



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO
AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
HEMATOLOGIA



ESTUDO MOLECULAR DO ÉXON 10 DO GENE *MPL* EM PACIENTES COM
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE

DEBORAH CANTÉ DE AQUINO

MANAUS – AM

2023

DEBORAH CANTÉ DE AQUINO

**ESTUDO MOLECULAR DO ÉXON 10 DO GENE *MPL* EM PACIENTES COM
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Andrea Monteiro Tarragô

MANAUS – AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

A657ee Aquino, Deborah Canté de
ESTUDO MOLECULAR DO ÉXON 10 DO GENE
MPL EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA
ESSENCIAL E MIELOFIBROSE / Deborah Canté de
Aquino. Manaus : [s.n], 2023.
86 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do
Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Mourão, Lucivana Prata de Souza

Coorientador: Tarragô, Andrea Monteiro

1. W515L. 2. W515K. 3. Receptor de
trombopoietina. 4. Neoplasias mieloproliferativas. I.
Mourão, Lucivana Prata de Souza (Orient.). II. Tarragô,
Andrea Monteiro (Coorient.). III. Universidade do Estado
do Amazonas. IV. ESTUDO MOLECULAR DO ÉXON 10
DO GENE MPL EM PACIENTES COM
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 014/2023

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Ao trigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google, a Defesa de Dissertação da discente **Deborah Canté de Aquino** sob o título: “**Estudo molecular do éxon 10 do gene MPL em pacientes com Trombocitemia essencial e Mielofibrose**”, tendo como orientadora a Prof.^a Dr.^a Lucivana Prata de Souza Mourão e coorientadora a Prof.^a Dr.^a Andréa Monteiro Tarragô, segundo encaminhamento da Prof.^a Dr.^a Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. ^a Dr. ^a Lucivana Prata de Souza Mourão Presidente (UEA/HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: <i>Lucivana Mourão</i> CPF: 600.963.572-15
Prof. ^a Dr. ^a Maria Edilene Martins de Almeida Membro (FIOCRUZ /HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: <i>Maria Edilene M. de Almeida</i> CPF: 811.309.102-53
Prof. ^a Dr. ^a Maria da Conceição Freitas dos Santos Membro (UEA)	Aprovado(a) <input type="checkbox"/> () Reprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (X)	Assinatura: _____ CPF: 456.392.482-20

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA DA CONCEICAO FRETAS DOS SANTOS
Data: 31/08/2023 18:14:34-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

(X) Aprovado

() Não Aprovado

Lucivana Mourão

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico esse estudo a:

Todos os pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM, que lutam todos os dias pela vida;

Aos doadores que sempre se dispõem a compartilhar de seus materiais biológicos, em virtude da saúde do próximo;

E a minha avó-mãe Maria de Castro Canté (*in memoriam*) que com muito amor e carinho, me criou e me ensinou a nunca desistir dos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pai todo poderoso que por intermédio do Espírito Santo, me guiou até este momento acadêmico.

A meus avós Sonirto Galúcio Canté e Maria de Castro Canté que me educaram como filha, e sempre me incentivaram a estudar.

A minha mãe Dinair de Castro Canté Sales que muito jovem fez a melhor escolha em amor, de me proporcionar ser educada pelos seus pais.

As minhas tias Nair de Castro Canté Pimentel e Dinomar de Castro Canté, que ajudaram minha avó na minha educação.

A minha tia Ivanete por sempre estar presente na minha vida como profissional da saúde.

A minha família, esposo Gerlandy Lucas Silva de Aquino que sempre me incentivou nos meus projetos acadêmicos e profissionais. A minha filha Yasmin Canté Silva de Aquino meu combustível de força e garra, que me fez lutar contra tudo e todos para melhorar cada vez mais.

A minha professora e orientadora Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão por confiar em mim este desafio, pela paciência, dedicação e por me ensinar tanto nessa jornada. O meu mais sincero, MUITO OBRIGADA!

A minha coorientadora Dra. Andréa Monteiro Tarragô pela oportunidade de retornar ao meio acadêmico depois de longos 12 anos, sempre ensinando e incentivando. Obrigada pelo desafio!

Ao Dr. George Villarouco por todo auxílio e esclarecimentos durante a análise molecular. Sem seu auxílio essa pesquisa não seria possível.

A todos os professores do PPGH que com muita dedicação se fizeram presentes no modo on-line, e mais ainda no modo presencial. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, da Fundação HEMOAM e serviços terceirizados que muito me ajudaram nessa jornada tão árdua, e tornaram tudo leve. Deus os abençoe!

Aos colegas da turma 10/2021 por serem a maior e melhor turma que eu poderia ter estudado. Galera valeu por tudo!

Aos mais chegados do grupo do zap “Butantã”, sem o apoio, carinho e memes, eu teria enlouquecido. Amo vocês!

A minha equipe de Neoplasias Mieloproliferativas que juntos alcançamos as metas mais curtas que poderíamos conseguir. Gente foi um prazer trabalhar com vocês!

Aos mais próximos Erycka por juntas chorarmos e encrencarmos durante esse período, cheiro mana! Jhey meu menino-velho que sempre ajuda a tia aqui que só vive no modo turbo da Anitta, um abraço apertado!

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA), à Fundação HEMOAM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia pelo ensino e conhecimento técnico que certamente irá contribuir para minha vida acadêmica e profissional.

DECLARAÇÃO DE AGENCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização dos meus estudos de mestrado e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

EPIÍGRAFE

“Faz forte ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansam e se fatigam, e os moços de exaustos caem, mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”

Isaias 40.29-31

RESUMO

Trombocitemia essencial e mielofibrose são neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR::ABL1* negativas caracterizadas por hiperplasia exacerbada de megacariócitos e deposição reativa de tecido conjuntivo fibroso devido a hiperplasia de granulócitos e megacariócitos, respectivamente. Há a presença de variantes genéticas na sequência codificante do gene *MPL* (1p34.2) em ambas as malignidades hematológicas, identificadas em 3% dos pacientes com TE e 8% com MF, as quais comprometem a atividade do receptor de trombopoietina, tornando-o hipersensível e com dimerização independente da interação com o ligante para ativar a sinalização da via JAK-STAT, estimulando de forma constitutiva a proliferação celular, levando ao fenótipo de TE e/ou MF. **Objetivo:** identificar variantes genéticas presentes no éxon 10 do gene *MPL* em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose atendidos da Fundação HEMOAM. **Metodologia:** estudo foi do tipo descritivo-transversal, teve como população de estudo os pacientes com diagnóstico clínico para as neoplasias supracitadas, ambos os sexos, a partir de 18 anos, recrutados entre agosto de 2021 a julho de 2022. Foi feita coleta de sangue periférico para extração de DNA de genômico de granulócitos. A análise molecular foi realizada por meio de sequenciamento de Sanger, com análise de eletroferogramas realizada no software *Geneious* e análise estatística no *Graphpad Prism* para realização das análises de dados demográficos e hematológicos. **Resultados:** 64 pacientes diagnosticados com trombocitemia essencial e mielofibrose foram incluídos. 85,27% dos indivíduos correspondem ao grupo com TE e 14,73% na população com MF. A mediana de idade ficou entre a sexta e a sétima década de vida em ambos os grupos. Houve maior predominância de mulheres em trombocitemia essencial (78,95%), ao passo que em MF houve um equilíbrio entre os gêneros. Pacientes com mielofibrose apresentaram maior frequência de esplenomegalia (57,14%) em comparação a trombocitemia essencial (18,18%). No que tange aos parâmetros hematológicos, o grupo mielofibrose apresentou índices de desidrogenase láctica acima dos níveis de referência, ao passo que trombocitemia essencial demonstrou aumento significativo na contagem de plaquetas. Na análise molecular, não foram identificadas variantes genéticas no éxon 10 do gene *MPL* na população de estudo. **Conclusão:** verificou-se a ausência de variantes no éxon 10 do gene *MPL*. Estudos posteriores devem ser realizados com uma população maior, tendo em vista a baixa frequência de variantes nesse gene em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose. **Palavras-chave:** W515L; W515K; Receptor de trombopoietina; Neoplasias mieloproliferativas.

