UERJ ON ASTADOO OF

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Carolina de Andrade Leite

Mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda secundária à síndrome mielodisplásica

Carolina de Andrade Leite

Mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda secundária à síndrome mielodisplásica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Coorientador: Prof Dr Roberto Irineu da Silva

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L533 Leite, Carolina de Andrade

Mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda secundária à síndrome mielodisplásica / Carolina de Andrade Leite – 2015. 79 f.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Maria Helena Faria Ornellas de Souza Coorientador: Prof Dr Roberto Irineu da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Mutação (Biologia) - Teses. 2. Síndromes mielodisplásicas. 3. Genética - Expressão - Teses. 4. Idosos - Teses. I. Souza, Maria Helena Faria Ornellas de. II. Silva, Roberto Irineu da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.214

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científico	s, a	reprodução	total	ou
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.				
Assinatura		Data		

Carolina de Andrade Leite

Mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda secundária à síndrome mielodisplásica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de junho de 2015.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Irineu da Silva

Colégio Pedro II

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Gilda Alves Brown

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Profa. Dra. Stella Beariz Gonçalves de Lucena Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

Prof. Dr. Adilson José de Almeida

Hospital Universitário Gaffreé e Guinle

Rio de Janeiro 2015

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Bernardo, Beatriz e Michel, que são a essência da vida.

Ao meu marido Henry, companheiro de todas as horas.

Aos meus pais, pelos ensinamentos ao longo da vida.

A Deus por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Maria Helena Ornellas pela oportunidade de desenvolver meu projeto e por estar disponível em todas as horas.

Ao Prof. Roberto Irineu pelos direcionamentos iniciais do trabalho.

À Prof Gilda Alves pela parceria com o Laboratório de Genética Aplicada do INCA.

Aos Professores Stella Beatriz Lucena, Adilson José de Almeida, Gilda Alves, Andréa Soares e Elenice Ferreira Bastos que, gentilmente, aceitaram fazer parte da banca de avaliação do meu trabalho.

À Dra. Aline Moreira, da Plataforma de Genotipagem e Análise de Fragmentos de DNA, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, onde realizamos o sequenciamento.

Ao amigo Adriano Arnóbio pelas valiosas dicas na parte da análise estatística.

Aos amigos do Serviço de Hematologia do HUPE por me apoiarem e compreenderem os momentos nos quais precisei me ausentar.

A toda equipe do Serviço de Patologia Geral que me recebeu de braços abertos.

As alunas de iniciação científica, Aline e Mariana, que colaboraram com o extenso trabalho de bancada.

E, ao querido Lucas que, mais do que um colega de bancada, se tornou um amigo e soube com incrível paciência me ensinar o dia-a-dia da bancada e não me deixar esmorecer frente aos inúmeros desafios desse projeto.



RESUMO

LEITE, Carolina de Andrade. Mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda secundária à síndrome mielodisplásica. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A síndrome mielodisplásica (SMD) é um grupo bastante heterogêneo de doenças clonais, caracterizado por hematopoese ineficaz, apoptose e risco aumentado de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA). Ao longo dos anos, pouco se evoluiu em relação ao manejo desta entidade. Com o desenvolvimento de índices prognósticos como o IPSS (International Prognostic Scoring System) em 1997, o WPSS (World Health Organization-Prognostic Scoring System) em 2005 e, mais recentemente, o IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) em 2012, houve melhora na estratificação e na estimativa do prognóstico. O IPSS ainda é considerado padrão para a classificação prognóstica das SMD, entretanto, não raro, observamos pacientes com comportamentos clínicos distintos coexistindo no mesmo grupo de estratificação. Isso sugere que os escores disponíveis atualmente ainda são falhos e que existe necessidade de uma classificação mais refinada. Com o avanço no conhecimento da SMD, em muito estudos tem sido destacada a importância da investigação das mutações somáticas como fatores responsáveis pelo pior prognóstico e evolução da doença. Neste estudo, foram incluídos 50 pacientes com diagnóstico de SMD acompanhados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) entre 2012 e 2014. Foram analisadas mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS e TP53 por meio de extração e seguenciamento de DNA genômico. Dos 50 pacientes analisados, 42 deles (84%) apresentaram algum tipo de mutação. A mutação no gene ASXL1 foi a mais frequente, estando presente em 41 pacientes (82%), seguida do gene TP53, presente em 10 pacientes (20%) e NRAS encontrada em apenas 1 paciente (2%). No grupo LMA secundária a SMD (LMA t), 11% apresentaram mutação no TP53 e 78% no ASXL1, nenhuma mutação foi encontrada nos genes NRAS e KRAS. Neste estudo não foram observadas diferenças entre os grupos mutado e não mutado em relação à sobrevida global, fibrose da medula óssea, necessidade transfusional ou em relação ao grau de citopenias. Esperamos que o acompanhamento desse grupo a longo prazo permita o esclarecimento dessas associações de maneira mais significativa.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica. Mutação. ASXL1. NRAS/KRAS. TP53.

ABSTRACT

LEITE, Carolina de Andrade. **Mutation in genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53 in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia secondary to myelodysplastic syndrome.** 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal disorders characterized by ineffective hematopoiesis, apoptosis and increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). Over the years, little has evolved regarding the handling of this entity. With the development of prognostic indicators such as IPSS (International Prognostic Scoring System) in 1997, WPSS (World Health Organization Prognostic Scoring System) in 2005 and, more recently, the IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) in 2012, there was an improvement in the stratification and estimation of prognosis. IPSS is still considered the best option for MDS classification, but we often observe patients with different clinical behaviors coexisting in the same stratification group. It suggests that the currently available scores are imperfect and that there's an urgent need for a more refined categorization. With the improvement in MDS studies, many researches have highlighted the importance of somatic mutations profiling as accountable factors for poor prognosis and disease progression. We studied 50 patients with MDS followed at the Pedro Ernesto University Hospital Hematology Service (HUPE) from 2012 to 2014. We analyzed mutations in ASXL1, NRAS/KRAS and TP53 genes, by extracting genomic DNA sequencing. Of the 50 patients studied, 42 (84%) had at least one kind of mutation. Mutation in gene ASXL1 was the most frequent in 41 patients (82%), followed by TP53 in 10 patients (20%) and NRAS in only one patient (2%). In LMA-t group, 11% had mutations in TP53 and 78% in ASXL1, and no mutation was found in NRAS or KRAS genes. This study showed no differences between the mutated and non-mutated groups with respect to overall survival, bone marrow fibrosis, need for transfusion or cytopenias. We expect to have more significant variations in this group in a long-term monitoring becomes available.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, Mutation, ASXL1, NRAS/KRAS, TP53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	TP53 exon 7 - c. 711 T>A Met237Lis	50
Figura 2 -	TP53 exon 6 – c.669 C>T Pro223Leu	50
Figura 3 –	TP53 exon 4 - c. 215_216insG 216 Pro72Ala	50
Figura 4 –	ASXL1 - c. 1924 G>A Gli642Arg	54
Figura 5 –	ASXL1 - c. 1960 G>C Ala653Pro	54
Figura 6 –	ASXL1 - c. 1963 A>C Tre654Pro	54
Figura 7 –	ASXL1 - c. 2021 A>C His673Pro	55
Figura 8 –	ASXL1 - c. 2032 A>G Arg677Gli	55
Figura 9 –	ASXL1 - c. 2047 A>C Tre682Pro	55
Figura 10-	ASXL1 - c. 2110 G>T Gli703Trp	56
Figura 11–	ASXL1 - c. 3029 C>T Thr1010Met	56
Figura 12-	ASXL1 - c. 3306 G>T Glu1102Asp	56
Figura 13–	ASXL1 - c. 3973 C>T Leu1325Phe	57
Figura 14–	NRAS – c.Ins279C Arg97The	57
Gráfico 1 –	Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier	
	para os pacientes com e sem mutação no gen ASXL1	58
Gráfico 2 –	Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier	
	para os pacientes com e sem mutação no gen TP53	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação das síndromes mielodisplásicas - OMS 2008	17
Tabela 2 –	Alterações citogenéticas que permitem um diagnóstico presuntivo	
	de SMD em pacientes com critérios clínicos e hematológicos de	
	SMD, porém com morfologia inconclusiva	19
Tabela 3 –	Sistema Internacional de Escore de Prognóstico (IPSS)	24
Tabela 4 –	Classificação proposta pela OMS - Baseada no Sistema de	
	Escore Prognóstico (WPSS)	25
Tabela 5 –	IPSS-R	25
Tabela 6–	Sequências dos iniciadores dos éxons do gene TP53	34
Tabela 7–	Características dos pacientes com SMD	39
Tabela 8–	Distribuição dos pacientes segundo a Classificação OMS 2008	
	para SMD	40
Tabela 9–	Associação entre as mutações nos genes TP53, ASXL1, NRAS e	
	KRAS e o IPSS e classificação OMS	41
Tabela10-	Comparativo de características clínicas e biológicas entre	
	pacientes mutados e não-mutados	43
Tabela11–	Teste de aderência qui-quadrado do diagnóstico nos pacientes	
	com mutação no TP53	44
Tabela12-	Teste de aderência qui-quadrado do diagnóstico nos pacientes	
	com mutação no ASXL1	45
Tabela13-	Teste qui-quadrado da associação entre fibrose e os genes TP53,	
	ASXL1	46
Tabela14-	Teste qui-quadrado da associação entre sexo e os genes TP53,	
	ASXL1	46
Tabela15-	Teste qui-quadrado da associação entre plaquetas e os genes	
	TP53, ASXL1	47
Tabela16-	Teste qui-quadrado da associação entre hemoglobina e os genes	
	TP53, ASXL1	47
Tabela17–	Teste qui-quadrado da associação entre neutrófilos e os genes	
	TP53. ASXL1	48

Tabela18–	Teste qui-quadrado da associação entre óbito e os genes TP53,	
	ASXL1	48
Tabela19–	Teste qui-quadrado da associação entre necessidade transfusional	
	e os genes TP53, ASXL1	49
Tabela20–	Mutações encontradas no gene TP53 (exon 4 a 9)	51
Tabela21–	Mutações encontradas no gene ASXL1 (exon 12)	52
Tabela22–	Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier	
	para os pacientes com e sem mutação no gen ASXL	58
Tabela23-	Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier	
	para os pacientes com e sem mutação no gen TP53	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR Anemia Refratária

AREB Anemia Refratária com excesso de blastos

AREB-t Anemia Refratária com excesso de blastos em transformação

ARSA Anemia refratária com sideroblastos em anel

CRDU Citopenia refratária com displasia unilinhagem

CRDM Citopenia refratária com displasia multilinhagem

CRMD-SA Citopenia refratária com displasia multilinhagem com sideroblastos em

anel

DNA Ácido desoxirribonucleico

HUPE Hospital Universitário Pedro Ernesto

ICUS Citopenia idiopática de significado indeterminado (*Idiopatic Cytopenia*

of Undeterminated Significance)

IPSS Sistema de escore prognóstico internacional (International Prognosis

Score System)

IPSS-R Sistema de escore prognóstico internacional Revisado (*International*

Prognosis Score System Revised)

LMA Leucemia Mielóide Aguda

LMA-t Leucemia Mielóide Aguda secundária à Síndrome Mielodisplásica

LMC Leucemia Mielóide Crônica

LMMC Leucemia Mielomonocítica Crônica

OMS Organização Mundial de Saúde

PCR Reação de cadeia polimerase (Polimerase Chain Reaction)

SMD Síndrome mielodisplásica

WPSS Sistema escore prognóstico da Organização Mundial de Saúde (World

Health Organization-Prognostic Scoring System)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	28
1.1	Objetivo geral	28
1.2	Objetivos específicos	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Caracterização dos pacientes incluídos	29
2.2	Desenho do estudo	29
2.3	Procedimentos analíticos	30
2.3.1	Mielograma	30
2.3.2	Coloração de Perls	31
2.3.3	Biópsia de Medula Óssea	31
2.3.4	<u>Citogenética</u>	31
2.3.5	Extração do DNA genômico	32
2.3.6	Técnica de PCR	33
2.3.6.1	Gene TP53	33
2.3.6.2	Gene ASXL1	34
2.3.6.3	Gene NRAS/KRAS	35
2.3.7	Eletroforese em gel de agarose 1,5%	35
2.3.8	Purificação do produto de PCR	36
2.3.9	Sequenciamento automático.	36
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APENDICE – Screening of mutations in the additional sex combs like	
	1,transcriptional regulator, tumor protein p53, and KRASproto-	
	oncogene, GTPase/NRAS proto-oncogene, GTPasegenes of patients	
	with myelodysplastic syndrome (Artigo publicado)	71
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética	78

INTRODUÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) é um grupo de doenças clonais bastante heterogêneo, caracterizado por hematopoese ineficaz, apoptose e risco aumentado de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) (Vardiman *et al*, 2009). Os primeiros relatos de SMD foram publicados há pouco mais de 40 anos (Fisher *et al*, 1973, Saami & Linman, 1973), sendo descrita como anemia crônica em pacientes idosos, com refratariedade ao tratamento e evolução para LMA. A etiopatogenia permanece obscura, porém estudos recentes têm procurado uma "assinatura genética", que possa explicar o passo inicial que dá origem à doença (Rocquain *et al*, 2010, Bejar *et al*, 2011, Cazzola *et al*, 2013, Bravo *et al*, 2014).

A SMD pode ser classificada em primária ou *de novo* e secundária. A secundária, em geral, está relacionada ao uso prévio de quimioterápicos, em especial os agentes alquilantes e os inibidores de topoisomerase II. A forma primária não tem agente mutagênico conhecido, entretanto, é descrito que fatores hereditários, ambientais e o envelhecimento influenciam no desenvolvimento da doença. Doenças congênitas, como anemia de Fanconi, aumentam o risco de SMD, assim como a exposição ao benzeno (Haase *et al*, 2007, Strom *et al*, 2008) cuja maior fonte ambiental é encontrada no cigarro. Outros fatores ambientais relacionados são a exposição a pesticidas e solventes (West *et al*, 1995, Rigolin *et al*, 1998, Strom *et al*, 2005).

Por muitos anos, a SMD foi considerada como um estado pré-leucêmico devido à alta taxa de progressão para LMA. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) trocou o código da SMD na classificação internacional de doenças para oncologia de 1 (incerto se maligno ou benigno) para 3 (maligno). Desta forma, em 2001, a SMD foi incluída nas estatísticas de registros de câncer tornando possível a obtenção de dados epidemiológicos sobre a morbidade e a mortalidadeda doença (Ma *et al*, 2012).

A SMD é uma doença predominantemente da população idosa. Aproximadamente 86% dos pacientes diagnosticados têm mais de 60 anos e apenas 6% deles são diagnosticados com menos de 50 anos (Ma *et al*, 2007). A incidência é maior nos homens e a etnia branca tem uma incidência maior do que outros grupos populacionais (Ma *et al*, 2007). Com o envelhecimento da população e a melhoria no

reconhecimento e diagnóstico da doença, é provável que a incidência de SMD aumente gradativamente nos próximos anos (Ma *et al*, 2012). Nos Estados Unidos, a incidência da doença é estimada em 3,8 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo menor em pacientes com menos de 40 anos (0,14 casos por 100.000 habitantes) e aumentando de acordo com a idade, chegando a 36 casos por 100.000 habitantes em pacientes acima de 80 anos (Sekeres *et al*, 2010).

A apresentação clínica e a história natural da doença são extremamente variáveis, podendo apresentar desde formas brandas, com sobrevida global alta e baixa taxa de transformação leucêmica até formas mais agressivas, que evoluem rapidamente para LMA.

Em geral, o primeiro sinal é o aparecimento de uma ou mais citopenias – anemia, neutropenia, trombocitopenia - em um hemograma de rotina. A partir desse hemograma sugestivo, deve ser analisado criteriosamente o esfregaço de sangue periférico, à procura de dados que sugiram a presença de displasia. Como por exemplo: neutrófilos hipossegmentados (pseudo Pelger-Huet) ou hipogranulares, macrocitose e células imaturas de linhagem eritróide ou mielóide (Cazzolla *et al*, 2013). Uma vez realizada a hematoscopia, está indicado o estudo completo da medula óssea (MO), englobando o mielograma com coloração para ferro medular, a biópsia de medula, a citogenética e a citometria de fluxo. Os achados morfológicos da MO incluem a hipercelularidade, a presença de alterações megaloblastóides, pontes internucleares, falhas de enchimento citoplasmático, sideroblastos em anel, micromegacariócitos ou megacariócitos hipolobulados, hipossegmentação e hipogranulação da série mielóide e presença de blastos.

O nome "Síndrome Mielodisplásica" surgiu em 1982, quando um grupo internacional de hematologistas franceses, americanos e britânicos (FAB), reuniu-se para estudar melhor essa patologia, propondo uma classificação em 5 grupos distintos (Bennett *et al*, 1982). Os critérios utilizados foram as características morfológicas associadas ao percentual de blastos no sangue periférico e na medula óssea. Os cinco grupos foram: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Até então, a SMD era conhecida apenas como "pré-leucemia" e a introdução dessa classificação foi pioneira, servindo ao longo das décadas seguintes como base para outras classificações, que incorporaram estudos

morfológicos, clínicos e genéticos no esclarecimento da etiologia e manejo da doença. (Vardiman 2012). Entretanto, na época, alguns fatores geraram controvérsias. De acordo com a classificação FAB, a AR e a ARSA eram caracterizadas por diseritropoese, menos que 5% de blastos na MO e pelas morfologias megacariocítica e granulocítica dentro da normalidade (Bennett et al, 1982). Porém, alguns pacientes com SMD com menos de 5% de blastos apresentavam displasia multilinhagem e sobrevida inferior àqueles com diseritropoese apenas (Rosati et al, 1996). Outro ponto importante era que a AREB englobava um valor de blastos muito amplo, que variava de 5% a 20%, e alguns autores acreditavam que era uma faixa muito grande para definir um subgrupo com prognóstico relevante (Greenberg et al, 1997). Por fim, alguns estudos apontavam que a sobrevida mediana de pacientes com AREB-t era semelhante à da LMA, assim como sua resposta ao tratamento (Estey et al, 1993, Bernstein et al, 1996), sugerindo que esses pacientes deveriam ser reclassificados como LMA. Portanto, era evidente que uma nova classificação fazia-se necessária.

