfil de genes mutados são semelhantes ao perfil identificado em síndrome mielodisplásica, exceto por *SF3B1*, que raramente encontra-se mutado em pacientes sem displasia na medula óssea (FERNANDEZ et al., 2016; KIM et al., 2015). No presente trabalho o gene mais frequentemente mutado no grupo de pacientes com citopenias idiopáticas foi *U2AF1*, presente em 7 dos 15 pacientes deste grupo que apresentavam mutações. Este dado difere da literatura na qual a frequência deste gene mutado encontra-se em torno de 8% em dados extrapolados da análise em pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica (CAZZOLA et al., 2013). Adicionalmente identificamos mutação no gene *SF3B1* em dois pacientes deste grupo, dado raramente descrito em estudos prévios. A principal citopenia detectada neste grupo de pacientes foi a anemia, em

concordância com o que foi descrito previamente na literatura (SCHROEDER et al., 2010).

O risco de progressão de pacientes com *CCUS* para Síndrome Mielodisplásica ou Leucemia Mielóide Aguda é objeto de estudo de diversos autores. Schroeder et al. relataram transformação para LMA em dois casos de seus seis pacientes em análise retrospectiva. Fernandez et al. não identificaram nenhuma progressão para SMD ou LMA em sua coorte prospectiva (FERNANDEZ et al., 2016; SCHROEDER et al., 2010). Existe a possibilidade desta progressão estar relacionada com a carga de variância alélica, quanto maior a taxa, maior o risco de transformação para SMD e LMA (CARGO et al., 2015). O presente trabalho é um estudo de corte transversal e, portanto, não foi possível avaliar o seguimento destes pacientes com citopenia clonal de significado indeterminado e sua avaliação de progressão para SMD ou LMA.

Síndrome Mielodisplásica é uma doença clonal caracterizada por citopenias, displasia na medula óssea e risco de progressão para leucemia mielóide aguda. A frequência é maior em pacientes idosos, com média de idade de 70 anos e leve predominância no sexo masculino (ARBER et al., 2016). No nosso estudo foram incluídos 18 pacientes com diagnóstico de SMD, 10 pacientes do sexo masculino e 8 pacientes do sexo feminino, a maior parte com mais de 60 anos de idade (72,2%) e a mediana de idade foi 65 anos. Assim como dados previamente descritos houve a predominância de idosos do sexo masculino. Anemia geralmente é a principal citopenia detectada no hemograma destes pacientes e o principal sintoma clínico destes pacientes está relacionado aos graus variados de anemia. Alguns pacientes apresentam anemia leve a assintomática e outros demandam alta necessidade transfusional em consequência de anemia grave (ARBER et al., 2016; MALCOVATI et al., 2013). No presente estudo, o principal tipo de citopenia neste grupo também foi a anemia, sendo que a maior parte dos pacientes apresentaram citopenia em uma única linhagem celular. Dentre os pacientes com bicitopenia, a combinação anemia e plaquetopenia foi mais frequente no grupo SMD.

Incluimos na análise pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica/Síndrome Mieloproliferativa não classificada, que, pelos critérios WHO 2016, possuem características morfológicas e citogenéticas de ambas neoplasias mielóides (ARBER et al., 2016). SMD/SMP é um grupo de patologias relativamente raras e os dados relacionados à mesma geralmente são provenientes

de estudos de SMD nos quais habitualmente são incluídos casos. Diante disto, consideramos de grande importância a avaliação dos cinco casos com esta patologia incluídos neste estudo. Os mesmos foram caracterizados como SMD/SMP não classificada seguindo critérios WHO, 2016. A mediana de idade destes pacientes foi a maior em relação aos grupos anteriores, 82 anos e as mulheres formam a maior parte do grupo. A ocorrência de bicitopenia (anemia e plaquetopenia) foi mais comum neste grupo, assim como os níveis de citopenias como, por exemplo, anemia mais grave também foi identificada neste perfil de pacientes. Esses dados podem representar características laboratoriais que indicam maior gravidade clínica neste grupo.