ABSTRACT

Essential thrombocythemia and myelofibrosis are chronic *BCR::ABL1* negative myeloproliferative neoplasms characterized by exacerbated megakaryocyte proliferation and reactive deposition of fibrous connective tissue due to granulocyte and megakaryocyte hyperplasia, respectively. There are genetic variants in the coding sequence of the MPL gene (1p34.2) in both hematologic malignancies, identified in 3% of patients with essential thrombocythemia and 8% with myelofibrosis, which compromise the thrombopoietin receptor activity, making it hypersensitive and capable of dimerization independently of ligand interaction to activate the JAK-STAT signaling pathway, stimulating cell proliferation constitutively, leading to the phenotype of essential thrombocythemia and/or myelofibrosis.

Objective: To identify genetic variants present in exon 10 of the MPL gene in patients with essential thrombocythemia and myelofibrosis treated at the HEMOAM Foundation.

Methodology: The study was descriptive and cross-sectional, with the study population consisting of patients clinically diagnosed with the aforementioned neoplasms, of both sexes, aged 18 years and older, recruited between August 2021 and July 2022. Peripheral blood was collected for genomic DNA extraction from granulocytes. Molecular analysis was performed through Sanger sequencing, with electropherogram analysis conducted in Geneious software, and statistical analysis in Graphpad Prism for demographic and hematological data analysis.

Results: 64 patients diagnosed with essential thrombocythemia and myelofibrosis were included. 85.27% of individuals corresponded to the essential thrombocythemia group, and 14.73% to the myelofibrosis group. The median age ranged from the sixth to the seventh decade of life in both groups. There was a higher predominance of women in essential thrombocythemia (78.95%), while myelofibrosis showed a balance between genders. Patients with myelofibrosis presented a higher frequency of splenomegaly (57.14%) compared to essential thrombocythemia (18.18%). Regarding hematological parameters, the myelofibrosis group showed lactate dehydrogenase levels above the reference range, while essential thrombocythemia demonstrated a significant increase in platelet count. In the molecular analysis, no genetic variants in exon 10 of the MPL gene were identified in the study population.

Conclusion: The absence of variants in exon 10 of the MPL gene was observed. Further studies should be conducted with a larger population, considering the low frequency of variants in this gene in patients with essential thrombocythemia and myelofibrosis.

Keywords: W515L; W515K; Trombopoietin receptor; Myeloproliferative neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das Neoplasias Mieloproliferativas OMS 2017. ⁵	18
Figura 2: Via de sinalização JAK-STAT	20
Figura 3: Biópsia da medula óssea	21
Figura 4: Biópsia de medula óssea em paciente pré-fibrótico	23
Figura 5: Fibras de reticulina na medula óssea. Rede frouxa de fibras. Coloração Gomori. 24	24
Figura 6: Amostra de biópsia de medula óssea, com hipocelularidade, seios marcadamente dilatados e fibrose medular grave com osteosclerose, estágio avançado	24
Figura 7: Cromossomo 1	26
Figura 8: Configuração tridimensional da proteína Receptor de Trombopoietina	27
Figura 9: Domínios do Receptor de Trombopoietina (TPO, CD110)	27
Figura 10: Representação dos tipos de alteração que ocorrem nas variantes	28
Figura 11: TPO-R alterado na região inferior do domínio transmembrana. A	29
Figura 12: Região no DNA onde os primers serão flanqueados	34
Figura 13: Gel de eletroforese a 1% para o amplicom de 300 pb	38
Figura 14: Eletroferograma do paciente NMP01 com TE representando a ausência de variantes no éxon 10 do gene <i>MPL</i>	39
Figura 15: Eletroferograma do paciente NMP15 com MF representando a ausência de variantes no éxon 10 do gene <i>MPL</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho dos primers para reação de PCR.....	34
Tabela 2: Características sociodemográficas dos participantes do estudo.....	36
Tabela 3: Características clínicas e contagem de plaquetas entre os pacientes de TE e MF	37
Tabela 4: Hemograma dos pacientes com MF.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios de diagnóstico para trombocitemia essencial segundo a OMS 2017.....	22
Quadro 2: Critério diagnóstico para mielofibrose, estágio pré-fibrótico segundo a OMS 2017.....	25
Quadro 3: Critério diagnóstico para mielofibrose, estágio fibrótico evidente segundo a OMS 2017.	25

LISTA DE SIGLAS

A: adenina

BCR-AL1: rearranjo *BCR::ABL1*

C: citosina

CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CARL: gene da calreticulina

CEP: Comitê de Ética e Pesquisa

G: guanina

HEMOAM: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

JAK2: Janus quinase 2

JAK-STAT: Janus Kinase – Transdutora de sinais ativadora de transcrição

LEC-NE: Leucemia eosinofílica não especificada crônica

LMC: Leucemia mieloide crônica

LNC: Leucemia neutrofilica crônica

MF: Mielofibrose

MPL: gene do receptor de trombopoietina

NMNC: Neoplasias mieloproliferativas não-classificáveis

NMP: neoplasias mieloproliferativas crônicas

OMS: Organização mundial de saúde

PV: Policitemia vera

T: timina

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE: Trombocitemia essencial

TPO: trombopoietina

TPO: Receptor de trombopoietina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1. Neoplasias mieloproliferativas.....	18
2.2. Trombocitemia Esencial.....	20
2.3. Mielofibrose.....	23
2.4. Gene <i>MPL</i>	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Tipo e local de estudo.....	31
4.2. População de estudo.....	31
4.3. Convite de pacientes.....	31
4.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão.....	32
4.5. Coleta das amostras.....	32
4.6. Extração de DNA.....	32
4.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
4.9. Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG).....	34
4.10. Sequenciamento de Sanger.....	34
4.11. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Dados demográficos e clínico-laboratoriais.....	36
5.2. Dados moleculares.....	38
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9. ANEXOS.....	56
9.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	56
9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	61
9.3. Protocolo de extração de DNA.....	65
9.4. Protocolo: Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG).....	66
9.5. Preparação do mastex mix para sequenciamento.....	67
9.6. Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol).....	68
9.7. Preparação de amostras pré-leitura no sequenciador.....	68
9.8. Eletroferograma dos pacientes incluídos no estudo.....	69

9.9. Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio83

1. INTRODUÇÃO

Doenças clonais de células-tronco hematopoéticas nas quais há hiperplasia das séries mielóides é a denominação das neoplasias mieloproliferativas crônica (NMP), que possui cerne na presença ou não do cromossomo Philadelphia. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), pacientes *BCR::ABL1* negativos não possuem o cromossomo Philadelphia, porém, abrangem um grupo de indivíduos que contam com mutações somáticas em um grupo de genes, e dentre eles está o *MPL* (4,8). Nesse grupo estão as doenças Trombocitemia Essencial (TE) e a Mielofibrose (MF) que partilham de um dos critérios de diagnóstico em comum, a presença de variantes no gene *MPL*, cuja frequência alélica de variantes é de 3% em pacientes com TE e 8% com MF (6).

A TE é uma neoplasia mieloproliferativa, distinta pela proliferação de megacariócitos que ocasiona o aumento do número de plaquetas no sangue periférico. É destacada clinicamente por eventos trombóticos e/ou hemorrágicos. Os casos ocorrem em adultos com idade em torno de 60 anos, e maior frequência em indivíduos do sexo feminino. Entretanto, há registros de pacientes com 30 anos de idade do sexo feminino. Em crianças, é frequentemente baixa, mas em raros casos como trombocitose hereditária (17,18).

Os critérios diagnósticos para TE segundo a OMS são: contagem de plaquetas $>$ ou igual a $450 \times 10^9/L$; aumento de megacariócitos e ausência de precursores eritróides e da série granulocítica na medula; ausência de critérios para as outras neoplasias mieloproliferativas; presença de variantes nos genes *JAK2*, *CARL* ou *MPL* (6).