Em 2001 (Jaffe et al, 2001), a OMS propôs uma nova classificação para a SMD, modificando conceitos e aumentando o valor da citogenética. A LMMC foi retirada da classificação e criou-se um grupo novo baseado na alteração citogenética que recebeu o nome de "Síndrome 5q-". O percentual de blastos na medula óssea para o diagnóstico de LMA foi reduzido, então o subtipo AREB-t da classificação FAB (21 a 30% de blastos na MO) passou a ser considerado como LMA pelo novo critério da OMS. A AREB foi dividida em duas categorias, baseadas no percentual de blastos na medula óssea: AREB-1 (blastos 5% - 10%) e AREB-2 (blastos 11% - 20%). A anemia refratária e a anemia refratária com sideroblastos em anel foram mantidas. Outras categorias foram acrescentadas: citopenia refratária com displasia de multilinhagens (CRDM) e citopenia refratária com displasia de multilinhagens e sideroblastos em anel (CRDM-SA) e a SMD não classificada (Harris et al, 1999, Vardiman et al, 2002). Este último grupo compreendia casos de citopenia unilinhagem que não a anemia.

A síndrome 5q- corresponde a um tipo específico de SMD caracterizada por anemia com ou sem outras citopenias, apresentando menos que 5% de blastos na MO e menos que 1% no sangue periférico e podendo estar associada a trombocitose (Boultwood *et al*, 1994). Os megacariócitos apresentam-se em número aumentado e com discreta redução no tamanho, com núcleo não lobulado ou

hipolobulado. Citogeneticamente, é caracterizada pela deleção isolada do 5q e, clinicamente, pelo curso indolente com predominância no sexo feminino, faixa etária acima de 50 anos e associada à anemia macrocítica e trombocitose. Em geral, apresenta desfecho favorável e baixa incidência de transformação para LMA (Brunning et al, 2008). O prognóstico favorável é modificado negativamente caso outras alterações citogenéticas surjam com a evolução da doença, mas o impacto prognóstico de cada alteração distinta ainda permanece não elucidado (Giagounidis et al, 2006).

A revisão mais atual da OMS é do ano de 2008 (Tabela 1). Na classificação OMS 2008 (Vardiman *et al*, 2009) foram redivididos os grupos de SMD, com retirada da CRDM-SA da classificação e acréscimo da Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem (CRDU) como subgrupo, tornando mais abrangente a classificação dos pacientes que apresentam displasia em um só setor. Dentro da CRDU pode-se incluir a anemia refratária, neutropenia refratária e trombocitopenia refratária. A SMD não classificada que, anteriormente, reunia os pacientes com displasias unilinhagem que não a anemia, passou a agrupar pacientes com displasia em menos de 10% das células avaliadas, porém acompanhadas de alterações citogenéticas sugestivas de SMD. Os grupos citopenia refratária com displasia de multilinhagens (CRDM), AREB-1 (blastos 5% - 10%), AREB-2 (blastos 11% - 20%) foram mantidos. A Síndrome 5q- recebeu uma nova designação como SMD associada com del5q-isolada.

Ainda nessa época, foi criada uma outra designação para aqueles casos de citopenias persistentes, porém sem displasia ou alterações citogenéticas associadas. Esse gupo de pacientes recebeu o diagnóstico de Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS) devendo os pacientes terem seu histórico hematológico e citogenético acompanhados amiúde (Winmazal *et al*, 2007) até que apresentem critérios diagnósticos para SMD.

Tabela 1 - Classificação das síndromes mielodisplásicas OMS 2008

Subgrupo	Achados em Sangue periférico	Achados em Medula óssea
Citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU): Anemia refratária (AR); Neutropenia refratária (NR); Trombocitopenia refratária (TR)	Citopenia única ou bicitopenia ^a Blastos ausentes ou raros (< 1%) ^b	Displasia de única linhagem: ≥ 10% das células em uma linhagem mieloide < 5% de blastos <15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritróide < 5% de blastos ≥ 15% de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Citopenia(s) Blastos ausentes ou raros (< 1%) ^b Ausência de bastonete de Auer Monócitos <1.000/mm³	Displasia em ≥ 10% das células em duas ou mais linhagens mieloides < 5% de blastos. Ausência de bastonete de Auer 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) <5% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer Monócitos <1.000/mm³	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 9% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c <1x10 ⁹ /L de monócitos	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c
Síndrome mielodisplásica - não classificável (SMD-NC)	Citopenias ≤ 1% de blastos ^b	Displasia em <10% das células em uma ou mais linhagem mieloide quando acompanhada de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD ^d <5% de blastos
Síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada	Anemia Contagem de plaquetas normal ou elevada Blastos ausentes ou raros (< 1%)	Normo a hipercelularidade megacariocítica núcleo hipolobulado < 5% de blastos Anormalidade citogenética: del(5q) isolada

a Bicitopenia pode ser observada ocasionalmente. Casos com pancitopenia devem ser classificados com SMD-NC

Fonte: World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th. Lyon: IARC Press, 2008; 89

Alterações citogenéticas clonais podem ser detectadas em 30-50% dos pacientes adultos com SMD primária, no entanto, ainda não foi definida nenhuma alteração que seja específica da SMD (Panani *et al*, 2005). Tais alterações variam de uma simples mudança estrutural ou numérica até lesões genômicas complexas, envolvendo três ou mais cromossomos distintos. Aberrações citogenéticas simples ocorrem frequentemente nas fases iniciais da doença, entretanto, em estágios de transformação leucêmica e durante a progressão da doença é comum ocorrerem mudanças genômicas mais complexas (Fernandez *et al*, 2000). Uma ampla gama de alterações é descrita na SMD, como perda ou multiplicação de material genético e alterações estruturais. Entretanto, apenas em cerca de 50% dos casos, a citogenética convencional consegue detectar tais alterações (Haase *et al*, 2007).

A alteração cromossômica mais comum na SMD é a deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 (5q-), seguida pela deleção ou monossomia do

b Se a porcentagem de mieloblastos na MO for <5%, mas existirem 2 a 4% de mieloblastos no SP, deve-se classificar como AREB-1. Casos de CRDU e CRDM com 1% de mieloblastos no SP devem ser classificados como MDS-NC.

^c Casos com bastonete de Auer e <5% de mieloblastos no SP e <10% na MO devem ser classificados como AREB-2

d Mais frequentes: -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), del(11q), del(12p) ou t(12p), -13 ou t(13q), t(11;16)(q23;p13.3).

cromossomo 7, deleção do braço longo do cromossomo 20 (20q-) e trissomia do cromossomo 8 (Bejar & Ebert 2010). Também ocorrem translocações recorrentes e inversões envolvendo o cromossomo 3, entre outras, que têm relevância prognóstica (Tothova *et al*, 2013). Entretanto, ainda não existe uma alteração citogenética que seja característica da SMD e quanto maior o número de alterações adquiridas ao longo da evolução de doença pior o prognóstico (mais de três alterações conferem ao cariótipo a designação de complexo).

A ocorrência destas alterações citogenéticas pode refletir uma instabilidade genômica clonal, levando à predisposição para aquisições adicionais de lesões genéticas. Em estudos citogenéticos de acompanhamento da evolução de SMD para LMA tem sido demonstrado que anomalias cromossômicas simples, ocorrendo em subtipos de SMD, são acrescidas de outras anomalias durante a progressão da doença, estando envolvidas alterações em oncogenes e genes supressores de tumor (Fernandez et al, 2000).

Na classificação OMS 2008, a citogenética teve o sua importância ampliada no diagnóstico da SMD. Pacientes com citopenias porém, sem características morfológicas conclusivas, podem ser diagnosticados como SMD inclassificável desde que apresentem alterações citogenéticas sugestivas de SMD. Tais alterações são apresentadas na Tabela 2 (Brunning *et al*, 2008)

Tabela 2 - Alterações citogenéticas que permitem um diagnóstico presuntivo de SMD em pacientes com critérios clínicos e hematológicos de SMD, porém com morfologia inconclusiva

Alterações	Alterações
não balanceadas	balanceadas
-7 or del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5 or del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) or t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.2)
-13 or del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) or t(12p) del(9q)	t(6;9)(p23;q34)
idic(X)(q13)	

Legenda: del: deleção; t: translocação; inv: inversão; i: isocromossomo; idic: isocromossomo

dicêntrico

Fonte: World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.

4th. Lyon: IARC Press, 2008; 88-93.

O espectro de alterações genéticas que pode ocasionar SMD inclui amplificações genéticas ou deleções, mutações que alteram a sequência ou a expressão de determinados genes e anormalidades epigenéticas (Espigado *et al*, 2005).

A biologia molecular sempre representou passo importante no entendimento das doenças hematológicas malignas. Entretanto, até recentemente, com exceção de exemplos específicos como o BCR-ABL na leucemia mieloide crônica (LMC) e as mutações do NPM1 e FLT3 na LMA de novo, os dados moleculares ainda não estavam incorporados amplamente na prática clínica para decisões terapêuticas (Murati et al, 2012). Isso vem mudando conforme novos conhecimentos estão sendo 0 descobrimento mutação *JAK*2*V*617*F* gerados. da nas neoplasias mieloproliferativas levou ao desenvolvimento de uma terapia-alvo efetiva, os inibidores de JAK2. Isso evidencia quanto progresso pode ser feito com a identificação de um único evento molecular em relação ao melhor conhecimento e definição da doença, classificação e estratificação de risco, além da monitorização da evolução clínica e do tratamento. A partir daí, vários genes mutados têm sido identificados. Eles afetam processos celulares como sinalização, regulação da transcrição gênica e epigenética, entre outros (Murati et al, 2012).

As alterações moleculares que levam à leucemogênese incluem predominantemente cinco classes de genes: componentes de vias sinalizadoras como *FLT3*, *JAK2*, *KIT*, *MPL*, *PDGFRs* e *RAS*; fatores transcritores como *CEBPA*, *ETV6*, *GATA2* e *RUNX1*; reguladores epigenéticos como *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *MLL* e *TET2*; supressores tumorais como *CDKN2A* e *TP53*; e componentes do *spliceossom* (Muratti *et al*, 2012).

Cerca de 70% dos pacientes com SMD apresentam mutações somáticas ou anormalidades citogenéticas clonais. As mutações somáticas no *SF3B1*, *TP53*, *TET2* e *ASXL1* estão entre as mais comumente identificadas, enquanto que aquelas no *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* e *ASXL1* são consideradas como preditoras de prognóstico independente de outras variáveis como o IPSS (Tothova *et al*, 2013). Diversos estudos apontam para a importância da avaliação de alterações moleculares na patogenia das SMD (Odenike *et al*, 2011, Haferlach *et al*, 2011) uma vez que pacientes com citogenética normal podem apresentar mutações pontuais que parecem ter impacto prognóstico. Tais mutações levando à ativação dos genes *RAS* ou inativação do *RUNX1* ou *TP53* são bem descritas em casos de SMD com citogenética normal ou alterada. Conforme as pesquisas avançam, a lista de genes mutados na SMD aumenta. Porém, as consequências clínicas e biológicas destas mutações ainda não estão completamente elucidadas e, portanto, ainda não são consideradas na prática clínica.

Em estudo publicado em 2011, Bejar et al avaliaram a prevalência das mutações genéticas nas SMD, sendo as mais comuns: TET2 (20%, de prognóstico ainda incerto), RUNX1 (15 – 20%, risco aumentado de progressão para LMA), TP53 (5 – 10%, prognóstico ruim), ASXL1 (10 – 15%, de prognóstico ainda incerto), NRAS/KRAS (10%, risco aumentado de progressão para LMA). Em outro estudo publicado no mesmo ano, Odenike e Le Beau evidenciaram que as mutações nos genes RUNX1 (runt-related transcription factor 1), TP53 (tumor protein p53), NRAS (neuroblastoma RAS viral onco-gene-homologue) estavam associados trombocitopenia grave e aumento no percentual de blastos. Em análise multivariada, mutações em 5 genes (TP53, Enhancer of Zeste Homolog 2 [EZH2], ETV6, RUNX1 e Aditional Sex Combs-Like 1[ASXL1]), que ocorreram em cerca de 1/3 dos pacientes, apresentaram significado prognóstico independente, sendo associados a menor sobrevida global. As mutações nestes genes permitiriam a estratificação nos subgrupos - de acordo com o IPSS - baixo, intermediário-1 e intermediário-2 e a

identificação, nestes grupos, dos pacientes com prognóstico mais reservado e que poderiam necessitar de uma terapia mais intensa. Entretanto, as alterações moleculares que levam à hematopoese clonal nas SMD ainda permanecem pouco compreendidas.

Em estudos mais recentes tem sido mostrado que o ASXL1 (additional sex combs-like 1) localizado na região cromossômica 20q11, é o gene mutado mais frequente na SMD avançada (Boultwood et al, 2010, Rocquain et al, 2010). O ASXL1 interage com o polycomb-group repressive complex 1 e 2 (PRC1 e PRC2) e está envolvido nos processos de regulação epigenética e modificação da cromatina. Em modelos animais e celulares as mutações no ASXL1 promoveram transformação mielóide através da perda da repressão genética mediada pelo PRC2 (Abdel-Wahab et al, 2012). As mutações do ASXL1 são comuns não só na SMD, mas também na LMA, leucemia mielomonocítica crônica e neoplasias mieloproliferativas e está geralmente relacionada com desfecho clinico desfavorável em todas essas doenças (Itzykson et al, 2013, Gelsi-Boyer et al, 2009). A mutação do ASXL1 foi recentemente incorporada em um escore prognóstico para LMMC como fator prognóstico negativo (Itzykson et al, 2013). Em coorte de 193 pacientes com SMD (Thol et al, 2011) estudados para avaliar a incidência e o impacto prognóstico desta mutação, foi evidenciado que a mutação do ASXL1 ocorreu em 20,7% dos pacientes e pode predizer um desfecho desfavorável. Em estudo realizado em 2010 (Boultwood et al, 2010), as mutações no ASXL1 foram encontradas em 7% dos pacientes com SMD sem excesso de blastos, 11%-17% dos pacientes com SMD com sideroblastos em anel, 31% dos pacientes com SMD com excesso de blastos, 23% dos pacientes com LMA secundária a SMD, 33% dos pacientes com LMMC e 30% dos pacientes com LMA. As mutações no gene ASXL1 parecem ser mais comuns nos pacientes com cariótipo normal e alterações no cromossomo 7 (monossomia ou deleção do braço longo) e infrequentes na presença da monossomia do cromossomo 5 ou del5q (Carbuccia et al, 2010).

Mutações pontuais no gene *NRAS* (neuroblastoma *RAS* viral *onco-gene-homologue*) são identificadas em cerca de 8 a 35% dos pacientes com SMD e foram associadas com pior prognóstico e maior taxa de transformação leucêmica (Paquette *et al*, 1993, Horiike *et al*, 1994). A família *RAS* inclui pequenas proteínas ligadoras de GTP envolvidas na transdução intracelular de sinais. Diversos genes dessa família podem estar mutados em pacientes com SMD, incluindo *NRAS*,

KRAS, NF1, PTPN11 e CBL. Mutações somáticas da via RAS podem estar presentes em cerca de 90% dos pacientes com LMMC juvenil e SMD/NMP nos quais a mutação secundária do SETBP1 e JAK3 podem causar progressão da doença (Malcovatti et al, 2013). As mutações no RAS promovem proliferação celular e estão associadas a alto risco de progressão para LMA e prognóstico reservado. O NRAS está mutado em cerca de 10% dos pacientes com LMA, enquanto o KRAS aparece mutado em cerca de 5% dos casos e o HRAS é raramente mutado (Al-Kali et al, 2013). Em estudo realizado por Horiike et al em 2003, a mutação no gene NRAS foi identificada em 8% dos pacientes com SMD primária, e estes apresentavam tempo de transformação para LMA menor do que o grupo sem mutação.

As mutações no gene TP53 (tumor protein p53), localizado na região cromossômica 17p13, estão entre as mais comuns já descritas nas doenças neoplásicas, uma vez que o referido gene tem papel importante na integridade do genoma. A proteína p53 tem como função interromper o ciclo celular após o dano do DNA, permitindo que haja tempo suficiente para seu reparo. Na SMD, tais mutações ocorrem em cerca de 10 a 15% dos casos, mas essa frequência pode ser maior naqueles pacientes expostos a agentes alquilantes ou à radiação (Christiansen et al, 2001). As mutações que inativam o gene TP53 estão associadas a anormalidades do cromossomo 17 ou deleções dos cromossomos 5 e 7 (Bejar et al, 2011), doença avançada, cariótipo complexo e resistência ao tratamento, todas levando a um prognóstico mais reservado (Kaneko et al, 1995, Lai et al, 1995). Alguns trabalhos sugerem que podem ser um fator de risco independente. Pacientes com SMD que apresentam mutações no TP53 têm uma apresentação clínica desfavorável com alto risco de transformação leucêmica (Bejar et al, 2011, Papaemmanuil et al, 2013). Em particular, subclones mutados do TP53 podem ocorrer em estágios iniciais de SMD com del(5q) e estão associados com baixa resposta ao uso de lenalidomida e risco aumentado de progressão para LMA (Jadersten et al, 2011).