Citogenética e Biologia Molecular

Inúmeros autores já descreveram a capacidade de técnicas de biologia molecular ampliar a detecção de clonalidade nas neoplasias mielóides, incluindo Síndrome Mielodisplásica, através de sequenciamento e pesquisa de mutações nos principais genes envolvidos nas neoplasias mielóides. (MALCOVATI et al., 2013, PAPAEMMANUIL et al., 2013). Neste estudo houve uma grande discrepância entre pacientes com identificação de pelo menos um gene mutado e ausência de alteração clonal detectada pelo exame de cariótipo da medula óssea. A frequência de citogenética alterada foi de apenas sete (14,9%) pacientes e vinte e seis (55,3%) apresentaram cariótipo normal. Vinte e um pacientes (61,76%) com pelo menos um gene mutado, apresentavam cariótipo normal e três casos (23%) dos treze pacientes, nos quais não foram identificadas mutações, tinham cariótipo com alguma alteração cromossômica. Este dado mostra a importância da biologia molecular nas neoplasias mielóides, incluindo Síndrome Mielodisplásica. É importante ressaltar que quatorze (29,8%) casos não foram avaliados com dados citogenéticos por falta de material ou resultados inconclusivos, isto implicou em uma não classificação de escore prognóstico de seis (33,3%) de pacientes com diagnóstico de SMD. Este resultado tem grande importância na prática clínica visto que, o adequado tratamento de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica depende de sua classificação nos escores prognósticos.

Análises da presença de mutações

A presença de pelo menos um gene mutado foi maior em pacientes com idade superior a 60 anos, o que está provavelmente relacionado a mediana de idade elevada dos pacientes com diagnóstico de SMD (CAZZOLA et al., 2013). A

presença de pelo menos um gene mutado foi maior no grupo com diagnóstico de SMD o que corrobora dados previamente publicados de evolução clonal e aquisição de mutações até o desenvolvimento e diagnóstico de neoplasias mielóides (LINDSLEY et al., 2013). No nosso trabalho, a presença de pelo menos um gene mutado esteve mais associada a graus leves de citopenia como hemoglobina maior ou igual a 10g/dL e ainda contagem de blastos na medula óssea menor que 2%. Este resultado, apesar de estatisticamente significativo, pode estar relacionado ao pequeno número de pacientes avaliados e a maior frequência de citopenias leves no grupo estudado.

Mutações em genes relacionados a mecanismos de *splicing* DNA: *SF3B1* e *U2AF1*

Mutações nos genes da maquinaria do *splicing* são frequentes em eventos iniciais na síndrome mielodisplásica e em outras neoplasias mielóides. Os principais genes mutados são *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* e *ZRSR2*, presentes em aproximadamente 22%, 11%, 8% e 5% dos casos de SMD respectivamente. Estas mutações são descritas como eventos iniciais na patogênese da SMD e são alvos de diversos estudos para avaliação de prognóstico e desenvolvimento de terapias alvo para SMD e outras neoplasias mielóides. Mutações nestes genes estão presentes em citopenia clonal de significado indeterminado, LMA secundária à SMD e LMA *de novo*, SMD/SMP e neoplasia mieloproliferativas como a Mielofibrose Primária. Essas mutações são, em sua maioria, mutuamente excludentes e estão relacionadas à apresentação fenotípica e evolução prognóstica nos pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica. O gene *SF3B1* está relacionado a presença de sideroblastos em anel na medula óssea, citogenética de baixo risco e evolução favorável. Já *SRSF2* e *U2AF1* estão relacionados com citogenética de alto risco, alta taxa de transformação para leucemia mielóide aguda e consequente evolução desfavorável. *U2AF1* também é frequentemente encontrado na LMA secundária o que corrobora sua participação na patogênese e evolução clonal da SMD. Mutações no gene *ZRSR2* ainda não foram associadas à evolução clínica destes pacientes (YOSHIDA et al., 2011; CAZZOLA et al., 2013; TEFFERI et al., 2018; GRAUBERT et al., 2012). *SRSF2* mutado também está muito associado à Leucemia Mielomonocítica Crônica (ITZYKSON et al., 2013). Terapias alvo-específicas seguem em desenvolvimento para o tratamento de SMD e outras

neoplasias mielóides, um exemplo é o estudo de molécula inibidora do *SF3B1* (BUONAMICI et al., 2016).

No presente trabalho foram avaliadas mutações nos genes *SF3B1* e *U2AF1* e a frequência de mutações encontradas divergiu dos dados previamente publicados com base em populações norte-americanas e europeias. Em nosso trabalho apenas três (6,7%) pacientes apresentaram *SF3B1* mutado, dois casos de *CCUS* e um caso de *SMD*. Um paciente com diagnóstico de *SMD* e *SF3B1* mutado também apresentou mutação no gene *U2AF1*, fato raro, contudo já descrito em estudo prévio (MIAN et al., 2013). Não é sabido se a co-mutação com *U2AF1* anula ou diminui o bom prognóstico associado ao *SF3B1* mutado.