Da mesma maneira, a MF trata-se da mais grave das neoplasias mieloproliferativas. Distinta pela hiperplasia de megacariócitos e granulócitos anormais na medula óssea, que fornece uma deposição reativa de tecido conjuntivo fibroso, e hematopoiese extramedular. Apresenta dois estágios: pré-fibrótico, e o fibrótico evidente. Com predomínio em pacientes entre 60-70 anos de idade, afetando igualmente homens e mulheres (23).

Visto que, o gene *MPL*, que codifica proteína Receptora de Trombopoetina (TPO), e é um dos reguladores primários da manutenção de células-tronco hematopoéticas, quando alterado, expressa as variantes W515L e W515K no éxon 10. E são mais frequentes em pacientes com TE e MF (30).

Portanto, este estudo propõe-se a investigar e descrever as variações genéticas, encontradas nos pacientes com TE e MF, atendidos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, afim de que ajude na compreensão das manifestações clínicas, que visa auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na melhor escolha terapêutica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP) são doenças hematopoiéticas clonais cuja característica principal é a hiperplasia de uma ou mais linhagens mielóides ainda na medula óssea. Esse evento produz um elevado número de células maduras no sangue periférico, o qual provoca certo risco de progressão para fases graves como a insuficiência medular (2,3). Com o avanço das tecnologias em análises moleculares em especial na área da genética, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as NMP de acordo com a presença do cromossomo Philadelphia (Figura 1) derivado da translocação dos cromossomos 9 (*ABL1*) e 22 (*BCR*) t(9;22) (q34;q11) que gera o gene de fusão *BCR::ABL1* (1,3,4).

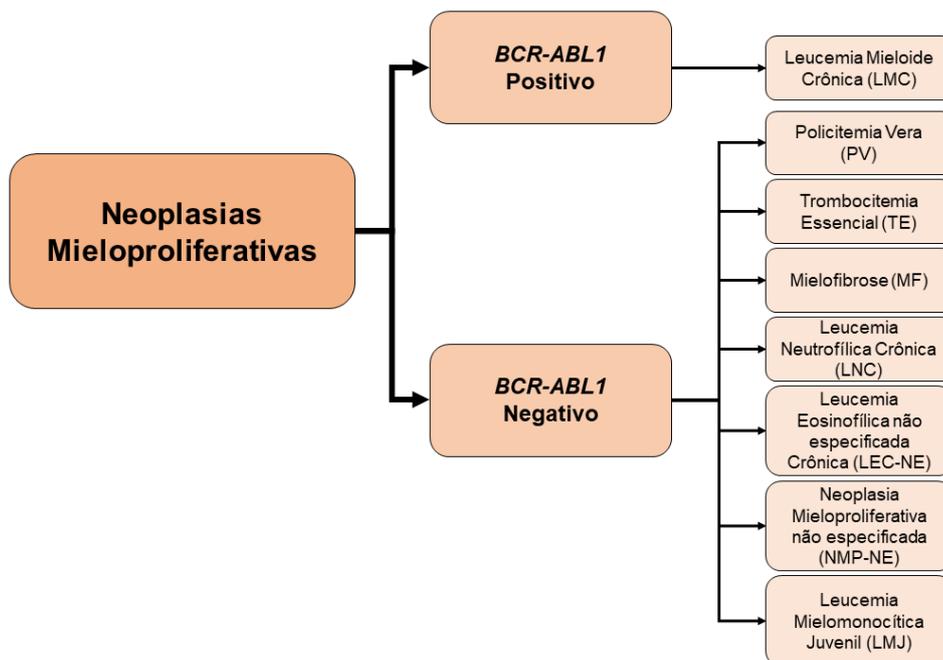


Figura 1: Classificação das Neoplasias Mieloproliferativas OMS 2017.⁵

Fonte: Autoria própria.

Na Leucemia Mieloide Crônica (LMC) o cromossomo Philadelphia que é perceptível nas análises citogenéticas é o rearranjo molecular dos genes *BCR* e *ABL1*, e essa alteração resulta no gene de fusão *BCR::ABL1* (6). Este evento faz com que ocorra a transcrição de um RNA mensageiro (mRNA), que codifica uma proteína quimérica com atividade de tirosina-quinase exacerbada quando comparada com a proteína transcrita pelo gene *ABL1* (1,6). As manifestações clínicas derivadas da fisiopatologia de pacientes *BCR::ABL1* positivos torna a

proliferação mielóide mais reativa do que neoplásica, o que faz com que seja utilizada como um dos critérios principais de classificação da OMS (6,8).

As NMP que não possuem a presença do cromossomo Philadelphia são denominadas como *BCR::ABL1* negativo composta por sete patologias: Leucemia Neutrofílica crônica, Policitemia vera (PV), Mielofibrose (MF), Trombocitemia essencial (TE), Leucemia Eosinofílica crônica não especificada, Neoplasias Mieloproliferativas inclassificáveis e Leucemia Mielomonocítica Juvenil (7).

A respeito das NMP *BCR::ABL1* negativo, as patologias mais frequentes como a PV, TE e MF possuem alteração no gene *JAK2* onde 95% são de pacientes com PV, em pacientes com TE e MF cerca de 50-60% têm a variante *JAK2V617F* (8,9). Ainda sobre os pacientes de TE a frequência de alterações nos genes *CALR* e *MPL* segue em 30% e 3-8% respectivamente (10). E em pacientes com MF a frequência das variantes em *CALR* e *MPL*, fica seguidamente, em torno de 25 a 35% e de 5-10% dos casos (11). Entretanto, há casos de triplo-negativos que não apresentam alterações nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*, que totalizam em 12% desses casos (9,10,11).

As alterações nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* afetam a proliferação e diferenciação celular regular da linhagem mielóide. A função da expressão desses genes está diretamente ligada à ativação constitutiva de cascatas de sinalização intracelular, além também da função transmembrana e receptora das células (8,12).

Uma das cascatas da via de sinalização intracelular é chamada de via JAK-STAT (Janus Kinase – Transdutora de sinais ativadora de transcrição). A ativação das proteínas JAKs, se dá por meio da ligação das citocinas com seus receptores. As JAKs fosforilam resíduos de tirosina do receptor para o citoplasma, o que gera uma sinalização para moléculas chamadas STATs. As STATs quando ativadas por meio dessa sinalização promovida pelas JAKs, são direcionadas para o núcleo celular, onde irão regular a transcrição dos genes alvo (Figura 2). Quando ocorre qualquer alteração nos genes que expressam função na via de sinalização JAK-STAT, seja na interrupção ou na ativação excessiva, pode acarretar em diversas doenças, incluindo as neoplasias (13,14).

Na via de sinalização JAK-STAT, um dos componentes que têm a função primordial, para ativação constitutiva da via de sinalização em células mielóides, é o receptor de trombopoietina, uma proteína produto do gene *MPL*. Alterações nesse gene alteram a conformação da proteína, devido a mudança dos aminoácidos, o que pode inibir ou ativar excessivamente a função da proteína (16,17).