Wattel *et al*, em estudo publicado em 1994, já sugeriam que a mutação do gene *TP53* estaria relacionada à resistência à quimioterapia e sobrevida mais curta nos pacientes com SMD. Horike et al, da Universidade de Kioto, em estudo de 2003 sugeriram o acréscimo da análise da mutação do gene *TP53* ao IPSS, como forma de refinar o escore prognóstico uma vez que em seu grupo de pacientes, tal mutação foi detectada nos estágios iniciais da doença e conferia um caráter mais agressivo à apresentação clínica.

O diagnóstico ainda é baseado em dados morfológicos (citopenias ao hemograma associadas ao grau de displasia e percentual de blastos no mielograma) e achados citogenéticos (Fenaux et al, 2014). Tais critérios diagnósticos, em conjunto, permitem a estratificação dos pacientes em grupos de risco de acordo com o IPSS (International Prognostic Scoring System) (Greenberg et al, 1997). O IPSS (Tabela 3), desenvolvido em 1997, classifica os pacientes em grupos de risco baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto, de acordo com o número de citopenias, o percentual de blastos e as alterações citogenéticas. Durante anos, foi utilizado como única ferramenta para a classificação e acompanhamento dos pacientes com SMD. De acordo com o IPSS, a deleção do 5q faz parte do grupo de alterações de bom prognóstico, em conjunto com cariótipo normal, 20q- e perda do Y. As alterações de mau prognóstico são representadas por aquelas do cromossomo 7 e cariótipo complexo (três ou mais alterações citogenéticas). Aquelas que não correspondem a nenhum destes grupos são classificadas como intermediárias, a despeito de ainda não se saber a sua real relevância prognóstica (Haase et al, 2007). Em alguns estudos, alterações cromossômicas caracterizadas como prognóstico intermediário pelo IPSS - trissomia do cromossomo 8 e a del(11)(q23) - estão frequentemente associadas com a evolução da doença (Sole et al, 2000). Portanto, a aplicação do IPSS tem gerado discussão em relação aos grupos separados por cariótipo, sendo necessária uma análise mais refinada em relação a estratificação de risco. Uma das grandes deficiências do IPSS é não considerar a gravidade das citopenias, de forma que pacientes dependentes de suporte transfusional são incluídos no mesmo grupo que os independentes transfusionais, quando se sabe que são indivíduos com apresentações clínicas bem distintas.

Conforme o conhecimento sobre esta doença foi sendo ampliado, surgiram outros escores como o WPSS (Tabela 4) (*World Health Organization Prognostic Scoring System*) em 2005 (Malcovati *et al*, 2005) que somava a necessidade transfusional aos critérios já estabelecidos pelo IPSS. E, mais recentemente, em 2012, a *MDS Foundation* reuniu dados de múltiplas instituições em 11 países - incluindo o Brasil - para revisar e aprimorar o IPSS, criando o IPSS-R (Tabela 5) (*International Prognostic Scoring System Revised*). Neste foram acrescentadas variáveis como LDH, ferritina, beta2 microglobulina, comorbidades dos pacientes e performance status (Greenberg *et al*, 2012) aos critérios já avaliados anteriormente, estratificando os pacientes em cinco grupos distintos.

Porém, mesmo após a introdução de novos parâmetros, fica evidente que pacientes com comportamentos clínicos distintos coexistem no mesmo grupo do IPSS e IPSS-R, sugerindo que há necessidade de um escore prognóstico mais refinado, com dados mais robustos que permitam alocar os pacientes em grupos afins.

Tabela 3 - Sistema Internacional de Escore de Prognóstico (IPSS)¹

Variável –	Valor dos escores				
variavei	0	0,5	1.0	1,5	2
Blastos da MO	<5%	5 -10%	-	11 -20%	21 – 30%
Cariótipo ^a	Bom	Intermediário	Ruim	-	-
Citopenia ^b	0 ou 1	2 ou 3	-	-	-

Legenda: ¹IPSS: International Prognostic Scoring System. Grupos de Riscos IPSS: Baixo, valor da soma dos escores= 0; Intermediário-1, valor da soma dos escores= 0,5-1; Intermediário-2, valor da soma dos escores = 1,5 - 2,0; Alto, valor da soma dos escores >2,0 aCariótipo: Bom, del(5q), del(20q), -Y; Ruim, Anormalidades envolvendo o cromossomo 7 e/ou >3 anormalidades; Intermediário, outras. bCitopenia: hemoglobina <10 g/dL; contagem absoluta de neutrófilos <1.5 x 109/L; plaquetas <100 x 109/L.

Fonte: Greenberg et al, 1997

Tabela 4 - Classificação proposta pela OMS - Baseada no Sistema de Escore Prognóstico (WPSS)²

Variável		Valor dos e	escores	3
variavei	0	1	2	3
Categoria OMS-2001	AR, ARSA, 5q ⁻	RCDM, RCDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariótipo ^a	Bom	Intermediário	Ruim	-
Dependência Transfusional ^c	Nenhuma	Regular	-	-

Legenda: ²WPSS: World Health Organization-Pronostic Scoring System. Grupos de Riscos WPSS: Muito baixo, valor da soma dos escores=0; Baixo, valor da soma dos escores=1; Intermediário, valor da soma dos escores=5-4; Muito alto, valor da soma dos escores=5-6.

^aCariótipo: Bom, del(5q), del(20q), -Y; Ruim, Anormalidades envolvendo o cromossomo 7 e/ou >3 anormalidades; Intermediário, outras.

^bCitopenia: hemoglobina <10 g/dL; contagem absoluta de neutrófilos <1.5 x 10⁹/L; plaquetas <100 x 10⁹/L.

^c Dependência Transfusional: ≥ 1unidade de concentrado de hemácias cada 8 semanas durante 4 meses.

Fonte: Greenberg et al, 1997

Tabela 5 - IPSS-R³

Variável	Valor dos escores						
variavei	0	0,5	1.0	1,5	2	3	4
Citogenética*	Muito boa		Boa		Intermediário	Ruim	Muito ruim
Blastos MO	<=2		>2%, <5%		5-10%	>10%	
НЬ	>=10		8, <10	<8			
Plaquetas	>=100	50, <100	<50				
Neutrófilos	>=0,8	<0,8					

Legenda: ³IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System. *Classificação de citogenética: Muito boa = -Y, del(11q); Boa = Normal, del(5q), del(12p), del(20q); Intermediária = del(7q), +8, +19, i(17q); Alto = -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), complexo: 3 anormalidades; Muito alto= mais de 3 anormalidades; Categoria de risco: muito baixo <=1,5;, baixo >1,5-3;, intermediário >3-4,5; alto >4,5-6; muito alto >6

Fonte: Greenberg et al, 2012

O tratamento da SMD evoluiu bastante nos últimos anos, porém ainda representa um desafio. A estratégia atual é baseada na estratificação de risco pelo IPSS. Nos pacientes considerados de baixo risco – IPSS baixo e intermediário 1 – a sobrevida costuma ser longa e o risco de transformação para LMA, baixo. Nesse caso, a estratégia terapêutica é focada na correção das citopenias e melhoria da qualidade de vida. A anemia costuma ser a citopenia mais significativa nos pacientes com SMD de baixo risco (Fenaux 2014) e as transfusões repetidas levam à sobrecarga de ferro, deletéria em diferentes órgãos. Nesses casos, está indicado o uso de fatores de crescimento, como a eritropoietina, e a quelação de ferro. A resposta à eritropoietina varia de 30% a 60% dependendo do estudo (Moyo et al, 2008). Nos pacientes com Síndrome 5q-, a lenalidomida mostrou excelentes resultados, inclusive com independência transfusional e com resposta citogenética em 50 a 70% dos pacientes (List et al, 2006, Fenaux et al, 2008). Nos pacientes com trombocitopenia, o uso dos agonistas do receptor de trombopoietina está em avaliação em estudos fase II, com boa resposta, reduzindo a necessidade transfusional e o risco de sangramento espontâneo (Olivia et al, 2013, Giagounidis et al 2014). Nos neutropênicos, o uso de fator estimulador de crescimento de colônias granulocíticas (G-CSF) costuma melhorar a neutropenia em 60% a 75% dos casos, porém seu uso não está relacionado ao aumento de sobrevida (Fenaux et al, 2014). Os agentes hipometilantes – decitabina e azacitidina – podem ser utilizados nos pacientes de baixo risco que são dependentes transfusionais e que falharam ou não são candidatos ao uso de lenalidomida ou fatores de crescimento (Garcia-Manero, 2014). Nos pacientes com SMD de alto risco - IPSS alto e intermediário 2 - o tratamento é focado na modificação da história natural da doença, devido ao alto risco de progressão para LMA e à sobrevida reduzida. As opções terapêuticas incluem hipometilantes, esquemas de quimioterapia direcionados para LMA e transplante alogênico de células tronco hematopoéticas, sendo esta a única opção terapêutica curativa. O transplante alogênico é reservado aos pacientes com idade menor que 65 anos e com doador HLA compatível.

Nos últimos 4 anos, o foco das publicações internacionais (Bejar *et al*, 2011, Bejar *et al*, 2012, Pellagatti *et al*, 2013) tem sido a busca de mutações somáticas que possam ser incorporadas aos escores prognósticos já disponíveis e, desta forma, melhorar a estratificação de risco e a estimativa do prognóstico. Em estudo de 2013, Cazzolla *et al* citam que já está em curso pela *MDS Foundation* um estudo

para elaborar o IPSS-Mol, que incluiria parâmetros clínicos, hematológicos e moleculares.

Decifrar e entender a complexidade genética da síndrome mielodisplásica torna-se primordial na elucidação da patogênese da doença, facilitando o diagnóstico, refinando os escores prognósticos e identificando novos alvos terapêuticos. O estudo criterioso de tais alterações pode, no futuro, favorecer o diagnóstico precoce e o tratamento da mielodisplasia, seguindo modelos já sedimentados de terapia alvo como é o caso da leucemia mieloide crônica – com o gene de fusão *BCR-ABL* – e a leucemia mieloide aguda M3 – com o gene quimera *PML-RARa*.

1 **OBJETIVOS**

1.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de mutações nos genes *ASXL1, NRAS/KRAS, TP53,* nos pacientes com SMD e LMA secundária à SMD.

1.2 Objetivos específicos

- a) Padronizar protocolos de detecção de mutações nos genes ASXL1, NRAS/KRAS, TP53.
- b) Verificar o impacto individual destas mutações sobre o perfil de prognóstico da doença.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização dos pacientes estudados

Foram incluídos no estudo 50 pacientes com diagnóstico de SMD e LMA secundária à SMD, assistidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), no período de 2012 a 2014. Todos os pacientes realizaram exames concomitantes da medula óssea para análises morfológica, citogenética e molecular. Foram excluídos pacientes portadores de HIV ou outro tipo de imunodeficiência e aqueles que não quiseram participar ou continuar na pesquisa. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE 08084712.4.0000.5259).

2.2 Desenho do estudo

Trata-se de estudo descritivo, observacional, prospectivo, no qual foram selecionados pacientes com diagnóstico de SMD e LMA secundária à SMD, no período de 2012 a 2014. Todas as informações consideradas relevantes foram obtidas por revisão realizada nos prontuários do HUPE. Com base nessas informações, todos os pacientes foram classificados utilizando a classificação da OMS de 2008 (Brunning *et al*, 2008).

As amostras de MO foram coletadas ao diagnóstico e durante a evolução da doença, por indicação do corpo clínico do serviço de hematologia e processadas de acordo com o protocolo da instituição.

2.3 Procedimentos analíticos

A análise do mielograma, biópsia de medula óssea, exames bioquímicos, hematológicos e citogenéticos, foram realizados utilizando os protocolos estabelecidos no Serviço de Hematologia do HUPE. Nos itens a seguir essas técnicas serão descritas em detalhe.

2.3.1 Mielograma

A coleta do aspirado e biópsia de medula óssea foi realizado na crista ilíaca póstero-superior após assepsia local com álcool 70% e anestesia com xylocaína 2% sem vasoconstrictor. A agulha própria para mielograma foi fixada no periósteo e o material foi aspirado com uma seringa de 20ml. Deste material, parte foi utilizado para confecção de lâminas e o restante foi colocado em tubo heparinizado para realização da citogenética e biologia molecular. Logo após, a agulha foi retirada e descartada. Em seguida, foi introduzida a agulha própria para a realização da biópsia de medula óssea. Após a fixação no periósteo, a agulha foi introduzida cerca de 2,0cm e rodada em seu próprio eixo para fragmentar o cilindro ósseo. Então foi retirada e o material foi colocado em frasco com formol e encaminhado ao serviço de anatomia patológica.

Após a confecção das lâminas, o material foi corado com May Grünwald e Giemsa. As lâminas foram cobertas com May Grünwald por 2min. Logo após, foi adicionada água ao May Grünwald, aguardando a fixação por 5min. Então, as lâminas foram lavadas em água corrente e cobertas com Giemsa por 15min. Decorrido esse tempo, foram novamente lavadas em água corrente e colocadas para secar.

A análise citomorfológica foi realizada de acordo com as recomendações da OMS para SMD (Brunning *et al*, 2008), considerando celularidade, número de células contadas e análise do percentual de displasias celulares. A celularidade da medula óssea foi definida como normo, hiper ou hipocelular de acordo com a quantidade de células presente nas lâminas. Foram contadas ao menos 500 células nucleadas com a determinação percentual das linhagens celulares (eritróide,

mielóide, linfóide e megacariocítica) e do número de blastos. O valor considerado normal é de amplo domínio entre os hematologistas clínicos (Perkins, 2004). Em relação à avaliação das displasias celulares, foram seguidas as recomendações da OMS 2008 (Brunning *et al*, 2008) onde é considerada significativa a presença de alterações displásicas em 10% ou mais das células nucleadas nas linhagens eritróide e granulocítica e, para linhagem megacariocítica, analisados ao menos 30 megacariócitos e descrito o percentual de displasia, sendo significativo o valor a partir de 15%.

2.3.2 Coloração de Perls

Os casos foram revisados para a pesquisa de sideroblastos em anel. A análise seguiu a orientação da OMS, sendo avaliados 100 eritroblastos e, desses, observada a porcentagem de sideroblastos em anel (com ≥ 5 siderossomos ou 1/3 da circunferência nuclear).

2.3.3 Biópsia de medula óssea (BMO)

As informações concernentes à BMO foram obtidas nos prontuários médicos ou no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HUPE. Em especial, a presença de fibrose reticulínica foi avaliada como um dos fatores de mau prognóstico.

2.3.4 <u>Técnica da citogenética</u>

A análise cromossômica foi feita pela técnica de bandeamento G (Seabright *et al*, 1971), no laboratório de citogenética do Serviço de Hematologia do HUPE, analisando no mínimo 20 metáfases por paciente. Um caso foi considerado

citogeneticamente anormal, quando 3 ou mais metáfases apresentaram a mesma anormalidade cariotípica, tanto estrutural como numérica. A informação sobre o resultado foi coletada dos prontuários dos pacientes.

Foram utilizadas as normas preconizadas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (Shaffer *et al*, 2013).

2.3.5 Extração de DNA genômico

Posteriormente à aquisição das amostras de medula óssea, essas foram submetidas à centrifugação a uma velocidade correspondente a 5000 rpm por 10 minutos para remoção do plasma (centrífuga Sorvall RC5B rotor SM-24). Em seguida, um volume de 1 ml foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 ml, sendo adicionados 7 ml de tampão de lise de hemácias (NH4Cl 155 mM, KHCO3 10 mM e EDTA 1 mM) a 4°C (Miller et al, 1988, Karavitaki et al, 2005). A mistura resultante foi homogeneizada por meio de agitação manual suave e incubada a 4°C por 30 minutos, repetindo-se periodicamente a cada 10 minutos à temperatura ambiente para a sedimentação dos leucócitos. Estes procedimentos de homogeneização das amostras com tampão de lise de hemácias, incubação a 4°C e centrifugação são repetidos até que se verifique a sua lise total e o surgimento do precipitado de células brancas, sendo que, ao término de cada centrifugação, o sobrenadante composto principalmente de hemácias lisadas é descartado.

Uma vez obtidos os leucócitos, estes foram ressuspensos em 600 µl de tampão de lise de núcleo (Tris 10 mM pH 8,0; NaCl 400 mM e EDTA 2 mM) a 4°C, sendo adicionados ainda 15 µl de SDS 20% e 1,5 µl de proteinase K (20 mg/ml). A mistura resultante foi incubada a 37°C por uma noite e, posteriormente, transferida para um tubo de centrífuga de 1,5 ml.

O isolamento do DNA propriamente foi realizado com a adição da mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 com posterior agitação manual. Em seguida, a amostra foi centrifugada (14000 rpm/10min/4°C, centrífuga Sorvall RC5B rotor F-28 micro). A fase superior gerada por este processo foi recuperada e transferida para um novo tubo de centrífuga para posterior adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado e incubação da amostra a -20°C.

Após a extração, a presença e a integridade do DNA foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 μg/μl). A corrida eletroforética é realizada com o tampão TAE 1X a 100 V durante 45 minutos. Foi aplicada no gel uma mistura de 2 μL de DNA e 5 μL de tampão de carregamento 1X. Após a corrida, o gel foi fotografado e arquivado com a sua devida identificação.