O gene *U2AF1* mutado foi detectado em 10 casos (31,2%): 7 *CCUS* e 3 *SMD*. Coorte brasileira prévia com 91 pacientes com diagnóstico de *SMD* detectou 7,0% de casos com *SF3B1* mutados e houve relação estatisticamente significativa com a presença de sideroblastos em anel na medula óssea (DONAIRES et al., 2016). Este resultado aproxima-se do resultado encontrado em nosso estudo, 5,5% *SF3B1* mutado em *SMD* e difere de dados da literatura em que a frequência de mutações neste gene variam de 15 a 30% em *SMD* o que pode representar uma diferença por questões étnicas populacionais. Uma coorte com número amostral maior é necessária para avaliação pormenorizada desta hipótese, além de avaliação conjunta com mutações genéticas relacionadas a padrões étnicos distintos.

Diferenças em relação à frequência de subtipos *SMD*, evolução clínica e prognóstico já foram descritas em estudo que comparou população japonesa e alemã com *SMD*. Pacientes japoneses com *SMD* são mais jovens e evoluem de forma mais favorável quando comparados à população alemã (MATSUDA et al., 2005). Neste estudo não foram avaliadas perfil de mutações genéticas, contudo estas distinções relatadas corroboram com a hipótese de que diferenças étnicas influenciam a apresentação clínica da *SMD* e, conseqüentemente, podem influenciar também o perfil de mutações.

Mutações em genes relacionados a epigenética: *TET2*, *IDH1* e *IDH2*

Mutações em genes envolvidos na epigenética são bastante comuns em síndrome mielodisplásica e outras neoplasias mielóides, principalmente a leucemia mielomonocítica crônica. Os principais genes mutados são em ordem decrescente de frequência em *SMD* são: *TET2* (21%), *ASXL1* (14%), *DNMT3A* (8%), *EZH2* (6%) e *IDH1/2* (5%). Estas frequências podem variar de acordo com referências na

literatura. Assim como os genes envolvidos no *splicing* de DNA, mutações nos genes relacionados a epigenética são eventos iniciais na patogênese da SMD. A presença de *TET2* mutado em SMD pode não estar relacionada com a sobrevida global, contudo pode predizer resposta aos agentes hipometilantes. Esta mutação encontra-se presente em 50 a 60% dos pacientes com diagnóstico de LMMC, nos quais está relacionada à evolução desfavorável e a pior prognóstico. Mutações nos genes *IDH1/2* estão associadas à citogenética de alto risco e evolução desfavorável, com altas taxas de transformação para LMA. (CAZZOLA et al., 2013; KOSMIDER et al., 2009; SHAHRABI et al., 2016). Em casos novos de LMA secundária pode-se diagnosticar 10 a 15% de *IDH 1/2* mutados. Esta mutação está relacionada a evolução de pior prognóstico e baixa sobrevida global na SMD independente de escores de fatores de risco vigentes como o *IPSS-R* (LIN et al., 2018). Um inibidor de *IDH1/2*, droga denominada enasidenib, foi aprovada recentemente pelo FDA para tratamento de LMA refratária e recaída com *IDH2* mutado. A aprovação desta medicação reafirma a importância da pesquisa de potenciais mutações para possibilidades de terapias-alvo em neoplasias mielóides, inclusive em cenários de péssimo prognóstico como em LMA refratária e recaída, com boas taxas de resposta global para a situação clínica. (NASSEREDDINE et al., 2017).

No presente estudo encontramos um total de 9 casos (28,1%) com *TET2* mutado. Destes, cinco pacientes com diagnóstico de SMD, três pacientes com *CCUS* e um paciente com SMD/SMP. A frequência deste gene mutado no grupo SMD foi semelhante a taxa descrita na literatura que varia de 20 a 30% de acordo com diferentes referências (CAZZOLA et al., 2013; BEJAR et al., 2013; ISSA et al., 2013; ITZYKSON et al., 2013). Não foi possível avaliar associação com resposta aos hipometilantes devido ao desenho geral do estudo e, conseqüentemente, o não seguimento dos pacientes analisados. Trabalho futuro em planejamento deverá seguir e avaliar a evolução clínica dos casos. Estudos com populações asiáticas também relatam frequência de *TET2* mutado em SMD e outras neoplasias mielóides conforme frequência descrita previamente com base em estudos norte americanos e europeus. WANG et al., 2013 identificou *TET2* mudado em 23% dos casos em coorte com 153 pacientes chineses portadores de SMD e para estes, houve associação com melhor sobrevida global.