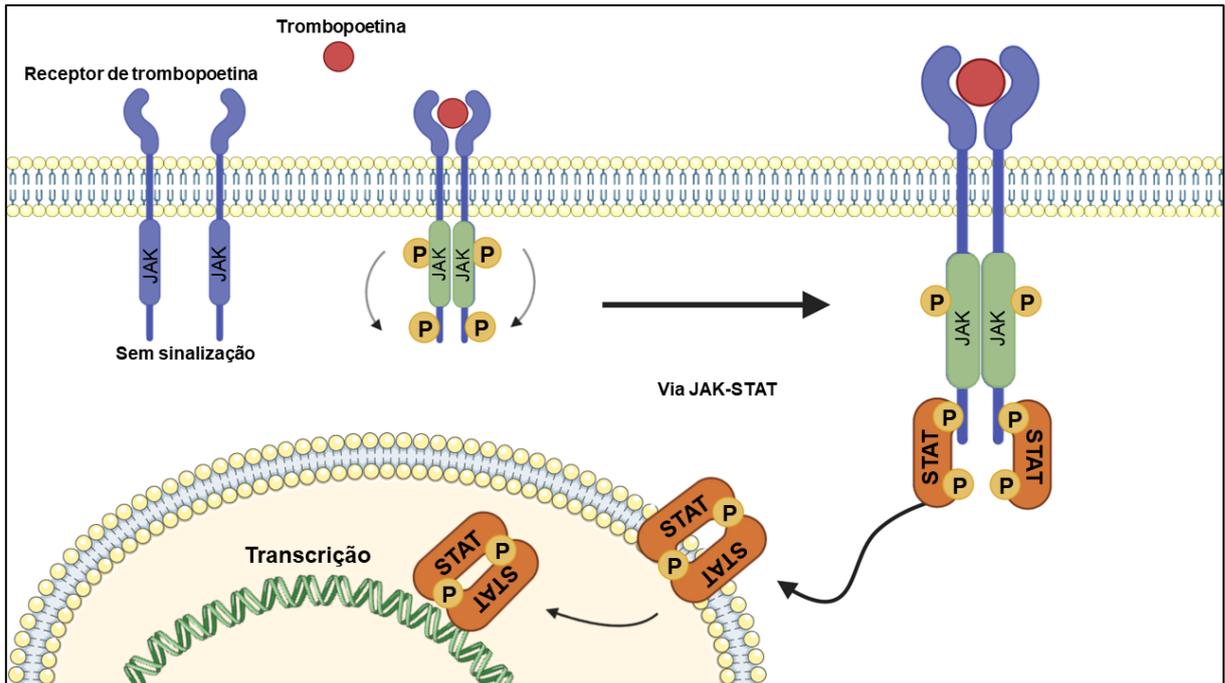


Figura 2: Via de sinalização JAK-STAT. Proteínas JAKs acopladas estrategicamente no domínio intracelular, dos receptores. A ligação de citocinas aos receptores leva a fosforilação das JAKs que ativam as STATs, e estas são fosforiladas e direcionadas em forma de dímeros, para a regulação da transcrição no DNA do núcleo.

Fonte: Autoria própria.

No caso das NMP, ocorre a ativação desregulada do receptor de trombopoetina, que acarreta no aumento da massa eritrocitária, das plaquetas e fibrose na medula óssea, pois, afeta a multiplicação, diferenciação, apoptose e oncogene celular. E neste cenário estão a TE e a MF, onde alterações no gene *MPL* afetam diretamente no surgimento e evolução dessas doenças (15,16).

2.2. Trombocitemia Essencial

A Trombocitemia essencial (TE) é uma doença hematológica causada por uma desordem clonal, de células da linhagem megacariocítica que gera aumento no número de plaquetas no sangue periférico, e de megacariócitos grandes e maduros na medula óssea. Destaca-se clinicamente, pela ocorrência de trombose e/ou hemorragia (17).

Sua etiologia ainda é desconhecida, entretanto, relatos de achados genéticos, como no caso das variantes no gene *MPL*, que está relacionado com as alterações na produção e diferenciação celular. Uma característica marcante é a anormalidade morfológica dos megacariócitos com formas gigantes mostrando citoplasma abundante, maduro e núcleos altamente lobados e hipersegmentados (em forma de chifre de veado), além de estarem dispersos pela medula óssea, podem ocorrer em pequenos grupos soltos (Figura 1) (3,5).

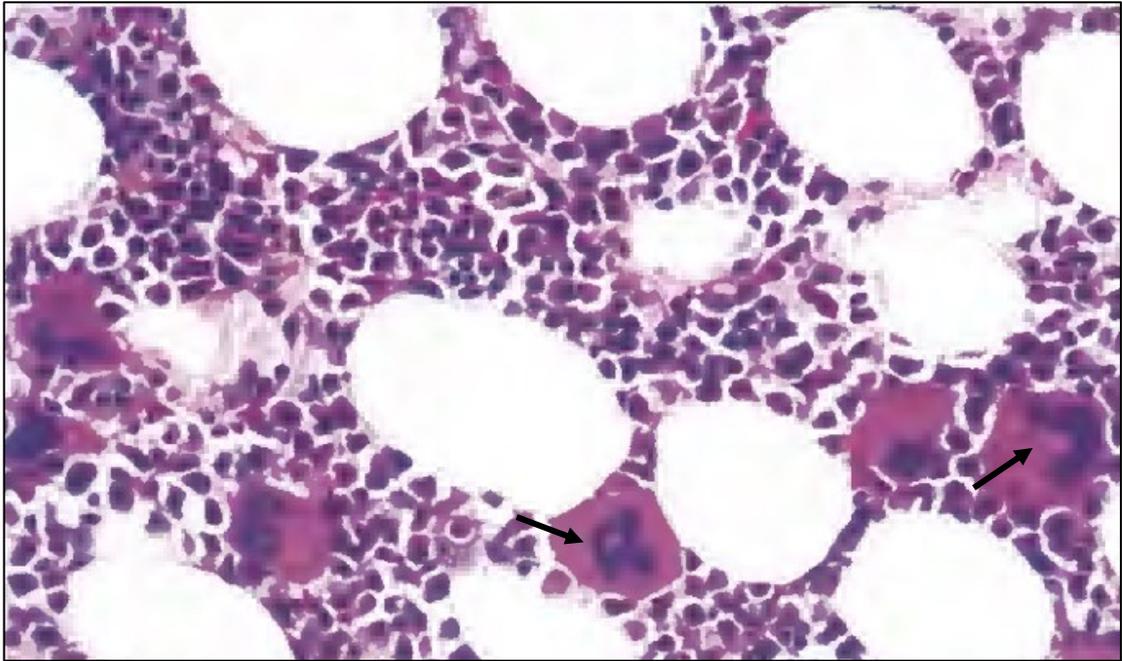


Figura 3: Biópsia da medula óssea. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), os megacariócitos aumentados demonstram quantidades abundantes de células maduras. Citoplasma e núcleos lobulados e hiperlobulados (tipo chifre de veado).

Fonte: OMS (2017).⁵

A proliferação de megacariócitos é caracterizada por trombocitose categórica. E a quantidade, possibilitou a uma contagem de plaquetas de forma mais assertiva, que antes era de $600 \times 10^9/\mu\text{L}$, passou a ser $450 \times 10^9/\mu\text{L}$ de sangue (Quadro 1). Essa mudança tornou mais ampla e precoce o diagnóstico para TE, quando o paciente ainda está em estágio assintomático, o que representa mais da metade dos casos (6,18,19).

Dentro das condições diagnósticas, devem ser excluídos outros tipos de hemorragias, neoplasias hematológicas e não hematológicas doenças infecciosas e inflamatórias (20). Quanto aos exames genéticos, à presença do cromossomo Filadelfia é também um critério de exclusão para a doença. Já as alterações nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* estão associadas ao desenvolvimento de TE e é um dos indicativos principais de diagnóstico. E apesar de não possuir marcador genético molecular específico, a TE detém variantes no gene *MPL* em cerca de 3% dos casos (21). A partir desses dados a OMS estipulou os critérios para diagnóstico da TE (Quadro 01), onde o paciente precisa atender a todos os critérios principais ou os três primeiros principais, mais o critério secundário (6):

Quadro 1: Critérios de diagnóstico para trombocitemia essencial segundo a OMS 2017.⁵

Principais critérios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ 2. Biópsia da medula óssea mostrando a proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número de megacariócitos aumentados e maduros com núcleos hiperlobulados; sem aumento significativo ou desvio à esquerda de granulopoiese neutrofílica ou eritropoiese; muito raramente um pequeno aumento (1º grau) nas fibras de reticulina. 3. Não atender aos critérios da OMS para <i>BCR::ABL1</i> positivo como leucemia mieloide crônica, policitemia vera, mielofibrose primária, ou outras neoplasias mielóides. 4. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i>, ou mutação <i>MPL</i>
Critério secundário
Presença de marcador clonal ou Ausência de evidências de trombocitose reativa

Os casos de TE ocorrem predominantemente em adultos, com idade em torno dos 60 anos e mais frequente em mulheres, porém, há registros de casos em pacientes com 30 anos de idade do sexo feminino. Em crianças, ocorre com pouca frequência denominada como casos raros de trombocitose hereditária (17,18).