Após a extração do DNA foi realizada a quantificação das amostras para avaliar a pureza das mesmas. Utilizamos a absorvância de 260 nm (para detectar ácidos nucleicos) e de 280 nm (para detectar proteínas). A razão entre as duas absorvâncias, A260 e A280, deve ser igual ou maior a 1,8 para que o material seja considerado puro (Sambrook *et al*, 1989). As amostras de DNA (independente da origem) foram quantificadas através do espectrofotômetro Beckhan Nanodrop (DU 640), com leitura a 260 e a 280 nm.

2.3.6 Técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR)

2.3.6.1 Amplificação de sequência genômica - Gene TP53

Para amplificar os éxons 4 ao 8 do gene *TP53* foram utilizadas na solução base: 35 μL de água ultra-pura e estéril, 5 μL de tampão STR 10X (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 2 μL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 3 μL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 3 μL do par de iniciadores para cada região a ser amplificada (Tabela 1 – Suplementar) concentrados a 10 pmol/μL, 0,5 μL da enzima DNA polimerase (1 U/μL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 50- 100 ng/μL de DNA genômico. Sendo o volume final de 50 μL. Os iniciadores foram desenhados a partir da ferramenta do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), Primer-BLAST, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), com base na referência de acesso NC_000017-9 do GenBank.

No termociclador *Axygen-100*, a amplificação dos fragmentos foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 2 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de

anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para a amplificação do éxon 8 foram utilizadas a mesma reação e ciclagem, tendo por única diferença a temperatura de anelamento que passou a ser 55°C.

Tabela 6 - Sequências dos iniciadores dos éxons do gene TP53

Exon TP53	Denominação e sequência Exon <i>TP53</i> dos iniciadores			
4	4F - TGAGGACCTGGTCCTCTGAC	412		
4 -	4R - TGAACTTTGGGATTCCTCT	- 413		
-	5F - TGTTCACTTGTGCCCTGACT	210		
5 -	5R – AGCAATCAGTGAGGAATCAG	- 310		
	6F - TGGTTGCCCAGGGTCCCCAG	224		
6 -	6R – CGGAGGGCCACTGACAACCA	- 224		
7 -	7F – CTTGCCACAGGTCTCCCCAA	227		
,	7R – AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	- 237		
8 -	8F – TTGGGAGTAGATGGAGCCCT	227		
8 -	8R – AGAGGCAAGGAAAGGTGATA	- 337		

Legenda: T, timina; G, guanina; C, citosina; A, adenina

Fonte: A Autora, 2015

2.3.6.2 Gene ASXL1

Para amplificação do exon 12 do gene *ASXL1* foram utilizadas na solução base: 36,5 μL de água ultra-pura e estéril; 5 μL de tampão STR 10X (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 2 μL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 2,5 μL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 2,5 μL do conjunto de iniciadores concentrados a 10 pmol/μL; 0,5 μL da enzima *Taq DNA Polymerase* (1 U/μL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 50 – 100 ng/ μL de DNA genômico. Sendo o volume final de 50 μL. Os iniciadores foram previamente descritos por Rocquain *et al*, 2010. No termociclador *Axygen-1000*, as amplificações dos fragmentos foram iniciadas com uma pré-desnaturação com duração de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 58°C por 40 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 45

segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Para as amplificações dos fragmentos 4, 5 e 6 foram utilizadas as mesma reações e ciclagens, tendo como diferenças o uso da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, USA) e a temperatura de anelamento que passou a ser 61°C.

2.3.6.3 Gene NRAS/KRAS

Para amplificação das regiões codificantes dos genes *NRAS/KRAS* foram utilizadas na solução base: 34 μL de água ultra-pura e estéril; 5 μL de tampão STR 10X (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 2 μL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 3 μL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EUA); 3,5 μL do conjunto de iniciadores concentrados a 10 pmol/μL; 0,5 μL da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (1 U/μL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 50 – 100 ng/ μL de DNA genômico. Sendo o volume final de 50 μL. Os iniciadores foram previamente descritos por Rocquain *et al*, 2010.

No termociclador *Axygen-1000*, as amplificações das regiões codificantes foram iniciadas com uma pré-desnaturação com duração de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 60°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 30 segundos; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Para as amplificações dos fragmentos 1 do gene *KRAS* e fragmento 2 do gene *NRAS* foram utilizadas as mesma reações e ciclagens, tendo como diferença a temperatura de anelamento, que passou a ser de 55°C.

2.3.7 Eletroforese em Gel de Agarose 1,5%

Após o término da reação de PCR, verificamos a sua eficiência através da realização de eletroforese dos produtos de PCR. Estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X e corados com brometo de etídeo (0,5 μg/μl). Foram aplicados 5,0 μl do material amplificado juntamente com

5,0 μL de tampão de carregamento 1X. Utilizamos, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 50 pares de base (InvitrogenTM). A eletroforese foi realizada a 100 V por 45 min.

2.3.8 Purificação do produto de PCR

Após a verificação da integridade dos produtos da PCR, o passo seguinte foi o sequenciamento dos fragmentos amplificados. Para tal, os produtos de PCR foram purificados com o kit GFX® PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (GE), conforme a reação a seguir.

Foram adicionados 500 µL de tampão de captura junto à mistura do produto de PCR. A mistura foi agitada no *vortex*, sendo transferida para um tubo com uma coluna de aderência a DNA e centrifugada a 16.000 x g por 30 segundos. O excedente foi descartado e 500 µL da solução de lavagem com etanol absoluto (na proporção de 1:4) foram adicionados na coluna, que novamente foi levada a idêntica centrifugação. O excedente foi novamente descartado e para remover o excesso de etanol, outra centrifugação (13.000 x g por 1 minuto) foi realizada. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL, no qual se adicionou 30 µL de tampão de eluição na coluna e foi incubado por 1 minuto em temperatura ambiente. Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 16.000 x g por 1 minuto. O produto purificado foi armazenado em congelador a -20°C.

2.3.9 Sequenciamento Nucleotídico Automático

Após a purificação, os produtos da PCR foram preparados para o sequenciamento de DNA conforme o método adaptado do dideoxinucleotídio (Sanger 1977).

Na reação de sequenciamento de fragmentos foram utilizados 6,5 μ L (10-20 ng) de produto de PCR, água ultra pura deionizada e 1,0 μ L do iniciador específico (3,2 pmol/ μ L), perfazendo um volume final de 7,5 μ L em placa de 96 poços. Depois,

foram adicionados 1,5 μL de tampão 5x (fornecido em conjunto com o "Big Dye") e 1 μL de "Big Dye" (Applied Biosystems).

Esta reação foi realizada em termociclador com 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a PCR, foi feita a precipitação iniciando com o acréscimo de 30 μL de isopropanol a 75% em cada poço da placa. A solução foi agitada no *vortex* por 10 segundos e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos, sob abrigo da luz. Após esse período, a solução foi centrifugada a 4.000 g por 45 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram adicionados 50 μL de etanol a 75% e mais uma vez foi levada à centrifugação a 4.000 por 15 minutos. Posteriormente, o excesso de sobrenadante foi retirado e o conteúdo da placa foi seco em bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, no escuro.

A última etapa da preparação do produto a ser sequenciado foi a desnaturação. Esse processo inicia-se com a adição de 10 μL de formamida Hi-di em cada poço. A placa foi levada a bloco aquecido com temperatura de 95°C por 3 minutos e logo após foi colocada em recipiente com gelo permanecendo por 10 minutos. Para finalizar, a placa foi levemente centrifugada e levada para o sequenciador 3130 *Genetic Analyzer da Applied Biosystems*. As reações de sequenciamento foram executadas na Plataforma de análise de fragmentos e seqüenciamento – IOC – Instituto Oswaldo Cruz, localizado na Fiocruz.

Foram feitas comparações entre as sequências referências dos genes *TP53, ASXL1* e *NRAS/KRAS* (NC_000017-9, NC_000001405.26 e NG_007572.1/NG_007524.1, respectivamente) com as sequências das amostras obtidas pelo sequenciamento. Essa comparação foi feita com o programa *Sequencher Version 5.1* da *Gene Codes*.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar as variáveis fibrose na medula óssea, sexo, trombocitopenia, anemia, neutropenia e óbito com os genes *TP53* e *ASXL1*. O teste *qui-quadrado de Fisher* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Para avaliação do diagnóstico entre os pacientes com mutação nos genes TP53 e ASXL1 foi utilizado o teste qui-quadrado de aderência para uma única variável.

As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meyer. O tempo de sobrevida global foi calculado a partir da data do diagnóstico até a data de ocorrência de óbito ou a data da última informação. Tal análise foi comparada entre os grupos de pacientes com e sem mutação nos genes *TP53* e *ASXL1*, utilizando-se o teste de *log-rank*.

Os dados da pesquisa foram tratados no programa estatístico R, versão 2.15.1. Em todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5%. Dessa forma, foram consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p foi inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

Dos pacientes incluídos, 36% (18) eram homens e 64% (32) eram mulheres. A média de idade foi de 57 anos (19-90anos) com mediana de 61 anos e desvio padrão de 15 anos (Tabela 7).

Em relação à classificação OMS (*Organização Mundial de Saúde*) 2008, foram diagnosticados 18% LMA, 6% AREB-2, 2% AREB-1, 32% CRDM e 42% CRDU, sendo a anemia refratária o subtipo mais comum dentre o subgrupo de displasia de unilinhagem (Tabela 8).

Tabela 7 – Características dos pacientes com SMD

Medida	Pacientes	% do total
Idade (média)	56,7	-
Gênero		
F	32	64%
M	18	36%
Diagnóstico OMS		
CRDU	21	42%
CRDM	16	32%
AREB1	1	2%
AREB2	3	6%
LMA	9	18%
IPSS		
Baixo	16	39%
Intermediário 1	3	7%
Intermediário 2	1	2%
Alto	2	5%
Não calculado	19	46%
LMA	9	-
Cariótipo		
Bom	24	48%
Intermediário	2	4%
Ruim	3	6%
Faltando	21	42%

Legenda: CRDU = Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem; CRDM = Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem; AREB1 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2; LMA = Leucemia Mielóide Aguda; IPSS = International Prognosis Score System.

Fonte: A Autora, 2015.

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes segundo a Classificação OMS 2008 para SMD

Cours ONG	Não mutao	dos	Mutados	Mutados		TOTAL	
Grupo OMS	Pacientes	%	Pacientes	%	Pacientes	%	
CRDU	4	50%	17	48%	21	48%	
CRDM	4	50%	12	29%	16	31%	
AREB1		0%	1	2%	1	2%	
AREB2		0%	3	4%	3	3%	
LMA		0%	9	18%	9	16%	
Total Geral	8	100%	42	100%	50	100%	

Legenda: CRDU = Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem; CRDM = Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem; AREB1 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2; LMA = Leucemia Mielóide Aguda; IPSS = International Prognosis Score System

Fonte: A Autora, 2015

Dos 50 pacientes analisados, 42 deles (84%) apresentaram algum tipo de mutação. Na Tabela 9 é mostrada a presença destas mutações associadas à classificação OMS e ao IPSS, e na tabela 10 a associação entre as mutações e as características laboratoriais.

A mutação no gene *ASXL1* foi a mais frequente, encontrada em 41 pacientes (82%), seguida do gene *TP53* em 10 pacientes (20%) e *NRAS* em apenas 1 paciente (2%). No grupo LMA t, 11% apresentaram mutação no *TP53* e 78% no *ASXL1*, nenhuma mutação foi encontrada nos genes *NRAS* e *KRAS*.

Tabela 9 - Associação entre as mutações nos genes TP53, ASXL1, NRAS e e KRAS e o IPSS e classificação OMS

Amostra	Gênero	Idade	IPSS	Diagnóstico	TP53	ASXL1	NRAS	KRAS
1	F	31	Intermediário 1	CRDM	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
2	F	54	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
3	F	71	Não calculado	CRDU (AR)	não mutado	c.1963A>C, p.Tre654Pro	não mutado	não mutado
4	М	68	Alto	AREB2	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
5	F	44	LMA	LMA	não mutado	c.1846G>A, p.Asp615Asn; c.1963A>C, p.Tre654Pro; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
6	М	35	LMA	LMA	não mutado	c.1963A>C, p.Tre654Pro; c.2032A>C, p.Arg677Gli; c.2047A>C; p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
7	M	31	Não calculado	CRDM	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
8	F	47	Baixo	CRDU (TR)	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
9	F	84	Intermediário 1	CRDM	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
10	F	43	LMA	LMA	não mutado	c.3306G>T, p.Glu1102Asp	não mutado	não mutado
11	F	58	LMA	LMA	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
12	F	67	Alto	AREB2	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
13	F	42	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
14	М	66	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
15	M	67	Não calculado	CRDU (AR)	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
16	F	71	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	c.2250C>T, p.Pro750Pro; c.22A>G, 3 prime UTR variant	não mutado	não mutado
17	F	58	Baixo	CRDM	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G,p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
18	F	61	Não calculado	CRDU (NR)	não mutado	c.2047A>C, p.Thr682Pro	não mutado	não mutado
19	F	47	Baixo	CRDM	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
20	F	65	Não calculado	CRDM	c.384 T>A, p.Pro128Pro	c. 2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Thr682Pro, c.1963C>A, p.Thr654Pro; c.1960G>C, p.Ala653Pro	não mutado	não mutado
21	М	64	Baixo	CRDM	não mutado	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	não mutado	não mutado
22	F	51	Não calculado	CRDM	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
23	М	19	LMA	LMA	não mutado	c.1960G>C, p.Ala653Pro; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
24	F	53	Intermediário 2	AREB2	c.204InsT, p.Glu68Val	c.1960G>C, p.Ala653Pro; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
25	М	89	Intermediário 1	AREB1	c.747G>A, p.Arg249Arg	c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
26	F	76	Não calculado	CRDM	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado
27	F	51	LMA	LMA	não mutado	c.1923G>A, p.Ile641Ile; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro; c.2250C>T, p.Pro750Pro	não mutado	não mutado
28	М	70	Baixo	CRDM	c.216InsG, p.Pro72Ala; c.747G>A, p.Arg249Arg	c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro; c.2985C>T, p.His995His	não mutado	não mutado
29	F	55	Não calculado	CRDU (TR)	c.747G>A, p.Arg249Arg	c.1923C>T, p.Ile641Ile; c.2021A>C, p.His673Pro	não mutado	não mutado
30	М	39	Não calculado	RCDM	não mutado	c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
31	F	61	Não calculado	CRDU (NR)	não mutado	c.1960G>C, p.Ala653Pro; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro; c.22A>G, p.3 prime UTR variant	não mutado	não mutado

Amostra	Gênero	Idade	IPSS	Diagnóstico	TP53	ASXL1	NRAS	KRAS
32	М	54	Não calculado	LMA	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G,p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
33	F	62	Não calculado	CRDU (AR)	c.639A>G, p.Arg213Arg	c.639A>G, p.Arg213Arg c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro		não mutado
34	F	29	Não calculado	CRDM	não mutado	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	não mutado	não mutado
35	М	69	Não calculado	CRDM	não mutado	c.1960G>C, p.Ala653Pro; c.2021G>C, p.His673Pro; c.2032G>A, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
36	F	40	Baixo	CRDU (TR)	não mutado	c. 1923G>A, p.Ile641Ile; c.2021A>C, p.His673Pro, c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
37	М	62	Não calculado	CRDM	c.669C>T, p.Pro223Leu; c.747G>A, p.Arg249Arg; c.711T>A, p.Met237Lis	c.3029C>T, p.Thr1010Met	não mutado	não mutado
38	F	68	Não calculado	CRDU (TR)	747G>A, Arg249Arg	c.2985C>T, p.His995His	c.Inser C 279; p.Arg97The	não mutado
39	М	44	Não calculado	CRDU (TR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli	não mutado	não mutado
40	М	31	LMA	LMA	669C>T, Pro223Leu	não mutado	não mutado	não mutado
41	F	74	Não calculado	CRDM	não mutado	c.1923G>A, p.Ile641Ile; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
42	F	63	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro; c.22A>G, p.3 primeUTR variant	não mutado	não mutado
43	F	65	Não calculado	CRDU (TR)	não mutado	c.1960G>C,p.Ala653Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
44	F	61	Baixo	CRDU (NR)	não mutado	c.1923G>A,p.lle641lle; c.1960G>C, p.Ala653Pro; c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
45	М	71	Não calculado	CRDU (AR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro; c.3973C>T, p.Leu1325Phe	não mutado	não mutado
46	F	62	LMA	LMA	não mutado	c.1923G>A, p.lle641lle; c.2021A>C,p.His673Pro; c.2032A>G,p.Arg677Gli; c.2047A>C, p.Tre682Pro	não mutado	não mutado
47	М	75	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.22A>G, p.3 prime UTR variant	não mutado	não mutado
48	F	35	Baixo	CRDU (TR)	não mutado	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.3759T>C, p.Ser1253Ser; c.22A>G, p.3 prime UTR variant	não mutado	não mutado
49	М	67	Baixo	CRDM	c.384 T>A, p.Pro128Pro	c.2021A>C, p.His673Pro; c.2032A>G, p.Arg677Gli; c.2985C>T, p.His995His	não mutado	não mutado
50	F	66	Baixo	CRDU (AR)	não mutado	não mutado	não mutado	não mutado

Legenda: CRDU = Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem; CRDM = Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem; AREB1 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2; LMA = Leucemia Mielóide Aguda; AR = Anemia Refratária; NR = Neutropenia Refratária; TR = Trombocitopenia Refratária; IPSS = International Prognosis Score System.