A frequência de mutações no gene *IDH2* foi 6,2%, com dois casos no grupo de citopenias. Os dois pacientes apresentaram co-mutações: um caso com *SF3B1*,

XRCC1 e *OGG1* e o segundo, co-mutado com *U2AF1* e *XRCC1*. Nenhuma mutação no gene *IDH1* foi detectada nos 32 casos selecionados. Mais estudos são necessários para avaliação destas mutações nos pacientes com diagnóstico de CCUS e taxa de risco para evolução para SMD e LMA.

Mutações em genes relacionados a mecanismos de reparo: *TP53*, *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1*

Mutações no gene *TP53* são bastante comuns em tumores sólidos e estão associadas a pior prognóstico. Em neoplasias mielóides como LMA estas mutações neste gene também estão bem descritas e, assim como para as neoplasias sólidas, também estão associadas a evolução desfavorável. O *TP53* encontra-se mutado em aproximadamente 5% dos casos de SMD, está associado à doença avançada e à citogenética de alto risco (cariótipo complexo), presente em cerca de 20% dos casos de SMD com del(5q), nos quais anula a resposta ao tratamento com lenalidomida. Mutação neste gene está fortemente associado a baixa sobrevida global a altíssimo risco de progressão para LMA (BIEGING et al., 2014; CAZZOLA et al., 2013; RIVLIN et al., 2011; WANG et al., 2017). No presente estudo foram identificados três casos com *TP53* mutado, um caso no grupo citopenias e dois casos com diagnóstico de SMD. Um paciente com SMD apresenta cariótipo complexo, co-mutação com *XRCC1*, 2% de blastos na medula óssea e *IPSS-R* muito alto risco. O segundo paciente com SMD possui cariótipo normal, co-mutação com *APEX1*, 0% de blastos na medula óssea e *IPSS-R* baixo risco. O terceiro e último caso com *TP53* mutado está no grupo de citopenias, possui cariótipo normal, 3% de blastos na medula óssea e co-mutação com *TET2*, *XRCC1* e *OGG1*. O pequeno número de amostras foi fator limitante neste trabalho. Um estudo prospectivo com número maior de pacientes é necessário para avaliação deste gene mutado e o desfecho destes casos, principalmente no caso do grupo citopenias e em co-mutação com mais três genes, um deles bem descrito em neoplasias mielóides, *TET2*.

Mutações nos genes de reparo *XRCC1*, *APEX1* e *OGG1* já foram descritas previamente na literatura em neoplasias sólidas como neoplasias do trato biliar e colorretal (BOITEUX et al., 2000; KOHNO et al., 1998; WEISS et al., 2005). Existem alguns trabalhos com análises de mutações destes genes em SMD e associação com formas avançadas da doença e citogenética de alto risco (AKTUĞLU et al., 2014; BSNESCU et al., 2014; EL-DIN et al., 2012; JOSEPH et al., 2005). Diante da

possibilidade de alterações no mecanismo de reparo como possibilidade na patogênese de neoplasias mielóides, foi optado pela pesquisa de mutações nos mesmos na população do estudo, incluindo pacientes com citopenias, sem critérios diagnósticos de SMD. Neste trabalho encontramos uma alta frequência de mutações nestes genes no grupo total de pacientes e nos subgrupos diagnósticos, inclusive nos pacientes com *CCUS*, contudo não identificamos associação estatisticamente significativa entre a presença de mutações nos mesmos e fatores de mau prognóstico, como citogenética de alto risco e alta porcentagem de blastos na medula óssea. Resultado de relevância deste trabalho foi a alta frequência de mutações deste grupo de genes em pacientes com citopenias sem critérios para diagnósticos de SMD. A relevância clínica e importância prognóstica deste resultado para avaliação de sua associação com progressão para SMD ou LMA é incerta e necessita de estudos prospectivos para sua avaliação.

Principal limitação

O presente trabalho possui como principal limitação a não realização do sequenciamento de todo o gene em estudo através de plataformas de sequenciamento de alta resolução. No nosso estudo, nós realizamos a avaliação de *hotspots* para cada um dos nove genes avaliados, conforme descritos na literatura.