Os estudos genéticos moleculares da TE, são cada vez mais requisitados para padronizar diagnósticos da doença, a fim de ajudar a determinar o diagnóstico, no prognóstico, tratamento, e busca de drogas mais eficientes visando a longevidade e o bem-estar do paciente. E mesmo que a alteração *JAK2V617F* esteja presente em aproximadamente um pouco mais da metade dos casos, determinadas variações no gene *MPL*, se destacam pela sua importância no funcionamento da proteína, o receptor de trombopoietina, que possui função fundamental, na ativação constitutiva da via de sinalização JAK-STAT das células sanguíneas (22).

Eventos no qual, o paciente com TE não apresenta alterações em nenhum dos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* (Quadro 1), são intitulados como triplo negativos, e detém cerca de 12% dos casos. As variações W515K e W515L do gene *MPL*, quando presentes em casos envolvendo crianças e adolescentes com TE, são descritos como raros casos com trombocitose hereditária (22,6).

Dentro dos critérios para o diagnóstico da TE, tão importante quanto analisar os achados histológicos, hemograma e exclusão de outras doenças hematológicas, é tentar encontrar e identificar marcadores clonais, pois, eles ajudarão na verificação do grau da doença e prever se a TE pode evoluir para mielofibrose estágio pré-fibrótico ou até mesmo se já é um de leucemia (20,6).

2.3. Mielofibrose

A MF trata-se de uma neoplasia mieloproliferativa clonal de célula progenitora hematopoiética multipotente, caracterizada pela proliferação de megacariócitos e granulócitos predominantemente anormais na medula óssea, com fenótipo de fibrose medular, hematopoese extramedular e esplenomegalia. A partir da sua fisiopatologia, a MF é definida como a forma mais grave das doenças mieloproliferativas não leucêmicas (19,23).

A prevalência da doença ocorre entre os 60-70 anos de idade, afetando homens e mulheres igualmente, e cerca de 10% dos casos avançados são diagnosticados em pacientes com idade < 40 anos, e crianças raramente são afetadas. E devido à complexidade fisiológica, esta doença possui dois estágios marcantes: o pré-fibrótico e fibrótico (19).

O estágio pré-fibrótico é marcado por uma fase de hiper celularidade com aumento do número de neutrófilos, acompanhada da proliferação de megacariócitos anormais (hipercrômicos) com núcleo grande e irregular, em associação com fibrose de reticulina e/ou colágeno, mas sem aumento significativo no colágeno. Na maioria dos casos apresenta redução na eritropoiese quando analisados na biópsia de medula óssea (Figuras 4 e 5) (Quadro 2).^{5,24}

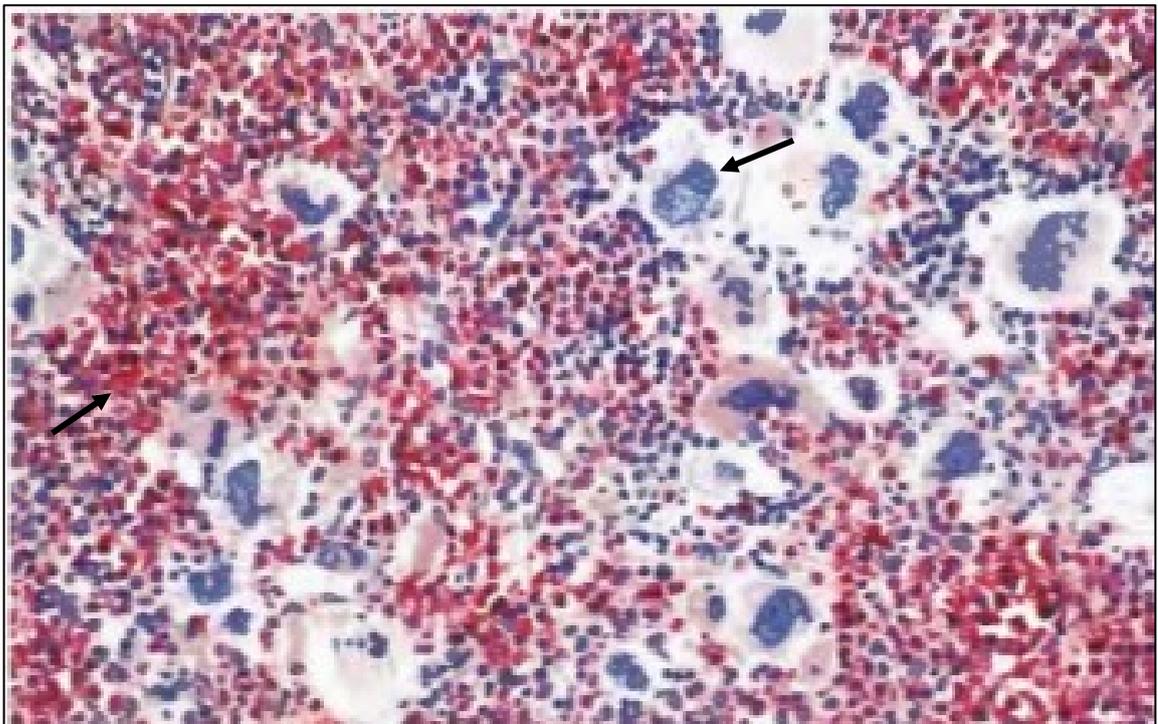


Figura 4: Biópsia de medula óssea em paciente pré-fibrótico. Imagem mostra proliferação megacariocítica e granulocítica. A coloração com naftol AS-D cloroacetato esterase (CAE) identifica o componente granulocítico (produto de reação vermelho); os megacariócitos mostram aglomerados extensos e núcleos condensados com cromatina visivelmente aglomerada e relações nuclear:citoplasmática (NC) anormais.

Fonte: OMS (2017) (6).

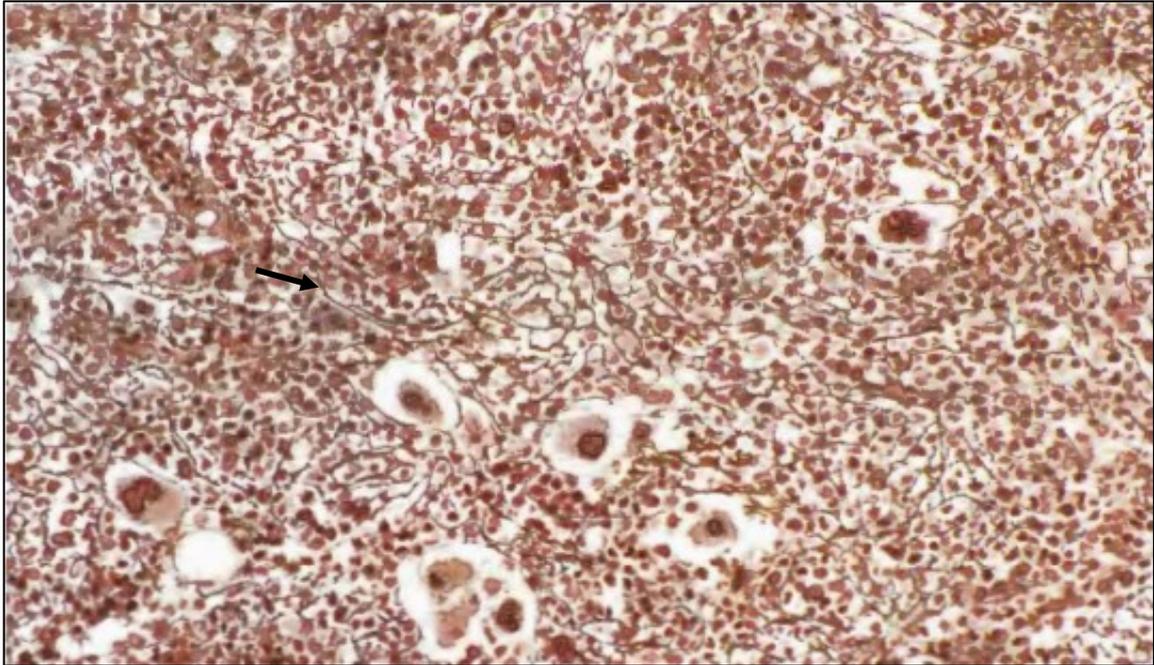


Figura 5: Fibras de reticulina na medula óssea. Rede frouxa de fibras. Coloração Gomori.
Fonte: OMS 2017.⁵