Tabela 10 - Comparativo de características clínicas e biológicas dos pacientes mutados e não-mutados

C	Não Mu	tado	Mut	ado	Tota	al
Característica	Pacientes	%	Pacientes	%	Total	%
Total	8	16%	42	84%	50	100,0%
Idade (média)	54,9		57,0		56,7	-
Gênero						
F	6	85,2%	26	57,8%		
M	2	14,8%	16	42,2%		
Diagnóstico OMS						
CRDU	4	50,3%	17	47,9%	21	48,2%
CRDM	4	49,7%	12	28,6%	16	31,1%
AREB1	0	0,0%	1	2,2%	1	2,0%
AREB2	0	0,0%	3	3,6%	3	3,1%
LMA	0	0,0%	9	17,8%	9	15,7%
Total	8	100,0%	42	100,0%	50	100,0%
Citogenética						
Bom	4	53,0%	20	46,3%	24	47,1%
Intermediário	0	0,0%	2	2,1%	2	1,9%
Ruim	0	0,0%	3	2,4%	3	2,1%
Faltando	4	47,0%	17	49,2%	21	48,9%
Necessidade transfusional						
N	6	81,2%	19	53,4%	25	56,6%
S	2	18,8%	23	46,6%	25	43,4%
IPSS						
Baixo	4	53,0%	12	33,3%	16	35,6%
Intermediário 1	0	0,0%	3	3,1%	3	2,7%
Intermediário 2	0	0,0%	1	2,1%	1	1,9%
Alto	0	0,0%	2	1,4%	2	1,3%
Não Calculado	4	47,0%	17	49,2%	21	48,9%
LMA	0	0,0%	7	10,8%	7	9,6%
Fibrose						
N	8	100,0%	36	85,7%	44	87,4%
S	0	0,0%	6	14,3%	6	12,6%
Óbito		,		,		,
N	7	82,6%	26	74,2%	33	75,1%
S	1	17,4%	16	25,8%	17	24,9%
,	_	17,470	10		17	24,57
	Não Mut	tados		Mutados		Total
Sangue periférico	-		Total	ASXL1	TP53	
Pacientes	8		42	41	10	50
Hemoglobina (média)	9,86		9,34	9,45	10,14	9,43
Netutrófilos (média)	2.555		1.926	1.921	2.518	2.027
Plquetas (média)	201.325		130.261	130.493	108.920	141.863

Legenda: CRDU = Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem; CRDM = Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem; AREB1 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2 = Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2; LMA = Leucemia Mielóide Aguda; F= feminino; M= Masculino; N = Não; S = Sim; IPSS = International Prognosis Score System.

Ainda que alguns diagnósticos apresentem percentual alto (CRDM), o teste de aderência não identificou diferença estatística entre os percentuais de diagnóstico no gene *TP53* dos pacientes com mutação, tabela 11.

Tabela 11 - Teste de aderência Qui-quadrado do Diagnóstico (uma variável) nos pacientes com mutação no *TP53*

DIAGNÓ	STICO	TP53	P-valor
DIAGNO	31100	mutado	r-valui
AREB1	n	1	0,125
	%	10%	
AREB2	n	1	
	%	10%	
LMA	n	1	
	%	10%	
RCMD	n	4	
	%	40%	
RCUD (AR)	n	1	
	%	10%	
RCUD (NR)	n	0	
	%	,0%	
RCUD (TR)	n	2	
	%	20%	
Total	n	10	
	%	100,0%	

Nota: Teste estatístico se refere ao qui-quadrado para uma única variável

Fonte: A Autora, 2015

Segundo os dados da tabela 12, os diagnósticos CRDM (29,3%), CRDU (AR) (19,5%) e LMA (19,5%) foram os mais freqüentes para os pacientes com mutação *ASXL1*, representando 80%, p<0,05.

Tabela 12 - Teste de aderência Qui-quadrado do Diagnóstico (uma variável) nos pacientes com mutação no *ASXL1*

DIAGNĆ	OOITR	ASXL1	P-valor
DIAGNO	31100	mutado	i -vaioi
AREB1	REB1 n		0,022*
	%	2,4%	·
AREB2	n	3	
	%	7,3%	
LMA	n	8	
	%	19,5%	
RCMD	n	12	
	%	29,3%	
RCUD (AR)	n	8	
	%	19,5%	
RCUD (NR)	n	3	
	%	7,3%	
RCUD (TR)	n	6	
	%	14,6%	
Total	n	41	
	%	100,0%	
·		<u> </u>	·-

Nota: Teste estatístico se refere ao qui-quadrado para uma única variável

Fonte: A Autora, 2015

Ao analisar a associação entre fibrose medular e a presença de mutação nos genes *TP53* e *ASXL1*, observamos que estas variáveis foram independentes entre si, ou seja, não estão associadas, pois p-valor foi superior a 0,05. (Tabela 13).

Tabela 13 - Teste qui-quadrado da associação entre fibrose e os genes *TP53* e *ASXL1*

Cono			fibros	fibrose MO		
	Gene		não	sim	P-valor	
	mutado	n	10	0	0,317	
TP53	mulado	%	100,0%	,0%		
17 00	não mutado n	n	33	6		
	nao mulado	%	84,6%	15,4%		
	mutado	n	35	6	0,576	
ASXL1	mulauo	%	85,4%	14,6%		
	não mutado	n	9	0		
	nao mulado	%	100,0%	,0%		

Fonte: A Autora, 2015

A análise bivariada mostrou que não foi encontrada associação estatisticamente significante entre a presença de mutação nos genes *TP53* e *ASXL1* e o sexo do paciente (p>0,05). (Tabela 14).

Tabela 14 - Teste qui-quadrado da associação entre sexo e os genes *TP53* e *ASXL1*

	Gene	SE	SEXO		
	Gene		Feminino	Masculino	P-valor
	mutado	N	5	5	0,462
TP53	mulado	%	50%	50%	
1755	não	Ν	27	13	
	mutado	%	67,5%	32,5%	
	mutado	Ν	26	15	1,000
ASXL	mulado	%	63,4%	36,6%	
ASXL	não	Ν	6	3	
	mutado	%	66,7%	33,3%	

Nota: Teste estatístico se refere ao teste exato de Fisher

Fonte: A Autora, 2015

Quanto às plaquetas, os pacientes com menos de 100.000/mm³ plaquetas não apresentaram diferença entre os pacientes com mais de 100.000/mm³ plaquetas em relação à mutação de genes *TP53* e *ASXL1* (Tabela 15).

Tabela 15 - Teste qui-quadrado da associação entre plaquetas e os genes *TP53* e *ASXL1*

	Gene	PLA	PLAQUETAS		
	Gene		Normal	< 100.000	P-valor
	mutado	N	2	8	0,091
TP53	mulauo	%	20,0%	80,0%	
1733	não	Ν	24	16	
	mutado	%	60,0%	40,0%	
	mutado	Ν	20	21	0,467
ASXL1	mulauo	%	48,8%	51,2%	
ASALI	não	Ν	6	3	
	mutado	%	66,7%	33,3%	

Fonte: A Autora, 2015

Na análise bivariada, não foi observada associação entre anemia (Hb< 10g/dL) e a presença de mutação nos genes *TP53* e *ASXL1* (p>0,05). (Tabela 16).

Tabela 16 - Teste qui-quadrado da associação entre hemoglobina e os genes *TP53* e *ASXL1*

	Cono		H	Hb		
	Gene		Baixa	Normal	P-valor	
	Mutado	N	7	3	0,7301	
TP53	เทนเลนบ	%	70,0%	30,0%		
17 00	não mutado	N	25	15		
	nao mulado	%	62,5%	37,5%		
	Mutado	N	25	16	0,459	
ASXL1	เทนเลนบ	%	61,0%	39,0%		
	não mutado	N	7	2		
	nao mulado	%	77,8%	22,2%		

Nota: Teste estatístico se refere ao teste exato de Fisher

Fonte: A Autora, 2015

Em relação à taxa de neutrófilos, não foi encontrada associação com presença de mutação nos genes *TP53* e *ASXL1* (p>0,05). (Tabela 17).

Tabela 17 - Teste qui-quadrado da associação entre Neutrófilos e os genes *TP53*, *ASXL1*

Gene -			Neut	rófilos	
	Gene		Baixo	Normal	P-valor
	mutado	N	3	7	0,479
TP53	mulado	%	30,0%	70,0%	
1703	não mutado	Ν	19	21	
	Hao Hiutauo	%	47,5%	52,5%	
	mutado	Ν	19	22	0,713
ASXL1	mulado	%	46,3%	53,7%	
	não mutado	Ν	3	6	
	nao mulado	%	33,3%	66,7%	

Fonte: A Autora, 2015

Também não foi observada associação entre o óbito e a presença de mutação nos genes *TP53* e *ASXL1* (p>0,05). (Tabela 18).

Tabela 18 - Teste qui-quadrado da associação entre óbito e os genes *TP53* e *ASXL1*

	0		Ób	oito	
Gene			Vivo	Óbito	P-valor
	mutada	N	6	4	0,717
TP53	mutado	%	60,0%	40,0%	
1700	não mutado	Ν	27	13	
	Hao Hiutauo	%	67,5%	32,5%	
ASXL1	mutado	n	26	15	0,699
	mutauo	%	63,4%	36,6%	
AGALT	não mutado	n	7	2	
	nao mulado	%	77,8%	22,2%	

Nota: Teste estatístico se refere ao teste exato de Fisher

Fonte: A Autora, 2015

Ao analisar a necessidade transfusional e a presença de mutação nos genes nos gens *TP53* e *ASXL1*, não foi observada associação estatisticamente significativa. (p> 0,05) (Tabela 19).

Tabela 19 - Teste qui-quadrado da associação entre necessidade transfusional e os genes *TP53* e *ASXL1*

				sidade usional	
	Gene		não	sim	P-valor
	mutado	n	5	5	1,000
TDEO	mulado	%	50,00%	50,00%	
TP53	não	n	19	21	
	mutado	%	47,50%	52,50%	
40)// 4	mutado	n	19	22	0,463
		%	46,3%	53,7%	
ASXL1	não	n	6	3	
	mutado	%	66,7%	33,3%	

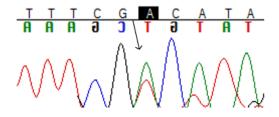
Fonte: A Autora, 2015

Entre as avaliações moleculares, o gene *TP53* apresentou alterações em 10 (20%) pacientes. Entre as mutações detectadas, dez foram trocas de base única e duas foram inserções. No códon 204 houve inserção de uma timidina, resultando na modificação da conformação final da proteína (Glu68Val). No códon 216 houve inserção de uma guanina, resultando na modificação da conformação final da proteína (Pro72Ala).

Dos dez pacientes com mutação no gene *TP53*, um (paciente 24) teve diagnóstico de AREB2, recebeu tratamento com agente hipometilante e foi encaminhado para realização de transplante alogênico. Está internado nesse momento com doença enxerto x hospedeiro. Outro (paciente 25) teve diagnóstico de AREB1, recebeu terapia com agente hipometilante e evoluiu para óbito em decorrência de sepse. Os pacientes números 28, 29, 33 e 38 apresentam CRDU e estão em acompanhamento com conduta expectante. O paciente 49 teve diagnóstico de CRDM e também está em observação. Os outros dois faleceram de complicações decorrentes da doença hematológica, sendo um em progressão (paciente 40) – LMA refratária aos esquemas quimioterápicos - e o outro, com diagnóstico prévio de CRDM, por sepse (paciente 37).

As descrições e os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento podem ser verificados na Tabela 20 e Figuras 1-3.

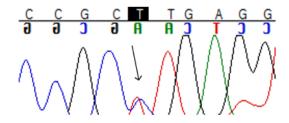
Figura 1 - TP53 exon 7 - c. 711 T>A Met237Li



Legenda: sequenciamento do exon 7, gen TP53

Fonte: A Autora, 2015

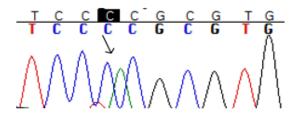
Figura 2 - TP53 exon 6 - c.669 C>T, Pro223L



Legenda: sequenciamento do exon 6, gen TP53

Fonte: A Autora, 2015

Figura 3 - TP53 exon 4 - c.216InsG 216, Pro72Ala



Legenda: sequenciamento do exon 4, gen TP53

Tabela 20 - Mutações encontradas no gene TP53 (exon 4 a 9)

Paciente	Mutação	Mudança na proteína	Variação
24	TP53	c.204InsT, p.Glu68Val	Mudança de leitura - "frameshift"
25	TP53	c.747G>A, p.Arg249Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
28	TP53	c.216InsG, p.Pro72Ala	Mudança de leitura - "frameshift"
28	TP53	c.747G>A, p.Arg249Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
29	TP53	c.747G>A, p.Arg249Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
33	TP53	c.639A>G, p.Arg213Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
37	TP53	c.669C>T, p.Pro223Leu	Perda de sentido - "missense"
37	TP53	c.747G>A, p.Arg249Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
37	TP53	c.711T>A, p.Met237Lis	Perda de sentido - "missense"
38	TP53	c.747G>A, p.Arg249Arg	Variante rs1800372 – sinônimo
40	TP53	c.669C>T, p.Pro223Leu	Perda de sentido - "missense"
49	TP53	c.384T>A, p.Pro128Pro	Variante rs1800372 – sinônimo

Fonte: A Autora, 2015

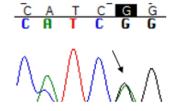
Para o gene *ASXL1* foram encontradas somente mutações de troca de base única. As descrições dessas mutações estão detalhadas na Tabela 21 e Figuras 4-13.

Tabela 21 - Mutações encontradas no gene ASXL1 (exon 12)

ASXL1 exon12	Paciente	Mutação	Mudança na proteína	Variação
fragmento 1	1	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	1	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	3	ASXL1	c.1963A>C, p.Tre654Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	4	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	4	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	5	ASXL1	c.1846G>A, p.Asp615Asn	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	5	ASXL1	c.1963A>C, p.Tre654Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	5	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	5	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	6	ASXL1	c.1963A>C, p.Tre654Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	6	ASXL1	c.2032A>C, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	6	ASXL1	c.2047A>C; p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	9	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	9	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 4	10	ASXL1	c.3306G>T, p.Glu1102Asp	Variante rs139115934 – "missense"
fragmento 1	11	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	11	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	11	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	12	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	12	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	12	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	13	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	13	ASXL1	c.2047A>C, p.Tris673F10	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	14	ASXL1	•	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	14	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 2	16	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Variante rs35712951 - sinônimo
	16		c.2250C>T, p.Pro750Pro	
fragmento 6		ASXL1	c.22A>G, 3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3' prime UTR variant"
fragmento 1	17	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	17	ASXL1	c.2032A>G,p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	18	ASXL1	c.2047A>C, p.Thr682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	20	ASXL1	c. 2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	20	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	20	ASXL1	c.2047A>C, p.Thr682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	20	ASXL1	c.1963C>A, p.Tre654Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	20	ASXL1	c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 6	21	ASXL1	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	23	ASXL1	c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	23	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	23	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	23	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	24	ASXL1	c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	24	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	24	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	24	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	25	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	25	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	27	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	27	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	27	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 2	27	ASXL1	c.2250C>T, p.Pro750Pro	Variante rs35712951 - sinônimo
fragmento 1	28	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	28	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 3	28	ASXL1	c.2985C>T, p.His995His	Variante rs62206933 - sinônimo
fragmento 1	29	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	30	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	30	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	31	ASXL1	c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"

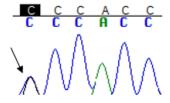
ASXL1 exon12	Paciente	Mutação	Mudança na proteína	Variação
fragmento 1	31	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	31	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 6	31	ASXL1	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	32	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	32	ASXL1	c.2032A>G,p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	33	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	33	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 6	34	ASXL1	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	35	ASXL1	c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	35	ASXL1	c.2021G>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	35	ASXL1	c.2032G>A, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	35	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	36	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	36	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	36	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 3	37	ASXL1	c.3029C>T, p.Thr1010Met	Variante rs116112525 – "missense"
fragmento 3	38	ASXL1	c.2985C>T, p.His995His	Variante rs62206933 - sinônimo
fragmento 1	39	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	39	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	41	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	41	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	41	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	42	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	42	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 6	42	ASXL1	c.22A>G, p.3 primeUTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	43	ASXL1	c.1960G>C,p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	43	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	43	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
	43	ASXL1		Perda de sentido – "missense"
fragmento 1			c.1960G>C, p.Ala653Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	44	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	
fragmento 1	44	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	44	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	45	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	45	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	45	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 5	45	ASXL1	c.3973C>T, p.Leu1325Phe	Variante rs6057581 – "missense"
fragmento 1	46	ASXL1	c.2021A>C,p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	46	ASXL1	c.2032A>G,p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	46	ASXL1	c.2047A>C, p.Tre682Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	47	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	47	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 6	47	ASXL1	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	48	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	48	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 5	48	ASXL1	c.3759T>C, p.Ser1253Ser	Variante rs4911231 - sinônimo
fragmento 6	48	ASXL1	c.22A>G, p.3 prime UTR variant	Variante rs2295764 "3'prime UTR variant"
fragmento 1	49	ASXL1	c.2021A>C, p.His673Pro	Perda de sentido – "missense"
fragmento 1	49	ASXL1	c.2032A>G, p.Arg677Gli	Perda de sentido – "missense"
fragmento 3	49	ASXL1	c.2985C>T, p.His995His	Variante rs62206933 - sinônimo

Figura 4 - ASXL1 - c. 1924 G>A Gli642Arg



Fonte: A Autora, 2015

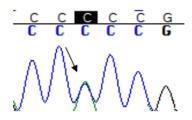
Figura 5 - ASXL1 - c. 1960 G>C Ala653Pro



Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

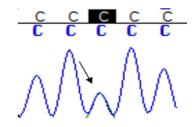
Fonte: A Autora, 2015

Figura 6 - ASXL1 - c. 1963 A>C Tre654Pro



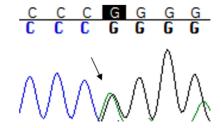
Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

Figura 7 - ASXL1 - c. 2021 A>C His673Pro



Fonte: A Autora, 2015

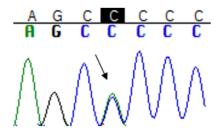
Figura 8 - ASXL1 - c. 2032 A>G Arg677Gli



Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

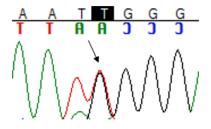
Fonte: A Autora, 2015

Figura 9 - ASXL1 - c. 2047 A>C Tre682Pro



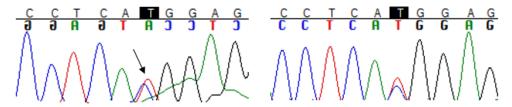
Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

Figura 10 - ASXL1 - c. 2110 G>T Gli703Trp



Fonte: A Autora, 2015

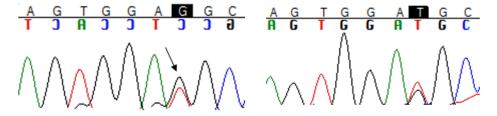
Figura 11 - ASXL1 - c. 3029 C>T Thr1010Met



Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

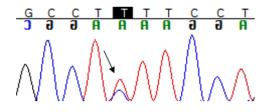
Fonte: A Autora, 2015

Figura 12 - ASXL1 - c. 3306 G>T Glu1102Asp



Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

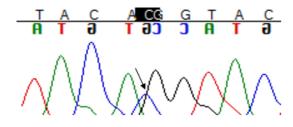
Figura 13 - ASXL1 - c. 3973 C>T Leu1325Phe



Fonte: A Autora, 2015

Para os genes NRAS/KRAS foi encontrada somente uma mutação para o gene NRAS, do tipo inserção. No códon 279 houve inserção de uma citosina, resultando na modificação da conformação final da proteína (Arg97The). O paciente com mutação no NRAS teve diagnóstico de CRDU e apresenta-se clinicamente estável, sem necessidade transfusional e sem uso de terapia específica.