7 CONCLUSÕES

O perfil de mutações nos genes avaliados neste trabalho apresentou frequência diferente em relação a dados previamente publicados em relação aos genes *SF3B1* e *U2AF1*, fato potencialmente relacionado com diferenças étnicas populacionais da amostra estudada. Estudo maior em conjunto com serviços de Hematologia das diferentes regiões do país se faz necessário para melhor avaliação do perfil de mutações em pacientes com neoplasias mielóides no nosso país.

A frequência alta de mutações germinativas nos genes de reparo: *XRCC1*, *OGG1* e *APEX1*, no grupo total de pacientes e subgrupos diagnósticos, foi um resultado relevante do presente trabalho e chama a atenção a presença destas mutações no grupo de pacientes com citopenia clonal de significado indeterminado. Estudos adicionais são necessários para melhor avaliação deste resultado e suas implicações em evolução prognóstica.

O diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica é um grande desafio para o médico hematologista, que necessita de diversas ferramentas diagnósticas para exclusão de inúmeras causas de citopenias. A quantidade de resultados inconclusivos da avaliação citogenética dos pacientes é fato preocupante na condução destes casos diante da falta de classificação de risco prognóstico que isto gera e, conseqüentemente, o tratamento e seguimento inadequado destes pacientes. É imperativo que se busquem melhorias no âmbito de apoio, com ferramentas diagnósticas para esta patologia de tão difícil manejo, e que apresenta crescente incidência diante do envelhecimento da população brasileira.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, O. et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. **Blood**, v. 114, p. 144-147, 2009.
- AKTUĞLU, M.B. et al. Investigation of DNA repair gene variants on myelodysplastic syndromes in a Turkish population. **Med. Oncol.**, v. 31, p. 174, 2014.
- ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, p. 2391–2405, 2016.
- BAIN, B.J. Problems in the morphological diagnosis of MDS. SATELLITE SYMPOSIUM: AN EVOLUTION IN THE UNDERSTANDING OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES, 6. 2006, Amsterdam, Netherlands. European Society for Hematology, 2006.
- BARTTLET, J.M.S.; WHITE, A. **Extraction of DNA from whole blood. Methods in Molecular Biology. PCR protocols**. 2. ed. Totawa (NJ): Humana Press Inc; 2003. 29 p.
- BEJAR, R. et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl. J. Med.**, v. 364, n. 26, p. 2496-2506, 2011.
- BEJAR, R. et al. Nextgeneration sequencing of 213 MDS patient samples identifies mutation profiles associated with response to hypomethylating agents and overall survival [abstract]. **Leukemia Res.**, v. 37, Suppl 1, p. 519-520, 2013.
- BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B.L. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 5, p. 504-515, 2011.
- BIEGING, K.T.; MELLO, S.S.; ATTARDI, L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359-370, 2014.
- BOITEUX, S.; RADICELLA, J.P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 377, p. 1-8, 2000.
- BSNESCU, C.; TRIFA, A.P.; DEMIAN, S. Polymorphism of XRCC1, XRCC3, and XPD genes and risk of chronic myeloid leukemia. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 213790, 2014.
- BUONAMICI, S. et al. H3B-8800, an Orally Bioavailable Modulator of the SF3b Complex, Shows Efficacy in Spliceosome-Mutant Myeloid Malignancies. **Blood**, v. 128, p. 966, 2016.

BUSQUE, L. et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. **Blood**, v. 88, p. 59–65, 1996.

CARGO, C.A. et al. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. **Blood**, v. 126, n. 21, p. 2362-2365, 2015.

BELLI, C. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **Am. J. Hematol.**, v. 90, n. 10, p. 851-858, 2015.

CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, MG.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v. 122, p. 4021-4034, 2013.

CAZZOLA, M.; ROSSI, M.; MALCOVATI, L. Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 121, n. 2, p. 260-269, 2013.

CHAMPION, K.M. et al. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 97, p. 920–926, 1997.

COREY, S.J. et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 7, n. 2, p. 118–129, 2007.

DAMM, F. et al. Groupe Francophone des Myelodysplasies. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3211-3218, 2012.

DELHOMMEAU, F. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, n. 22, p. 2289-2301, 2009.

DELLA PORTA, M.G. et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 29, n. 1, p. 66-75, 2015.

DONAIRES, F.S. et al. Splicing factor SF3B1 mutations and ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes: a Brazilian cohort screening study. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 38, n. 4, p. 320-324, 2016.

EL-DIN, M.S. et al. Detection of XRCC1 gene polymorphisms in Egyptian patients with acute myeloid leukemia. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 21, n. 5, p. 505–513, 2012.