No estágio fibrótico, há nítido aumento das fibras de reticulina ou fibrose de colágeno, onde a fibrose de colágeno é mais evidente. Frequentemente, é associado a vários graus de fibrose, e pode apresentar ainda, uma hiperplasia de megacariócitos. Entretanto, agora com regiões hipocelulares, de tecido conjuntivo frouxo e/ou gordura quando vistos na biópsia de medula óssea (Figuras 6 e 7) (Quadro 3) (6,24).

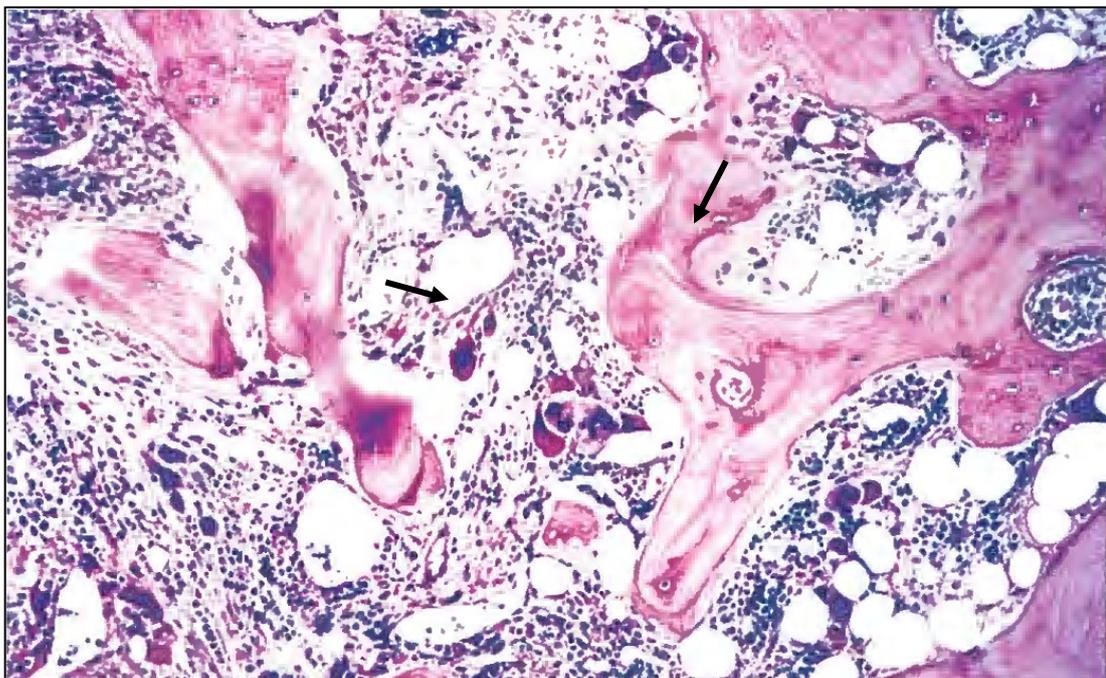


Figura 6: Amostra de biópsia de medula óssea, com hipocelularidade, seios marcadamente dilatados e fibrose medular grave com osteosclerose, estágio avançado. Coloração Hematoxilina-eosina.
Fonte: OMS (2017) (6).

Em ambos os estágios, são diagnosticados através de biópsia de medula óssea (23). Assim, a OMS 2017, estipulou os critérios para diagnóstico da mielofibrose em seus dois estágios distintos (Quadros 2 e 3) (6):

Quadro 2: Critério diagnóstico para mielofibrose, estágio pré-fibrótico segundo a OMS 2017.⁵

<i>“Requer que todos os 3 critérios principais e pelo menos 1 critério secundário sejam atendidos”</i>	
Critérios principais	Critérios secundários
1. Proliferação megacariocítica e atipia, sem fibrose de reticulina com grau > 1º, acompanhada por aumento da celularidade da medula óssea ajustada à idade, proliferação granulocítica e (frequentemente) diminuição da eritropoese; 2. Não apresentar nenhuma outra neoplasia mieloproliferativa e nem leucemia mieloide crônica positiva para BCR-ABL; 3. Mutação JAK2, CALR ou MPL; Ou presença de outro marcador clonal; ou ausência de fibrose de reticulina da medula óssea reativa menor	- Anemia não atribuída a uma condição comórbida; - Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$; - Esplenomegalia palpável; - Nível de lactato desidrogenase acima do limite superior do intervalo de referência institucional.

Quadro 3: Critério diagnóstico para mielofibrose, estágio fibrótico evidente segundo a OMS 2017.⁵

<i>“Requer que todos os 3 critérios principais e pelo menos 1 critério secundário sejam atendidos”</i>	
Critérios principais	Critérios secundários
1. Proliferação megacariocítica e atipia, acompanhada por reticulina e/ou fibrose de colágeno com graus 2 e 3; 2. Não apresentar nenhuma outra neoplasia mieloproliferativa e nem leucemia mieloide crônica positiva para BCR-ABL; 3. Mutação JAK2, CALR ou MPL; Ou Presença de outro marcador clonal Ou Ausência de mielofibrose reativa	- Anemia não atribuída a uma condição comórbida; - Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$; - Esplenomegalia palpável; - Nível de lactato desidrogenase acima do limite superior do intervalo de referência institucional; - Leucoeritroblastose.

Os pacientes com MF, bem como de TE, apesar de não possuírem um marcador clonal específico para a doença como critério para diagnóstico, necessitam de uma caracterização molecular para ajudar no estabelecimento de diagnóstico e prognóstico, para as doenças. O que permite uma ação, para definir a melhor estratégia terapêutica, a qual possibilita ao paciente conforto e qualidade vida dentro do quadro clínico, sem que haja evolução da patologia (25).

Alterações no gene *MPL* estão associadas em 5 a 10% dos casos de TE e MF, e causam mudanças conformacionais na proteína receptora de trombopoetina, a qual faz com que ocorra, a indução da fosforilação das quinases JAKs, iniciando as cascatas da via JAK-STAT. Processo relevante no desencadeamento de formação de megacariócitos e plaquetas (26).

As variantes no gene *MPL*, as quais estão ligadas ao desencadeamento de fenótipos como a TE e MF, leva a um mecanismo molecular de transformação fibrótica, o que torna o prognóstico grave para o tratamento das doenças. O rastreio de variantes no gene, é necessário para ajudar no levantamento e controle de frequências, no diagnóstico precoce da MF, quando ela ainda é assintomática (27,28).

2.4. Gene *MPL*

O gene humano *MPL* (MPL proto-oncogene, receptor de trombopoietina) (HGNC ID:7217) está localizado no cromossomo 1p34.2. O gene *MPL* possui 12 éxons e 17.592 pares de bases (pb). A região de interesse no gene *MPL* (éxon 10), possui o tamanho de 97 pares de bases (pb) (Figuras 8 e 9).