Figura 14 - NRAS - c.lns279C Arg97The



Legenda: sequenciamento do gen ASXL1

Fonte: A Autora, 2015

A estimativa de sobrevida global para os pacientes do grupo com mutação no gen *ASXL1*, em 2 anos, foi de 66,4% enquanto que para os pacientes do grupo sem mutação foi de 77,8%. Em 5 anos, a estimativa de sobrevida global para os pacientes do grupo com mutação no gene *ASXL1* foi de 55,3% ao passo que para os pacientes sem mutação foi de 77,8%, conforme mostrado no Gráfico 1. Do ponto de vista estatístico, não foi observada diferença significativa nas probabilidades de sobrevida global em relação aos grupos estudados (Tabela 22).

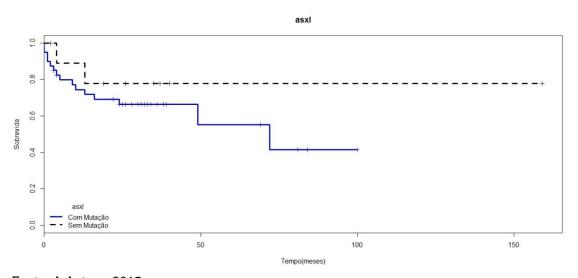
Tabela 22 - Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier para os pacientes com e sem mutação no gen *ASXL1*.

ASXL1		Sobrevio	da Global	
ASALI	N	2 anos (%)	5 anos (%)	P-valor
Grupo				
Com				
Mutação	41	66,4%	55,3%	0,373
Sem				
Mutação	9	77,8%	77,8%	

Nota: p-valor: nível descritivo do teste log rank.

Fonte: A Autora, 2015

Gráfico 1 - Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier para os pacientes com e sem mutação no gene *ASXL1*.



Fonte: A Autora, 2015

A estimativa de sobrevida global para os pacientes do grupo com mutação no gene *TP53*, em 2 anos, foi de 63,6% e para os pacientes do grupo sem mutação foi de 70%. Em 5 anos, a estimativa de sobrevida global para os pacientes do grupo com mutação no gene *TP53* foi de 63,6% e para os pacientes do grupo sem mutação foi de 52,5%, conforme mostrado no Gráfico 2. Do ponto de vista estatístico, não foi observada diferença significativa nas probabilidades de sobrevida global em relação aos grupos estudados (Tabela 23).

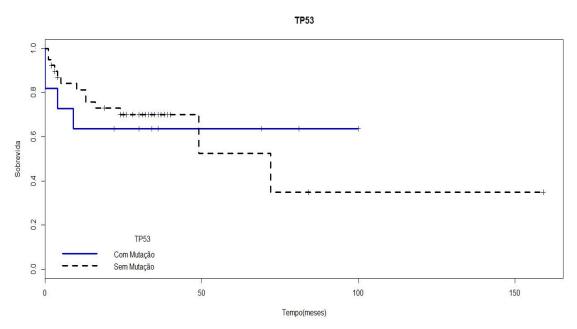
Tabela 23 - Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier para os pacientes com e sem mutação no gene *TP53*.

TP53		Sobrevio	la Global	
1733	N	2 anos (%)	5 anos (%)	P-valor
Grupo Com				
Mutação Sem	10	63,6%	63,6%	0,931
Mutação	40	70,0%	52,5%	

Nota: p-valor: nível descritivo do teste log rank.

Fonte: A Autora, 2015

Gráfico 2 - Análise de sobrevida global por meio da técnica de Kaplan-Meier para os pacientes com e sem mutação no gene *TP53.*



5 DISCUSSÃO

Publicações recentes apontam para a importância da pesquisa de mutações genéticas em neoplasias hematológicas (Bejar *et al*, 2011, Thol *et al*, 2011, Murati *et al*, 2012, Papaemmanuil *et al*, 2013). Nas SMDs, a proliferação clonal de células hematopoéticas, que perdem a sua capacidade de diferenciar, pode ter como gatilho um evento molecular ainda não elucidado. Tal gatilho desencadearia alterações nos mecanismos de sinalização e proliferação celular, propiciando a leucemogênese.

Neste estudo foram avaliados os genes *ASXL1, NRAS/KRAS* e *TP53* por apresentarem diversidade nas funções das proteínas codificadas, sendo o *TP53* um gene supressor tumoral, o *NRAS* um oncogene e o *ASXL1* um gene envolvido na regulação da metilação. Além disso, estes são alguns dos genes mais estudados e com maior frequência de mutações descritas recentemente (Rocquain *et al*, 2009, Bejar *et al*, 2011, Cazzola *et al*, 2013, Bravo *et al*, 2014).

Dos pacientes analisados, 84% (42 pacientes) deles apresentaram algum tipo de mutação, sendo a mutação no *ASXL1* a mais frequente (82%), seguida pelo *TP53* (20%) e *NRAS* (2%).

A frequência de mutação do ASXL1 varia entre 10 a 20% (Itzykson et al, 2013, Cazzola et al, 2013, Fenaux et al, 2014) e tal mutação está associada com pior prognóstico. Thol et al, em 2011, estudaram 193 pacientes com diagnóstico de SMD e concluiram que a presença de mutação no gene ASXL1 estava associada a maior risco de progressão para LMA e sobrevida global reduzida. No presente estudo encontramos uma frequência maior de mutação no ASXL1 (82%). Boultwood et al (2010) apontaram que havia associação entre a gravidade da doença e a frequência da mutação do ASXL1. Os autores encontraram 6% de casos mutados no grupo de anemia refratária, 31% no grupo de anemia refratária com excesso de blastos 1 e 2, e 23% no grupo de LMA secundária à SMD. No presente estudo, não observamos associação entre o aumento na frequência da mutação e a piora nos subgrupos da classificação WHO. Em relação à sobrevida global, não encontramos associação entre a presença de mutação no gene ASXL1 e sobrevida reduzida. O grupo com mutação no ASXL1 apresentou sobrevida global de 66,4% comparado ao grupo não mutado que foi de 77,8%. Nosso dado foi concordante com Wang et al (2013) que avaliaram 153 pacientes chineses com SMD para mutação no AXSL1 e

não encontraram diferença entre os grupos mutado e não mutado no que diz respeito a citopenias, percentual de blastos na medula óssea, dependência transfusional, progressão para LMA e sobrevida global.

Bejar et al (2011) avaliaram 439 pacientes com SMD e identificaram mutações somáticas em 18 genes. As mutações nos genes TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 e ASXL1 seriam preditoras de menor sobrevida global, independente de fatores de risco já estabelecidos. Ainda nesse estudo, as mutações no TP53 foram associadas com pior desfecho (sobrevida reduzida), trombocitopenia mais grave e aumento no percentual de blastos medulares. Na populaçãodo presente estudo, foram encontrados 20% de pacientes com mutação no TP53 que apresenta concordância com os estudos recentes, onde a frequência varia de 5% a 10% (Itzykson et al, 2013, Cazzola et al, 2013, Fenaux et al, 2014). Entretanto, alguns autores apontam maior frequência de mutação no TP53 quando estratificam grupos de alto risco (IPSS intermediário 2 e alto) ou com citogenética de mau prognóstico. Bally et al (2014) avaliaram 62 pacientes com SMD de alto risco e LMA e encontraram 37% de casos mutados para TP53. Já em estudo publicado em 2013, Kulasekararaj et al, mostraram que o aumento da frequência de mutação do TP53 estava relacionada à citogenética de mau prognóstico, ao IPSS, maior proporção de blastos e progressão leucêmica. Foram encontrados 9,4% de casos mutados no grupo estudado, porém quando foi isolado o grupo com citogenética de mau prognóstico esse valor chegou a 72%. Em nosso grupo, não encontramos relação entre o estado mutacional do TP53 e a estratificação entre os grupos de IPSS, possivelmente porque tivemos um baixo índice de metáfases na análise citogenética, o que prejudicou a estratificação de risco pelo IPSS em 42% dos casos.

Vários estudos (Wattel *et al*, 1994, Kaneko *et al*, 1995, Odenike *et al*, 2011, Kulasekararaj *et al*, 2013) apontam para uma progressão mais rápida de doença associada com a mutação no *TP53*, assim como pior sobrevida global e citopenias mais intensas. No presente estudo não encontramos diferença entre o grau das citopenias quando comparados os grupos mutado e não mutado. Em relação à sobrevida global também não encontramos relação entre a presença de mutação, sendo o grupo mutado com 63,6% e o não mutado com 70%.

A fibrose de medula óssea é descrita como fator de mau prognóstico em algumas publicações (Buesche et al, 2008, Della Porta et al, 2009). No presente

trabalho, não houve associação entre a presença de fibrose de medula e o *status* mutacional.

A dependência transfusional tem-se mostrado um fator prognóstico independente em pacientes com SMD, podendo ser considerado como um índice confiável da gravidade da doença (Malcovati *et al*, 2005, Malcovati *et al*, 2007). Malcovati *et al* (2005) estudaram 467 pacientes, entre 1992 e 2002, e evidenciaram que os pacientes que eram dependentes transfusionais tinham uma sobrevida global inferior àqueles independentes de transfusão. A sobrevida global dos pacientes dependentes transfusionais foi significativamente menor que a dos pacientes independentes transfusionais (OR = 2,16; p< 0,001). E a sobrevida livre de progressão para LMA também foi significativamente pior nos pacientes dependentes transfusionais (OR= 2,02; p< 0,001). Entretanto, neste estudo não observamos associação entre a necessidade transfusional e o *status* mutacional (Tabela 19).

Revisões recentes apontam que a mutação no *NRAS/KRAS* pode ser encontrada em 5% a 10% dos pacientes com SMD (Cazzola *et al*, 2013, Itzykson *et al*, 2013, Fenaux *et al*, 2014). Neste estudo, houve apenas um caso com mutação no *NRAS*, e nenhuma no *KRAS*. O paciente com mutação no *NRAS* teve diagnóstico de CRDU e apresenta-se clinicamente estável, sem necessidade transfusional e sem uso de terapia específica. Nosso dado foi concordante com Al-Kali *et al* (2013), onde o impacto prognóstico da mutação do *RAS* foi estudado retrospectivamente em 1067 pacientes com SMD. Nesse trabalho foi evidenciado que a mutação do *RAS* era evento pouco frequente na SMD (<4%) e que não havia associação entre a presença da mutação e a sobrevida global ou resposta a tratamento. Entretanto, em estudos conduzidos por Bejar (Bejar *et al*, 2011, Bejar *et al*, 2011) os pacientes com mutação no *NRAS* apresentaram pior prognóstico, particularmente nos grupos de baixo risco. Nestes últimos, a presença da mutação levou a uma sobrevida global reduzida à despeito da estratificação do IPSS, sugerindo que o estado mutacional do *NRAS* possa ser um fator de risco isolado.

Em relação ao tratamento, 18% (9 pacientes) dos pacientes receberam quimioterapia com esquemas direcionados à LMA, sendo que destes, 3 pacientes foram submetidos à transplante alogênico de medula óssea. Dois deles estão vivos e em remissão de doença. Um faleceu em decorrência de complicações inerentes ao transplante. Dos seis pacientes restantes com diagnóstico inicial de LMA, cinco faleceram e um encontra-se em remissão de doença após quimioterapia

convencional. Dos outros 41 pacientes, cinco receberam tratamento com agentes hipometilantes. Desses, apenas 1 paciente foi encaminhado à transplante alogênico de medula óssea e, atualmente, está internado com doença enxerto x hospedeiro. Os outros quatro pacientes faleceram, sendo 3 por sepse e um por progressão de doença. Do restante, 10 pacientes encontram-se em suporte transfusional, um em uso de eritropoietina e 25 pacientes estão sem terapia específica, com conduta expectante.

A despeito dos diversos estudos e das mutações já descritas em associação com citopenias e sobrevida reduzida, ainda não foi encontrada uma mutação que esteja implicada diretamente na patogenia das síndromes mielodisplásicas. O presente estudo não encontrou diferenças significativas entre os grupos mutado e não mutado no que diz respeito à necessidade transfusional, fibrose medular, presença de citopenias, sexo e sobrevida global. Possivelmente devido ao tempo reduzido de acompanhamento que abrangeu a presente pesquisa. Como próximo passo deste trabalho, seguiremos a pesquisa molecular de forma mais detalhada com o intuito de definir se as mutações encontradas representam polimorfismos ou mutações somáticas. O grupo de pesquisadores seguirá o acompanhamento desses pacientes e, em futuro próximo, deverá aumentar a lista de genes estudados, além de recrutar mais pacientes e voluntários para um estudo caso-controle.

Como potenciais fatores complicadores dos resultados do nosso estudo, apontamos que cerca de 42% dos pacientes não apresentaram metáfase na citogenética, prejudicando o cálculo do IPSS e a estratificação de risco. Além da falta de alguns exames que não são realizado rotineiramente no HUPE e que inviabilizaram o cálculo do IPSS-R (beta2-microglobulina e ferritina). O tempo reduzido de acompanhamento dos pacientes – apenas 2 anos - também pode ter contribuído para alguns resultados conflitantes com a literatura. Temos o planejamento de seguir esse acompanhamento a longo prazo, recrutando mais pacientes e aumentando a lista de genes estudados para uma análise futura mais robusta.

CONCLUSÃO

A heterogeneidade nos achados clínicos e morfológicos das SMD reflete a diversidade e a complexidade das alterações genéticas subjacentes à doença. A avaliação das alterações moleculares tem sido alvo de diversos estudos na busca de uma nova ferramenta prognóstica. Neste estudo foram observadas diferenças entre os grupos mutado e não mutado no que diz respeito à necessidade transfusional, fibrose medular, presença de citopenias, sexo e sobrevida global. Esperamos que o acompanhamento desse grupo a longo prazo mostre tais alterações de maneira mais significativa.

Financiamento:

Rede de pesquisa em métodos moleculares em diagnóstico e prognóstico de neoplasias, FAPERJ.

REFERÊNCIAS

Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. Cancer Cell. 2012;22(2):180-193.

Al-Kali A, Quintás-Cardama A, Luthra R et al. Prognostic impacto f RAS mutation in patients with myelodysplastic syndrome. Am. J. Hematol. 2013; 88:365–369.

Bejar R, Ebert BL. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2010; 24: 295 – 315.

Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. J. Clin. Oncol. 2011; 29 (5): 504 – 515.

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N. Engl. J. Med. 2011; 364: 2496-506.

Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower risk myelodysplastic syndromes. J. Clin. Oncol. 2012; 30(27): 3376-3382.

Bennett JM, Catovsky, D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br. J. Haematol. 1982; 51: 189-199.

Bernstein SH, Brunetto VL, Davey FR, et al. Acute myeloid leukemia-type chemotherapy for newly diagnosed patients without antecedent cytopenias having myelodysplastic syndrome as defined by French–American–British criteria: a Cancer and Leukemia Group B Study. J. Clin. Oncol. 1996;14:2486–94.

Boultwood J, Lewis S, Wainscoat JS. The 5q-syndrome. Blood 1994;84: 3253–60.

Boultwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutations of the polycombassociated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. Leukemia 2010; 24:1062-1065.