FERNANDEZ, P.S. et al. Significance of myelodysplastic syndrome associated somatic variants in the evaluation of patients with pancytopenia and idiopathic cytopenias of undetermined significance. **Mod. Pathol.**, v. 29, p. 996–1003, 2016.

GENOVESE, G. et al. Clonal hematopoiesis and blood cancer risk inferred from blood DNA sequence. **N. Engl. J. Med.**, v. 371, p. 2477–2487, 2014.

GOEL, S. et al. High prevalence and allele burden-independent prognostic importance of p53 mutations in an inner-city MDS/AML cohort. **Leukemia**, v. 30, n. 8, p. 1793-1795, 2016.

GRAUBERT, T.A. et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. **Nat. Genet.**, v. 44, n. 1, p. 53-57, 2011.

GREENBERG, P.L. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-2088, 1997.

GREENBERG, P.L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.

HEUSER, M.; THOL, F.; GANSER, A. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. A Risk Factor for Hematologic Neoplasms. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 113, n. 18, p. 317–322, 2016.

HOWLADER, N. et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014. Acesso em 17 mai. 2018.

ISSA, J.P. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3811-3817, 2013.

ITZYKSON, R. et al; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. **Leukemia**, v. 5, n. 7, p. 1147-1152, 2011.

ITZYKSON, R. et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. **Blood**, v. 121, n. 12, p. 2186-2198, 2013.

JAIN, M.; TRIPATHI, A.A. ICUS/CCUS/CHIP: basics & beyond. **Expert. Rev. Hematol.**, v. 10, p. 915-920, 2017.

JAISWAL, S. et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. **N. Engl. J. Med.**, v. 371, p. 2488–2498, 2014.

JANKOWSKA, A.M. et al. Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 22, p. 551–558, 2008.

JOSEPH, T. et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Lett.**, v. 217, n. 1, p. 17–24, 2005.

JOSHI, D. et al. Association of XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg280His) gene polymorphisms in myelodysplastic syndrome. **Ann. Hematol.**, v. 95, n. 1, p. 79-85, 2016.

KIM, H.B. et al. Clinical implications of APEX1 and Jagged1 as chemoresistance factors in biliary tract cancer. **Ann. Surg. Treat. Res.**, v. 92, n. 1, p. 15-22, 2017.

KIM, M.H. et al. Colon cancer progression is driven by APEX1-mediated upregulation of Jagged. **J. Clin. Invest.**, pii: 65521, 2013.

KIM, S.Y. et al. Multi-gene mutational analysis of myelodysplastic syndrome and idiopathic cytopenia of undetermined significance in Korean patients [Abstract 158]. **Leuk. Res.**, v. 39, p. S81, 2015.

KOHNO, T. et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. **Oncogene**, v. 16, p. 3219–3225, 1998.

KOSMIDER, O. et al: TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. **Haematologica**, v. 94, p. 1676-1681, 2009.

KULASEKARARAJ, A.G. et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. **Br. J. Haematol.**, v. 160, n. 5, p. 660-72, 2013.

KWOK, B. et al. MDS- associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. **Blood**, v. 126, p. 2355-2361, 2015.

LANGEMEIJER, S.M. et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. **Nat. Genet.**, v. 41, n. 7, p. 838-842, 2009.

LARSSON, C.A.; COTE, G.; QUINTÁS-CARDAMA, A. The Changing Mutational Landscape of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. **Mol. Cancer. Res.**, v. 11, n. 8, p. 815-827, 2013.

- LIN, P. et al. Isocitrate dehydrogenase 2 mutations correlate with leukemic transformation and are predicted by 2-hydroxyglutarate in myelodysplastic syndromes. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol.**, v. 144, n. 6, p. 1037-1047, 2018.
- LINDSLEY, R.C.; EBERT, B.L. The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. **Blood**, v. 6, p. 741-748, 2013.
- MAKISHIMA, H. et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 36, p. 6109-6116, 2009.
- MAKISHIMA, H. et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3203-3210, 2012.
- MALCOVATI, L. et al; European Leukemia Net. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 122, n. 17, p. 2943-2964, 2013.
- MALCOVATI, L. et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6239-6246, 2011.
- MATSUDA, A. et al. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 106, p. 2633-2640, 2005.
- MCKENNEY, A.S. et al. JAK2/IDH-mutant-driven myeloproliferative neoplasm is sensitive to combined targeted inhibition. **J. Clin. Invest.**, v. 128, n. 2, p. 789-804, 2018.
- MIAN, S.A. et al.
Spliceosome mutations exhibit specific associations with epigenetic modifiers and proto-oncogenes mutated in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 98, n. 7, p. 1058-1066, 2013.
- MUFTI, G.J. et al. Minimal diagnostic criteria and differential diagnosis of MDS: IWGM-MDS consensus proposal for identification of idiopathic cytopenia of uncertain significance (ICUS). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYELODYSPLASTIC SYNDROMES, 9., 2007, Florence, Italy, 2007. p 5.
- MULLIGHAN, C.G. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 766-767, 2009.