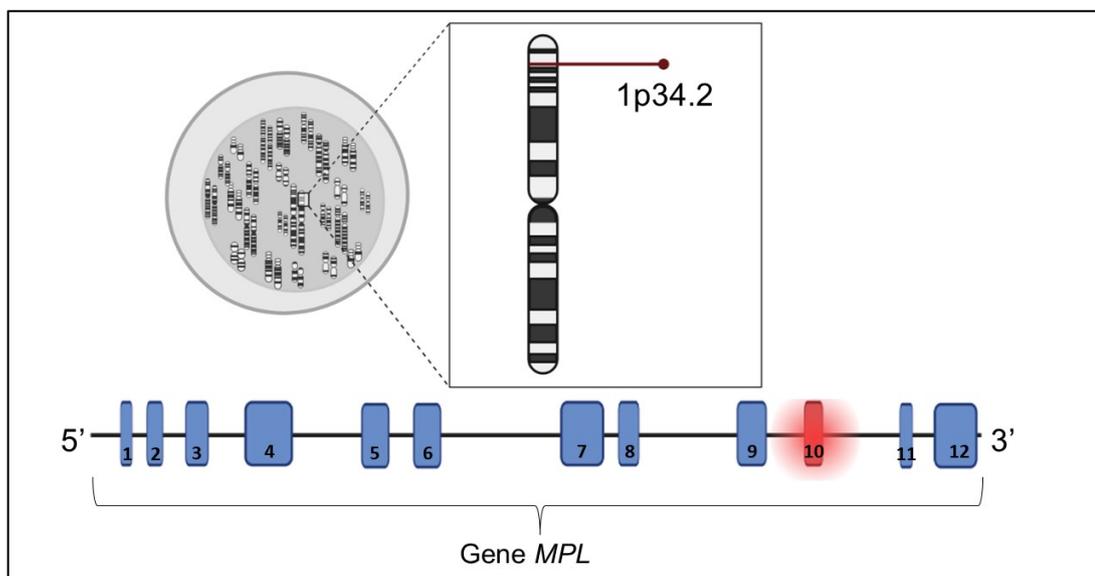


Figura 7: Cromossomo 1. As bandas e a localização cromossômica do gene *MPL* na linha vermelha, de acordo com Ensembl e com GeneLoc. Gene *MPL*. Os doze éxons do gene em destaque de vermelho o éxon 10, de acordo com a *National Library of Medicine (NIH) National Center for Biotechnology Information*.

Fonte: Autoria própria.

O *MPL* codifica proteína Receptora de Trombopoetina (TPO-R), composta de 635 aminoácidos com estrutura quaternária (Figura 9), que abrange os domínios: extracelular, transmembrana e intracelular (29). O TPO-R regula a manutenção da célula tronco hematopoiética no desenvolvimento de megacariócitos e produção de plaquetas (30).

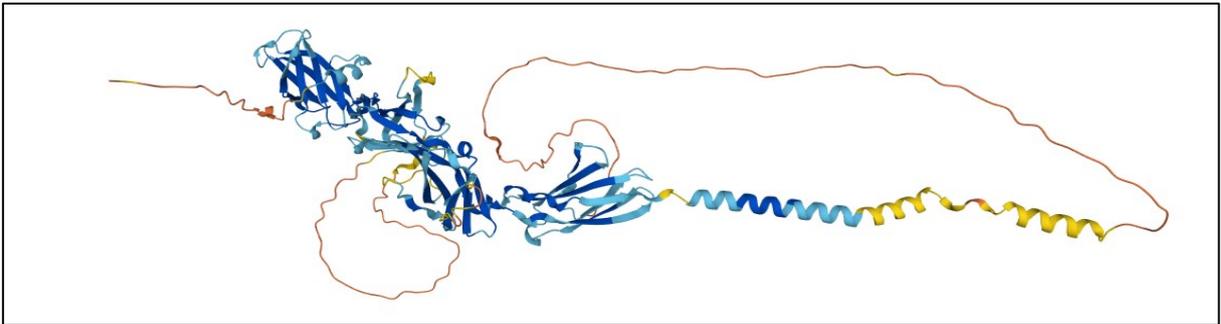


Figura 8: Configuração tridimensional da proteína Receptor de Trombopoetina.
Fonte: www.uniprot.org/uniprot/P40238#function

Dos domínios que integram o TPO-R o domínio da transmembrana é expresso pelo éxon 10 do gene *MPL*, e é parte importante da proteína TPO-R, pois, está inserido em uma conformação ideal para a fixação na membrana (Figura 10) (31). Este domínio possui atividade regulatória que previne a ativação espontânea do receptor na ausência do ligante (32,33). Sua atividade se faz presente em todas as etapas da diferenciação dos megacariócitos, se tornando indispensável no processo da megacariopose para a formação das plaquetas (34,35).

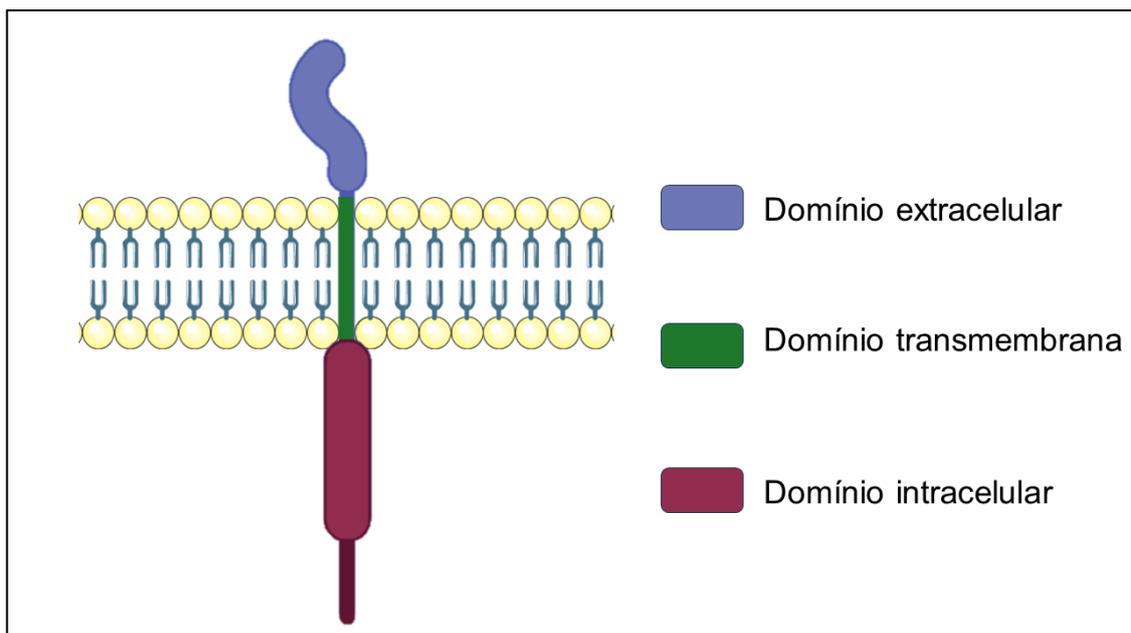


Figura 9: Domínios do Receptor de Trombopoetina (TPO, CD110).
Fonte: Autoria própria.

No éxon 10 do gene *MPL*, ocorre mutações alélicas do tipo *missense*, que implica na alteração de aminoácidos, e consequente mudança de função. A variante mais frequente descrita é a *rs121913615*, uma substituição de bases, que ocorre no nucleotídeo 1544 onde a guanina (G) substitui a timina (T). Outra variante é a *rs121913616*, uma *INDEL*, onde é inserida duas adeninas (AA) nos nucleotídeos 1543 e 1544 sendo o comprimento do segundo alelo de dois pares de bases (Figura 11). A variante *rs121913615*, é encontrada em pacientes tanto TE, quanto com MF, enquanto a variante *rs121913616*, está presente apenas em pacientes com MF (36,37).