Bravo GM, Lee E, Merchan B, et al. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: advances in pathogenesis and disease evolution. Br. J. Haematol. 2014; 166: 646-659.

Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J & Vardiman JW (eds.). World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th. Lyon: IARC Press, 2008; 88-93.

Buesche G, Teoman H, Wilczak W, et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2008;22(2):313–322.

Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. Leukemia 2010; 24: 469–473.

Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. Blood 2013; 122 (25): 4012-4034.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype and a poor prognosis. J. Clin. Oncol. 2001; 19(5):1405-13.

Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. J. Clin. Oncol. 2009;27(5):754–762.

Espigado I, Marín-Niebla A, Pérez-Hurtado JM, et al. Hemopoietic Stem Cell transplantation in Childhood: Reduction in Mortality and Improvement of Survival Over the Years. Transplant. Proc. 2005; 37:1555-1556.

Estey E, Pierce S, Kantarjian H, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with AML-type chemotherapy. Leuk. Lymphoma 1993;11(Suppl. 2):59–63.

Fenaux P, Kelaidi C. Treatment of the 5q- Syndrome. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2006: 192 – 198.

Fenaux P, Giagoudinis A, Selleslag D, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with low-intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with del5q. Blood 2011; 118:3765-3776.

Fenaux P, Adès L. How we treat lower-risk myelodysplastc syndromes. Blood 2013; 121(21): 4280-4286

Fenaux P, Haase D, Sanz GF, Santini V, Buske C. Myelodysplastic syndromes: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol. 2014; 1-13.

Fenaux P, Adès L. Myelodysplastic syndromes. Lancet 2014; 383:2239-2252.

Fernandez TS, Abdelhay E, de Souza FT, Ornellas MH, Otero L, Tabak D. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. Leuk. Res. 2000; 24: 839-848.

Fisher WB, Armentrout SA, Weisman R Jr, GrahamRC Jr. "Preleukemia". A myelodysplastic syndrome often terminating in acute leukemia. Arch. Intern. Med. 1973 Aug; 132(2):226-32.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. Br. J. Haematol. 2009;145(6):788-800.

Giagounidis AA, Germing U, Aul C .Biological and Prognostic Significance of Chromosome 5q Deletions in Myeloid Malignancies. Clin. Cancer Res. 2006; 12(1): 5 – 10.

Giagounidis A, Mufti GJ, Fenaux P et al. Results of a randomized, double-bind study of romiplostin versus placebo in patients with low and intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. Cancer 2014 April 4 (epub ahead of print).

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International prognostic scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 1997; 89: 2079-88.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognosis score system for myelodysplastic syndrome. Blood 2012; 120 (12): 2454-2465.

Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood 2007; 110:4385–4395.

Haase D. Cytogenetic subtypes of MDS – Molecular background, prognostic relevance and therapeutic consequences. Cancer Treatment Reviews (2007) 33, S25–S30.

Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, et al. The inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) is frequently accompanied by alterations of the RUNX1, KRAS and NRAS and NF1 genes and mediates adverse prognosis both in MDS and in AML: a study in 39 cases of MDS or AML. Leukemia 2011; 25:874–877.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House Virginia, November 1997. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 3835–3849.

Horiike S, Misawa S, Nakai H, et al. N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. Leukemia 1994; 8: 1331 – 1336.

Horiike S, Kita-Sasai Y, Nakao M, et al. Configuration of the TP53 gene as independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome. Leuk. Lymphoma 2003; 44(6): 915-922.

Issa JP. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. Blood. 2013;121(19):3811-3817.

Itzykson R, Kosminder O, Fenaux P. Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2013; 26: 355-364.

Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. J. Clin. Oncol. 2013;31(19):2428-2436.

Jadersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. J. Clin. Oncol. 2011;29(15):1971-1979.

Kaneko H, Misawa S, Horiike S, et al. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. Blood 1995; 85(8): 2189-93.

Karavitaki N, Lembessis P, Tzanela M, et al. Molecular staging using qualitative RT-PCR analysis detecting thyreoglobulin mRNA in the peripherical blood of patients with differentiated thyroid câncer after therapy. Anticancer Res. 2005; 4:3135-3142.

Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of cromossome 5 and correlate with adverse prognosis. Br. J. Haematol. 2013; 160: 660-672.

Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. Leukemia 1995; 9:370–381.

List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. N. Engl. J. Med. 2006; 355:1456-1465.

Malcovati L, Della-Porta MG, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. J. Clin. Oncol. 2005; 23:7594-7603.

Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic score system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J. Clin. Oncol. 2007; 25:3503-3510.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16(3):1215.

Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, et al. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. Ann. Hematol. 2008; 87:527-536.

Murati A, Brecqueville M, Devillier R, et al. Myeloid Malignancies: mutations, models and management. BMC Cancer 2012; 12: 304.

Odenike O, Le Beau MM. The Dawn of the Molecular Era of the Myelodysplastic Syndromes. N. Engl. J. Med. 2011; 364(26): 2545-2546.

Olivia EN, Santini V, Zini G et al. Eltrombopag fot the treatment of thrombocytopenia of low and intermediate-1 IPSS risk myelodysplastic syndrome: results of a prospective, randomized trial. Haematologica 2013;98 (Suppl1):s1110.

Panani AD, Roussos C. Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications. Cancer Lett. 2005; 235: 177–190.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood 2013; 122 (22): 3616-3627.

Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, et al. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. Blood 1993; 82: 590 – 599.

Pellagatti A, Benner A, Mills KI, et al. Identification of gene expression based prognostic markers in the hematopoietic stem cells of patients with myelodysplastic syndromes. J. Clin. Oncol. 2013;31(28):3557-3564.

Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP & Rodgers GM (eds.). Wintrobe's Clinical Hematology. 11th. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 2004; 3-25.

Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, et al.Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. BMC Cancer 2010, 10:401-408.

Rosati S, Mick R, Xu F, et al. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an 'unclassifiable' myelodysplastic syndrome. Leukemia 1996;10:20–6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and T. Maniatis. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saami MI, Linman JW. Preleukemia. The hematologic syndrome preceding acute leukemia. Am. J. Med. 1973; 55(1):38-48.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. 1977;74 (12):5463-5467.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 1971; 2: 971-972.

Sekeres MA. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2010; 24:287-294.

Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. Cytogenet Genome Res. 2013; 141: 1-6.

Sole F, Espinet B, Sanz GF, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. Br. J. Haematol. 2000; 108: 346-356.

Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic Significance of ASXL1 Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. J. Clin. Oncol. 2011; 29 (18):2499-2506.

Tothova Z, Steensma DP, Ebert BL. New Strategies in Myelodysplastic Syndromes: *Application of molecular diagnostics to clinical practice.* Clin. Cancer Res. 2013; 19(7): 1637–1643.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002; 100: 2292–2302.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009; 114:937-951.

Vardiman J. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. Leuk. Res. 2012; 36: 1453–1458.

Wang J, Ai X, Gale RP, et al. TET2, ASXL1 e EZH2 mutations in Chinese with myelodysplastic syndromes. Leuk. Res. 2013; 37: 305-311.

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. Blood 1994; 84: 3148-3157.

Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: The diagnostic interface. Leuk. Res.2007; 31:1461–1468.

APENDICE – Screening of mutations in the additional sex combs like 1,transcriptional regulator, tumor protein p53, and *KRAS*proto-oncogene, *GTPase/NRAS* proto-oncogene, *GTPase*genes of patients with myelodysplastic syndrome (Artigo publicado)

Screening of mutations in the additional sex combs like 1, transcriptional regulator, tumor protein p53, and KRAS proto-oncogene, GTPase/NRAS proto-oncogene, GTPase genes of patients with myelodysplastic syndrome

CAROLINA LEITE¹, LUCAS DELMONICO², GILDA ALVES², ROMARIO JOSÉ GOMES²,
MARIANA RODRIGUES MARTINO², ALINE RODRIGUES DA SILVA², ALINE DOS SANTOS MOREIRA³,
MARIA CHRISTINA MAIOLI¹, LUCIANO RIOS SCHERRER⁴, ELENICE FERREIRA BASTOS⁵,
ROBERTO IRINEU⁶ and MARIA HELENA ORNELLAS²

¹Haematology Service, Pedro Ernesto University Hospital;
 ²Circulating Biomarkers Laboratory, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20550-170;
 ³Bioinformatics and Functional Genomic Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900;
 ⁴Department of Engineering and Production, Kennedy Faculty, Belo Horizonte 31535-040;
 ⁵Department of Medical Genetic, Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 22250-020;
 ⁶Pedro II School, Realengo II Campus, Rio de Janeiro 21710-261, Brazil

Received June 13, 2017; Accepted July 28, 2017

DOI: 10.3892/br.2017.965

Abstract. Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal bone marrow disorders characterized by ineffective hematopoiesis, different degrees of cellular dysplasia, and increased risk of progression to acute myeloid leukemia. International Prognostic Scoring System is the gold standard for MDS classification; however, patients exhibiting different clinical behaviors often coexist in the same group, indicating that the currently available scoring systems are insufficient. The genes that have recently been identified as mutated in MDS, including additional sex combs like 1, transcriptional regulator (ASXL1), tumor protein p53 (TP53), and KRAS proto-oncogene and GTPase (KRAS)/NRAS proto-oncogene, GTPase (NRAS), may contribute to a more comprehensive classification, as well as to the prognosis and progression of the disease. In the present study, the mutations in the ASXL1, TP53 and NRAS/KRAS genes in 50 patients were evaluated by sequencing genomic bone marrow DNA. Nine patients (18%) presented with at least one type of mutation. Mutations in

Correspondence to: Mr. Lucas Delmonico, Circulating Biomarkers Laboratory, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Av. Prof Manuel de Abreu, 444, 4° andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20550-170, Brazil

E-mail: lucasdelmonico@gmail.com

Key words: myelodysplastic syndrome, additional sex combs like 1, transcriptional regulator, tumor protein p53, and KRAS proto-oncogene, GTPase/NRAS proto-oncogene, GTPase

TP53 were the most frequent in six patients (12%), followed by ASXLI in two patients (4%) and NRAS in one patient (2%). The nine mutations were detected in patients with low- and high-risk MDS. The screening of mutations in MDS cases contributes to the application of personalized medicine.

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is characterized by multiple cellular events, including cell clonality, ineffective hematopoiesis, apoptosis, and increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) (1). The pathogenesis remains unclear, although previous studies have investigated the genetic signatures that may explain its origin (2-5).

Diagnosis continues to be based on morphological (cytopenias in blood count associated with the degree of dysplasia and blast percentage in myelogram) and cytogenetic findings (6). Overall, diagnostic criteria enable the stratification of patients into risk groups according to the International Prognostic Scoring System (IPSS) (7). Other scoring systems emerged, such as the WHO classification-based Prognostic Scoring System in 2005 (8), which added transfusion support as a novel criterion to those that were already established by the IPSS. IPSS-R (9) was created in 2012, adding further variables, such as lactate dehydrogenase (LDH), ferritin, β_2 microglobulin, marrow fibrosis, comorbidities and performance status. Even after the introduction of these novel parameters, it remains clear that patients with different clinical behaviors coexist in the same IPSS and IPSS-R group, indicating that improvement of the prognostic scoring system is still required.

The evaluation of molecular changes in the pathogenesis of MDS has been the subject of a number of studies (10,11). In such

studies, the gene, additional sex combs like 1, transcriptional regulator (*ASXLI*), located in the chromosome 20q11 region has been described as the most frequently mutated gene in advanced MDS, with rates ranging from 10 to 23% (4,5,12-14).

Similarly, located mutations in the gene *NRAS* proto-oncogene, *GTPase* (NRAS; located on chromosome 1p13.2) were identified in \sim 8-35% of patients with MDS, and were associated with the worst prognosis and a higher rate of leukemic transformation (15,16).

Another gene, tumor protein p53 (TP53) located in chromosomal region 17p13, is the most frequently mutated gene among neoplastic diseases, as it is important in the integrity of the genome. In MDS, these mutations are observed in \sim 10-15% of cases, although this frequency may be higher in patients exposed to alkylating agents or radiation (17). These mutations that inactivate the TP53 gene are associated with advanced disease, complex karyotype, and resistance to treatment, all of which lead to a poor prognosis (17,18).

The aim of the present study was to investigate the presence of mutations in *ASXL1* (exon 12), *TP53* (exon 4-8) and *NRAS/KRAS* proto-oncogene and *GTPase* (*KRAS*; exon 1,2) genes from 50 patients with MDS, through the extraction and sequencing of genomic bone marrow DNA. In addition, the clinical consequences of the mutations that were revealed in the cohort are discussed.

Materials and methods

Patients. A total of 50 patients [18/50 (36%) men and 32/50 (64%) women] diagnosed with MDS and AML secondary to MDS, treated at the Pedro Ernesto University Hospital (HUPE; Rio de Janeiro, Brazil) from 2012 to 2014 were included in the present study. The mean age was 56-years-old (standard deviation, 19 years) and 57-years-old (standard deviation, 19 years), for men and women, respectively.

All patients underwent concomitant bone marrow studies for morphological analysis, according to the WHO criteria (1), and cytogenetic (19) and molecular analyses. Patients provided informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the scientific analysis of the samples was approved by the Ethics Committee of the Pedro Ernesto University Hospital (code no. CAAE 08084712.4.00 00.5259). To validate possible mutations and polymorphisms (germline changes) of the evaluated genes, the peripheral blood of 129 eligible healthy control subjects [38/129 (29%) men and 91/129 (71%) women] were collected in HUPE (Rio de Janeiro, Brazil). The mean age was 57-years-old (standard deviation, 13 years) and 51-years-old (standard deviation, 10 years), for men and women, respectively.

DNA sequencing. Isolation of bone marrow cells was performed with erythrocyte lysis solution (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ and 10 mM NaCl) at 4°C. The extraction of genomic DNA was performed according to standard protocol (20).

For the amplification of exon 12 of the ASXL1 and KRAS/NRAS genes, the basic solution contained ultra-pure and sterile water (36.5 μ l), 5 μ l 10X STR buffer (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA USA); 2 μ l dNTPs (10 mM; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 2.5 μ l MgCl₂ (50 mM; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific,

Inc.), 2.5 μ l of primer set at a concentration of 10 pmol/ μ l; 0.5 μ l Taq DNA polymerase (1 U/ μ l; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 50-100 ng/ μ l genomic DNA with a final volume of 50 μ l. The primers were described previously by Rocquain *et al* (5).

In the Axygen-1000 thermal cycler, the amplifications of the fragments were initiated with a pre-denaturation of 5 min at 94°C followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, annealing of the primers at 58°C for 40 sec, and extension at 72°C for 45 sec; and terminated with an extension step at \approx 72°C for 10 min. For the amplifications of fragments 4, 5 and 6 of the ASXLI gene, the same reactions and cycling conditions were used, differing by the use of the enzyme, Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and the increase of the annealing temperature to 61°C. For amplification of the KRASI gene, fragment 1, and the NRAS2 gene, fragment 2, the same reactions and cycling conditions were used; however, the annealing temperature was increased to 55°C.

To amplify exons 4-8 of the TP53 gene, the basic solution contained 35 μ l of ultra-pure, sterile water, 5 μ l 10X STR buffer, 2 μ l dNTPs (10 mM), 3 μ l of MgCl₂ (50 mM), 3 μ l of the pair of primers for each region to be amplified (concentration, 10 pmol/ μ l), 0.5 μ l of the enzyme DNA polymerase (1 U/ μ l) and 50-100 ng/ μ l genomic DNA. The primers were designed using GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih. gov/nuccore/NC_000017.9/, access no. NC_000017-9; Table I).

The polymerase chain reaction (PCR) products were purified using the PCR kit, GFX™ DNA and Gel Band Purification kit (cat. no. 28903470, GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK). Subsequent to purification, sequences were loaded onto an ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Comparisons were made between the reference sequences of genes ASXL1, NRAS, KRAS and TP53 (accession nos. NC_00001405.26, NG_007572.1, NG_007524.1 and NC_000017-9, respectively; GenBank) using the sample sequences obtained by sequencing. All samples were sequenced in duplicate and the mutations were confirmed. This comparison was performed using Sequencher version 5.1 program (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA).

Statistical analysis. Contingency tables were used to associate mutation with sex, age, mortality, bone marrow fibrosis, hematologic alterations, and need for transfusion. The χ^2 and Fisher's exact test was adopted to evaluate the statistical significance of the association between these variables.

A contingency table was used to assign the case and control groups with genotypes CC, CG, and GG, in exon 4 of the TP53 gene (R72P polymorphism). The Pearson χ^2 test was adopted to analyze the statistical significance of the association between these variables.

The survey data were processed in the statistical program Predictive Analytics Software (PASW Statistics 18; Quarry Bay, Hong Kong). In all statistical tests used, the significance level was set at 5%. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Patients. Of the patients analyzed, 18/50 (36%) were men and 32/50 (64%) were women. The mean age was 57-years-old

Table I. Primer sequences of the TP53 gene.

Exon TP53	Forward	Reverse	Product size, bp
4	5'-TGAGGACCTGGTCCTCTGAC-3'	5'-AGAGGAATCCCAAAGTTCCA-3'	413
5	5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3'	5'-AGCAATCAGTGAGGAATCAG-3'	310
6	5'-TGGTTGCCCAGGGTCCCCAG-3'	5'-CGGAGGGCCACTGACAACCA-3'	224
7	5'-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA-3'	5'-AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA-3'	237
8	5'-TTGGGAGTAGATGGAGCCCT-3'	5'-AGAGGCAAGGAAAGGTGATA-3'	337

TP53, tumor protein p53.