NASSEREDDINE, S. et al. The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia. **Ann. Hematol.**, v. 96, n. 12, p. 1983-1991, 2017.

OK, C.Y. et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. **J. Hematol. Oncol.**, v. 8, p. 45, 2015.

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.**, v. 365, n. 15, p. 1384-1395, 2011.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of gene mutations in MDS [abstract]. **Leuk. Res.**, v. 37, p. S9, 2013.

PATEL, J.P. et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 12, p. 1079-1089, 2012.

PATNAIK, M.M. et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients. **Leukemia**, v. 26, n. 1, p. 101-105, 2012.

RIVLIN, N. et al. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes Cancer**, v. 2, n. 4, p. 466-474, 2011.

ROLLISON, D.E. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. **Blood**, v. 112, p. 45–52, 2008.

RONEN, A.; GLICKMAN, B.W. Human DNA repair genes. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 37, n. 3, p. 241–283, 2001.

SALLMAN, D.A. et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 30, n. 3, p. 666-673, 2016.

SCHROEDER, T. et al. Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients. **Ann. Oncol.**, v. 21, n. 11, p. 2267-2271, 2010.

SINGH, R.K.; COOPER, T.A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. **Trends. Mol. Med.**, v. 18, p. 472–482, 2012.

SMITH, A.E. et al: Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3923-3932, 2010.

STEENSMA, D.P. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 126, p. 9-16, 2015.

STROM, S.S. et al. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. **Leukemia**, v. 19, n. 11, p. 1912-1918, 2005.

SWERDLOW, S.H. et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4. ed. Lyon: IARC; 2008.

TEFFERI, A. et al. U2AF1 mutation variants in myelodysplastic syndromes and their clinical correlates. **Am. J. Hematol.**, v. 93, n. 6, p. E146-E148, 2018.

THOL, F. et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 116, p. 614–616, 2010.

THOL, F. et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3578-3584, 2012.

VODICKA, P. et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 657-664, 2007.

WALTER, M.J. et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 27, n. 6, p. 1275-1282, 2013.

WANG, N. et al. IDH1 Mutation Is an Independent Inferior Prognostic Indicator for Patients with Myelodysplastic Syndromes. **Acta. Haematol.**, v. 138, n. 3, p. 143-151, 2017.

WANG, W.; ROUTBORT, M.J.; TANG, Z. Characterization of TP53 mutations in low-grade myelodysplastic syndromes and myelodysplastic syndromes with a non-complex karyotype. **Eur. J. Haematol.**, v. 99, n. 6, p. 536-543, 2017.

WEBB, C.J.; WISE, J.A. The splicing factor U2AF small subunit is functionally Conserved between Fission Yeast and Humans. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 10, p. 4229-4240, 2004.

WEISS, J.M. et al. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. **Mol. Carcinog.**, v. 42, p. 127-141, 2005.

YOSHIDA, K. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 64-69, 2011.

ZHOU, T. et al. Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 966-989, 2015.

ANEXO

Tabela 1. Fragmentos amplificados para cada gene do estudo

Gene	Fragmento estudado Sequência 5'- 3'
SF3B1	TTACCAACTCATGACTGTCC; ACATAGTAAGACCCTGTCTC; TAGGTAATGTTGGGGCATAG; ATAGCCTTCAAGAAAGCAGC
TET2	CACCTGCAAGCTGTGATAA; GCTGCCAGACTCAAGATTT; CTGTGAGGCTGCAGTGATT; ACGCTGAACTCTCTTCCTTTT; GCACAGGCTTGTGTGTAT; AGCGCATGTCTTTACAGC; AACACAGAGCACCAGAGT; CTTTCCCATGCTGTTCTCAG; TTCTTTGGGACCTGTAGTTGAG; TACCTGCCAACTGTTTAGCC; TGTCCAAGGAGGCTTACA; GGGATTTCTGAGGCACATAG
U2AF1	GAGGTGCTTAATACCACGGAAA; TCGATCACCTGCCTCACTAT; GATGGCAAGCACTTCTGTTT; GGAGACATTTACTACCTCGTGT
IDH1	TCATACCTTGCTTAATGGGTGTAGA; TTGGCAGATTTGGTGTACTCAGA GGTGATTCCATGTGCTCTT; CAGCTACTTGGTGATGACTT
IDH2	CCCACACATTTGCACTCT; AGTCTGTGGCCTTGTACT
TP53	GGTCCTCTGACTGCTCTTT; AGAGGAATCCCAAAGTTCCA; GAGGTGCTTACGCATGTT; GCCAGACCTAAGAGCAATC; GAGCGAGATTCCATCTCAAA; GAGGTGGATGGGTAGTAGTAT; CTTACTGCCTCTTGCTTCTC; TCTTTGAGGCATCACTGC
XRCC1	CCCTCAGATCACACCTAACT; CCAGAGTGCTGGGATTACA
OGG1	CTAAAGGACTCTCCAGCCA; ACTGACTGCTTGATTTGGG
APEX1	GCATAGGTGAGACCCTATTG; GGTTGCGAAGGTCAATTTTC

Tabela 2. Frequência de genótipos e alelos

XRCC1	rs25487	OGG1	rs1052133	APEX1	rs1130409
Ancestral G	População do estudo	Ancestral C	População do estudo	Ancestral G	População do estudo
GG	38,2%	CC	70,6%	GG	41,1%
AG (heterozigose)	41,1%	CG (heterozigose)	26,5%	GT (heterozigose)	44,1%
AA (homozigose)	20,6%	GG (homozigose)	2,9%	TT (homozigose)	17,7%
Alelo G	41,1%	Alelo G	29,4%	Alelo G	44,1%
Alelo A	82,3%	Alelo C	23,5%	Alelo T	73,5%

Tabela 3. Descrição das SNPs

Gene	SNPs
SF3B1	rs149825868, rs771959570, rs200694304, rs766755045, rs752109835, rs754385486, rs755742488, rs773328337, rs777426118, rs760673135, rs766637341, rs749047192, rs776512837, rs2017743422, rs765330541, rs373969934, rs754077336, rs755415626, rs779135976, rs372222152, rs375511433, rs527792099, rs372084671, rs747210701, rs10193750, rs369358283, rs773950444, rs731821389, rs758808948, rs771174485, rs776846119, rs7816940
U2AF1	rs192494139, rs1065145, rs367779069, rs139633644, rs368569876, rs536316217, rs574874922, rs111735336, rs113499306, rs371769427, rs139959814, rs200281496, rs113672972, rs367744421, rs113363500, rs371784035, rs61737061, rs143181915, rs138469042, rs201257428, rs61737061, rs371246226, rs201658508, rs375212552, rs369161474, rs372625984, rs376810756, rs189807399
TET2	rs44164104, rs202118034, rs574131837, rs200998980, rs74669575, rs184727510, rs192879693, rs144467609, rs377102640, rs185009865, rs35264841, rs141975400, rs373704764, rs771761785, rs374816785, rs548420324, rs372179780, rs568289483, rs367866583, rs374464277, rs5272247782, rs546974251, rs539144550, rs17319679, rs551797762, rs565238417, rs759658003, rs114616059
IDH1	rs565065820, rs575483212, rs368642313, rs201790850, rs372625136, rs73070954, rs111834611, rs144593536, rs2003056409, rs544768396, rs546314478, rs559796394, rs528249056, rs551720716, rs201016875, rs367706953, rs185564694, rs148160119, rs113732076, rs199915613, rs202210066, rs377475055, rs267599174, rs138458978, rs567401796, rs188499120, rs201477228, rs370928521
IDH2	rs367811936, rs576720419, rs121913503, rs370791067, rs199610306, rs201112712, rs142033117, rs201240576, rs529638451, rs144978761, rs113691157, rs200054555, rs565216378, rs5661198467, rs200758694, rs375758522, rs367811936, rs576720419, rs121913503, rs370791067, rs199610306, rs201112712, rs142033117, rs201240576, rs529638451, rs144978761, rs113691157, rs200054555, rs565216378, rs5661198467, rs200758694, rs375758522
TP53	rs150607408, rs377274728, rs137852794, rs28934875, rs267605077, rs28934873, rs137852792
XRCC1	rs25487
OGG1	rs1052133
APEX1	rs1130409