Table II. Clinical and hematologic characteristics of patients [n=50; age, 57 years (range, 19-90 years)] in the present study.

Variables	Total,
Sex	
Male	18
Female	32
Hb (g/dl)	
<10	10
≥10	25
No follow up	3
Platelet $(x1,000/\mu l)$	
<100,000	24
≥100,000	23
No follow up	3
Neutrophil count	
<1,000	35
≥1,000	11
Missing	4
WHO classification 2008	
AML	9
RCUD (refractory anemia)	11
RCUD (refractory neutropenia)	3
RCUD (refractory thrombocytopenia)	7
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	14
RAEB1	1
RAEB2	3
Unclassified	2
International Prognostic Scoring System	
Low/Intermediate grade 1	18
Intermediate grade 2/high	3
Transformation to AML	9
Missing	20
Succumbed	
Yes	16
No	29
No follow up	6

AML, acute myeloid leukemia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RAEB, refractory anemia with excess blast.

(range, 19-90 years) with a median of 61 years (standard deviation, 15 years). The clinical and hematologic characteristics of patients are presented in Table II.

DNA sequencing. Of the 50 patients evaluated, 9/50 (18%) harbored mutations in one of the target genes. Mutation in the TP53 gene was the most frequent in 6/50 patients (12%), followed by ASXL1 in 2/50 patients (4%), and NRAS in 1/50 patients (2%). Table III summarizes the mutations that were detected. The R72P polymorphism in exon 4 of the TP53 gene was analyzed, but no statistical significance was identified (Table IV).

Treatment. Regarding treatment, 9/50 (18%) of the patients with AML received chemotherapy. Of these patients, 5/9 (55%) succumbed and one is in disease remission following conventional chemotherapy. The three remaining patients underwent allogeneic bone marrow transplantation; two of these patients are alive and in disease remission; however, the third patient succumbed due to complications of the

For the 5/50 (10%) cases receiving treatment with hypomethylating agents, one patient was referred for allogeneic bone marrow transplantation and currently has graft versus host disease. The other four patients succumbed; three due to sepsis and one due to disease progression. Of the remaining group, 10/50 patients (24%) were in transfusion support, 1/50 (2%) were using erythropoietin, and 25/50 patients (50%) were not undergoing a specific type of therapy, but were treated with a more conservative approach. Table III presents the treatment information of the mutated cases.

Furthermore, no statistical associations between hematological, and survival of the cases with mutation and those without mutation.

Discussion

ASXL1, TP53 and KRAS/NRAS were investigated in the present study, as they are considered to be significant in the evolution of MDS. TP53 is an imperative tumor suppressor gene, ASXL1 is involved in the regulation of DNA methylation, and KRAS/ NRAS are involved in important proliferation pathways. These are also some of the most analyzed genes, with the highest frequency of mutations described in MDS (2-5). In the present study, 9/50 (18%) cases exhibited mutations in these genes. The most frequent mutations were observed in the TP53 gene

Table III. Summary of the mutations.

Gene	Case no.	Classification (WHO 2008)	Nucleotide change/ amino acid change	Sex	Age (years)	Survival (months)	Treatment
Additional sex combs like 1, transcriptional regulator	29	AML RCUD (RT)	c.1846G>A, D615N c.1923C>T, I641I	ᄪᄪ	4 %	16 (succumbed) 110 (alive)	Decitabine No specific therapy with conservative approach
Tumor protein p53	20 24	RCMD Refractory anemia	c.384T>A, P128P c.204InsT, O68V	TH TH	89 E	No follow-up 40 (alive)	No specific therapy with conservative approach Azacitidine + Exiade® + allogeneic bone
	,	with excess blast 2	,				marrow transplantation
	5 58 1 8	RCUD (RT)	c.216InsA, A72T	Z;	70	44 (alive)	No specific therapy with conservative approach
	3.7	Unknown	c.669C>T, P223L	Z Z	Z 5	0 (succumbed)	No specific therapy with conservative approach
	7	AiviL	C.009(>1, F223L	IVI	16	+ (saccampea)	7+5 + FLAC-LDA + Intoxantone, etoposite and intermediate-dose Ara-C
	49	RCMD	c.384T>A, P128P	\mathbb{Z}	19	32 (alive)	No specific therapy with conservative approach
NRAS proto-oncogene, GTPase	38	RCUD (RT)	c.Ins279C, R97T	Щ	89	46 (alive)	No specific therapy with conservative approach
AML, acute myeloid leukemia; RCL	JD, refractory	cytopenia with unilineage	e dysplasia; RT, refractory th	hrombocy	rtopenia; RC	MD, refractory cytope	AML, acute myeloid leukemia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RT, refractory thrombocytopenia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; E, female; M, male.

Table IV. Summary of R72P polymorphism in exon 4 of the tumor protein p53 gene, in the cases (n=50) and control subjects (n=129).

	G	roup	
Genotype	Cases, n (%)	Controls, n (%)	P-value ^a
CC	7 (14)	25 (19)	
CG	20 (40)	60 (47)	0.318
GG	23 (46)	44 (34)	

[6/50 patients (12%)], followed by in *ASXL1* [2/50 patients (4%)] and *NRAS* [1/50 patients (2%)].

The frequency of TP53 mutation ranges from 5 to 10% (4,12,21,22-24). However, certain studies demonstrated that those with poor prognosis, high cytopenias, complex karyotype, chromosome 17 abnormalities and del(5q) have a higher frequency of mutation in TP53 when high-risk groups are stratified (International Prognostic Scoring System) (25). A recent study by Devillier et al (24) examined 125 cases of AML with myelodysplasia changes and reported that 28 (22%) exhibited mutations in TP53, with the majority of cases being from the high-risk group. Conversely, the present study observed the TP53 mutations in just 2/50 (4%) high-risk patients (the other four patients were low risk; Table III). Furthermore, in the present study, the majority of mutations identified in the TP53 gene were missense. Regarding the mutations of the TP53 gene, none have been described in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer database, except for the substitution, c.384T>A, P128P, observed in two of the present study cases. This mutation was first described by Andersen et al (26) in metastatic breast cancer.

Further to the polymorphism of exon 4 of the TP53 gene (Arg72Pro), the study by Machado-Neto et al (27), evaluating 77 cases of MDS and 103 control subjects, indicated that this polymorphism was not associated with clinical and laboratory parameters, disease progression, and overall survival. Similarly, in the present study, no association between the Arg72Pro polymorphism and the increasing risk for MDS was identified in this population (Table IV; P=0.318) nor with clinical and laboratory parameters. By contrast, McGraw et al (28), investigating 705 MDS patients from different populations (United States, Canada, Spain, Germany and England), demonstrated that the C-allele homozygosity in del(5q) MDS was associated with prolonged overall and progression-free survival, as well as non-terminal interstitial deletions that excluded 5q34. Conversely, G-allele homozygosity was associated with inferior outcomes and terminal deletions involving 5q34 (P=0.05). In addition, McGraw et al (29) described the correlation of the TP53 single nucleotide polymorphism with survival in cases of non-del(5q) MDSs. Utilizing a novel functional SNP scoring system ranging from +2 to -2 based upon predicted p53 activity, the authors demonstrated the difference between the role of TP53 gene polymorphism R72P in del(5q) MDS patients and MDS patients with normal chromosome 5 (29).

The frequency of mutation in ASXL1 ranges from 10 to 23% (4,5,12-14,22) and is associated with a worse prognosis. ASXL1 gene mutations affect histone modifications via their interaction with polycomb complex 2, together with enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit gene mutations and are involved in epigenetic dysregulation, which alters gene expression and acts as a major driver in the pathogenesis of MDS. ASXL1 gene mutations are also frequent in cases of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) and therefore prevalent in disorders other than MDS, thus, an isolated mutation in this gene cannot be considered diagnostically helpful. ASXL1 mutation is more common in chronic myelomonocytic leukemia (CMML; 40% of cases) and is associated with leukemic transformation (30).

Thol et al (13) followed 193 patients diagnosed with MDS and concluded that the presence of mutations in ASXL1 was associated with the increased risk of progression to AML, and reduced the rates of overall survival. In another study, Boultwood et al (12) demonstrated an association between the increased risk group and the frequency of ASXL1 mutation. Furthermore, the authors observed 6% of mutated cases in the refractory anemia group, 31% in the refractory anemia with excess blasts 1 and 2 groups, and 25% in the AML group (12). Although the frequency of mutation in the gene ASXL1 in the present study was lower, this fact is justified due to the number of cases studied herein. However, consistent with the previous study (12), the presence of mutation in the ASXL1 gene, and the risk of AML and poor prognosis were observed in one of two cases evaluated in the present study (Table III).

Concerning the NRAS/KRAS genes, previous reviews demonstrated mutations at a frequency of 5 to 10% of patients with MDS, and are more common in CMML (15%) and correlate strongly with the percentage of bone marrow blasts (4,22,30). In the present study, only one case was identified as having a mutation in NRAS. This particular patient was diagnosed with refractory cytopenia with unilineage dysplasia and is clinically stable, with no transfusion required and receiving no specific therapy. These data were consistent with that of Al-Kali et al (31), where the prognostic impact of the NRAS mutation was investigated in 1,067 patients with MDS. The authors indicated that the mutation in the NRAS gene was an infrequent event in MDS and there was no association between the presence of the mutation and overall survival or response to treatment. However, in studies conducted by Bejar et al (2,21), patients exhibiting mutations in the NRAS gene exhibited a worse prognosis, particularly in groups of low risk where the presence of the mutation led to a reduced overall survival, indicating that the mutational status of NRAS may be an isolated risk factor.

With regard to the additional clinical hematologic data, bone marrow fibrosis has been described as a poor prognostic factor in previous studies (32,33) and contributes to the risk stratification that is proposed by the IPSS-R (34). In the present study, no association was identified between fibrosis and mutational status (data not shown). Furthermore, transfusion dependency has been demonstrated as an independent prognostic factor in MDS patients and may be considered a reliable index of disease severity (8,30,33). Malcovati et al (8) evaluated 467 patients between 1992 and 2002, and identified that patients who were transfusion-dependent had a lower overall survival when compared with transfusion-independent patients

[odds ratio (OR)=2.16; P<0.001). Survival without progression to AML was significantly worse in transfusion-dependent patients (OR=2.02; P<0.001). In the present study, nine cases of transfusion-dependency were identified (data not shown), although no association was observed with severity of the disease or with the mutational data.

In conclusion, the results indicate that alterations in the ASXL1, TP53 and NRAS genes may occur in early stages of the MDS disease. Furthermore, genetic testing at the time of initial evaluation aids with establishing a diagnosis and provides additional, clinically relevant information. The present study hypothesizes that the combination of mutations in these genes may contribute to the progression of the disease; however, a study with a larger number of cases from the Brazilian population is required to validate the current findings.

Acknowledgements

The authors would like to thanks the patients involved in the present study and the laboratory technicians at the Hematology Service, Pedro Ernesto University Hospital (Rio de Janeiro, Brazil). This study was supported by the Programa de Oncobiologia (Rio de Janeiro, Brazil; no grant number).

References

- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, et al: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. Blood 114: 937-951, 2009.
- 2. Bejar R, Levine R and Ebert BL: Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 29: 504-515, 2011.
- 504-515, 2011.

 3. Bravo GM, Lee E, Merchan B, Kantarjian HM and García-Manero G: Integrating genetics and epigenetics in myelo-dysplastic syndromes: Advances in pathogenesis and disease evolution. Br J Haematol 166: 646-659, 2014.
- 4. Cazzola M, Della Porta MG and Malcovati L: The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. Blood 122: 4021-4034, 2013.
- Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, Tadrist Z, Olschwang S, Vey N, Birnbaum D, et al: Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. BMC Cancer 10: 401-408, 2010.
- 6. Fenaux P, Haase D, Sanz GF, Santini V and Buske C; ESMO Guidelines Working Group: Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 25 (Suppl 3): iii57-iii69, 2014.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, et al: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 89: 2079-2088, 1997.
- 8. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Bernasconi P, et al: Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making J Clin Oncol 23: 7594-7603, 2005.
- 9. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, et al: Revised
- international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood 120: 2454-2465, 2012.

 10. Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, Dicker F, Alpermann T, Kern W and Schnittger S: The inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) is frequently accompanied by alterations of the RUNXI, KRAS and NRAS and NFI genes and mediates adverse prognosis both in MDS and in AML: A study in 39 cases of MDS or AML. Leukemia 25: 874-877, 2011.

 Odenike O and Le Beau MM: The dawn of the molecular era of the myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 364: 2545-2546, 2011.

myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 364: 2545-2546, 2011.

12. Boultwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXLI in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. Leukemia 24: 1062-1065, 2010.

Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, et al: Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 29: 2499-2506, 2011.
 Chen TC, Hou HA, Chou WC, Tang JL, Kuo YY, Chen CY,

- 14. Chen TC, Hou HA, Chou WC, Tang JL, Kuo YY, Chen CY, Tseng MH, Huang CF, Lai YJ, Chiang YC, et al: Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. Blood Cancer J 4: e177, 2014.
- syndrome. Blood Cancer J 4: e177, 2014.

 15. Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, Kahan J, Lübbert M, Lazcano O, Isaac G, McCormick F and Koeffler HP: N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. Blood 82: 590-599, 1993.
- Horiike S, Misawa S, Nakai H, Kaneko H, Yokota S, Taniwaki M, Yamane Y, Inazawa J, Abe T and Kashima K: N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. Leukemia 8: 1331-1336, 1994.
- Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, Wattel E and Fenaux P: Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgramulopoïesis and a high incidence of P53 mutations. Leukemia 9: 370-381, 1995.
 Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H and Kashima K: TP53
- Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H and Kashima K: TP53
 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome
 and are associated with complex chromosomal abnormalities.
 Blood 85: 2189-2193, 1995.
- Simons A, Shaffer LG and Hastings RJ: Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. Cytogenet Genome Res 141: 1-6, 2013.
 Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular Cloning:
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, et al: Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 364: 2496-2506, 2011.
 Itzykson R, Kosmider O and Fenaux P: Somatic mutations and
- Itzykson R, Kosmider O and Fenaux P: Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. Best Pract Res Clin Haematol 26: 355-364, 2013.
- Pract Res Clin Haematol 26: 355-364, 2013.

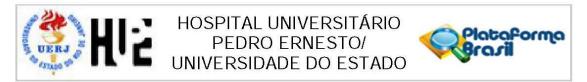
 23. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, Gäken J, Pennaneach C, Ireland R, Czepulkowski B, et al: TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. Br J Haematol 160: 660-672, 2013.

- 24. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, Prebet T, Bertoli S, Brecqueville M, Arnoulet C, et al: Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leucemias with myelodysplasia-related changes. Oncotarget 6: 8388-8396, 2015.
- changes Oncotarget 6: 8388-8396, 2015.

 25. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Pejsova B, Votavova H, Merkerova MD, Zemanova Z, Brezinova J, Mikulenkova D, Lauermannova M, et al: TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. Oncotarget 7: 36266-36279, 2016.
- Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L and Børresen AL: Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. Br J Cancer 68: 540-548, 1993.
- 27. Machado-Neto JA, Traina F, De Melo Campos P, Andreoli-Risso MF, Costa FF and Olalla Saad ST: Lack of association between MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms with clinical outcomes in myelodysplastic syndrome. Neoplasma 59: 530-535, 2012.
 28. McGraw KL, Zhang LM, Rollison DE, Basiorka AA, Fulp W,
- McGraw KL, Zhang LM, Rollison DE, Basiorka AA, Fulp W, Rawal B, Jerez A, Billingsley DL, Lin HY, Kurtin SE, et al: The relationship of TP53 R72P polymorphism to disease outcome and TP53 mutation in myelodysplastic syndromes. Blood Cancer J 5: e291. 2015.
- McGraw KL, Cluzeau T, Sallman DA, Basiorka AA, Irvine BA, Zhang L, Epling-Burnette PK, Rollison DE, Mallo M, Sokol L, et al: TP53 and MDM2 slignle nucleotide polymorphisms influence survival in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. Oncotareet 6: 34437-34445. 2015
- Oncotarget 6: 34437-34445, 2015.

 30. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccia N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H, et al: ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 151: 365-375, 2010.
- Al-Kali A, Quintás-Cardama A, Luthra R, Bueso-Ramos C, Pierce S, Kadia T, Borthakur G, Estrov Z, Jabbour E, Faderl S, et al: Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome. Am J Hematol 88: 365-369, 2013.
- Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Passamonti F, Invernizzi R, Castello A, Magrini U, et al: Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 27: 754-762, 2009.
 Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H,
- 33. Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H, Wilkens L, Göhring G, Schlegelberger B, Bock O, Georgii A, et al: Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia 22: 313-322, 2008.
- 34. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, et al: Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 25: 3503-3510, 2007.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Analise da prevalencia de mutações nos genes TET2, RUNX1, TP53, ASXL1,

NRAS/KRAS em pacientes com sindrome mielodisplasica no Estado do Rio de Janeiro

e sua correlação com prognostico

Pesquisador: Carolina de Andrade Leite

Área Temática: Versão: 2

CAAE: 08084712.4.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 129.864 Data da Relatoria: 14/11/2012

Apresentação do Projeto:

OK

Objetivo da Pesquisa: Informado de forma correta

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Informado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem elaborado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Fornecidos após solicitação do CEP

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

TCLE com as alterações solicitadas pelo CEP foi submetido. Está de acordo com o solicitado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030

UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO



PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO



Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comité, após análise das mudanças propostas.
- 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
- 3. O Comité de Ética solicita a V. Sa., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 24 de Outubro de 2012

Assinador por: WILLE OIGMAN (Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030 Município: RIO DE JANEIRO UF: RJ

Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br