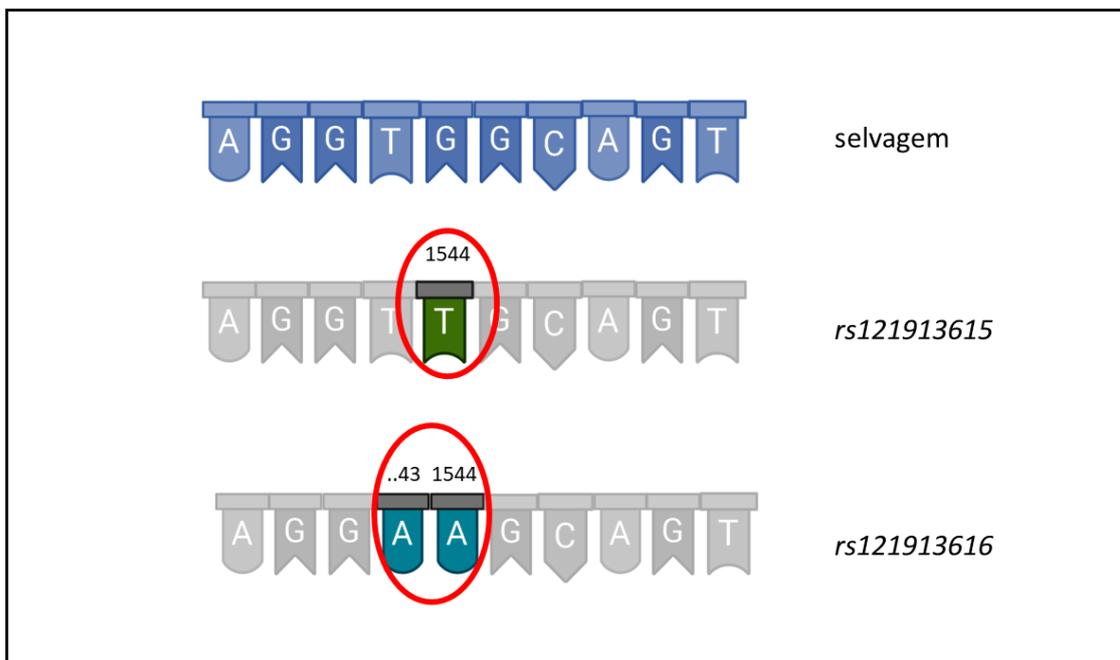


Figura 10: Representação dos tipos de alteração que ocorrem nas variantes.
Fonte: Autoria própria.

As variantes causam mudança na transcrição do aminoácido triptofano, na posição 515, que é substituído por uma leucina (W515L), quando for a *rs121913615*, ou por uma lisina (W515K), quando for a *rs121913616* (37).

A alteração do aminoácido muda a posição da região inferior da transmembrana, e compromete a atividade da proteína TPO-R. Uma vez que, faz com que a parte superior da transmembrana, e consequentemente a região extracelular, se tornem próximos e hidrofílicos. Além disso, essa nova conformação do TPO-R, faz com que se torne hipersensível, e com atividade de ganho de função, em que sua dimerização independe do ligante, para ativar a sinalização da via JAK-STAT, estimulando de forma constitutiva a proliferação celular (Figura

12) (39). Assim, o aumento dessas células corrobora para o fenótipo das neoplasias mieloproliferativas como a TE e MF (38,39).

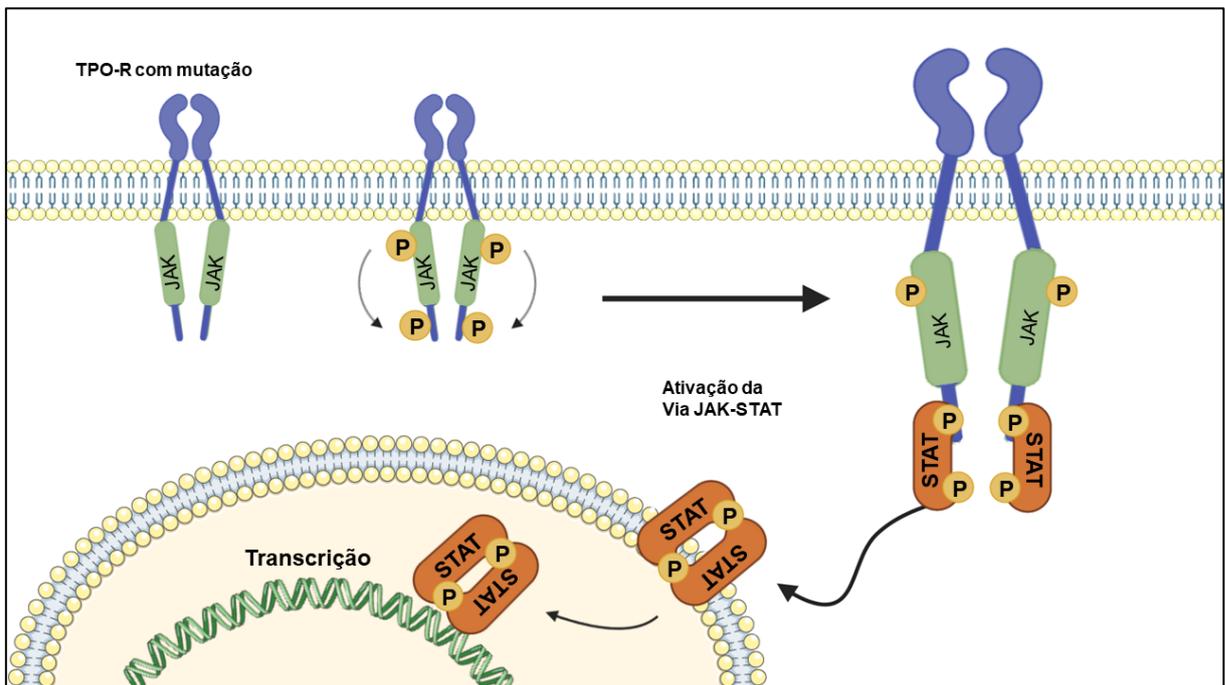


Figura 11: TPO-R alterado na região inferior do domínio transmembrana. Afinidade da região extracelular ativa a dimerização independente do ligante, e ativa a via JAK-STAT.

Fonte: Autoria própria.

A Fundação HEMOAM como centro de referência em tratamento de doenças hematológicas da região norte, possui em seu banco de dados pacientes com diagnóstico clínico para TE e MF, e nenhum estudo genético para estes casos. Portanto, o estudo visa levantar e descrever as variantes no éxon 10 do gene *MPL* encontradas nos pacientes com TE e MF para assim colaborar com estudos sobre a caracterização das neoplasias mieloproliferativas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Rastrear variantes no éxon 10 do gene *MPL*, de pacientes com Trombocitemia essencial e Mielofibrose atendidos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a população desse estudo a partir de dados demográficos e clínicos-laboratoriais;
- Verificar a presença de variantes no éxon 10 do gene *MPL*, por meio do uso da técnica de sequenciamento Sanger.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tipo e local de estudo

O presente estudo foi do tipo Descritivo-Analítico, realizado na cidade de Manaus-Amazonas e desenvolvido no Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

O estudo faz parte do projeto principal intitulado “Caracterização molecular de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas”, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) (CAAE: 39991420.6.0000.0009)

4.2. População de estudo

A população de estudo foi composta por 64 indivíduos atendidos na FHEMOAM, com diagnóstico clínico de Trombocitemia essencial (CID47.3) e Mielofibrose (CID47.4). O período da coleta foi de agosto de 2021 a julho de 2022. A composição da população de estudo foi por meio de pacientes cadastrados no sistema iDOCTOR e encaminhamento de médico hematologista da FHEMOAM.

4.3. Convite de pacientes

O convite para a participação do estudo foi realizado de duas formas: 1- consulta digital dos agendamentos médicos pelo sistema iDOCTOR; 2- encaminhamento médico direto.

Na consulta digital o levantamento de pacientes foi realizado através do sistema iDOCTOR, onde foram baixadas listas de agendamentos semanais de consultas médicas. Os pacientes agendados na semana foram contactados por ligações telefônicas para apresentação do pesquisador e da pesquisa, esclarecimentos e o convite para participação. Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram o TCLE (anexo 10.2) e tiveram a amostra coletada no mesmo dia do exame agendado no laboratório, conforme combinado previamente.

Por encaminhamento médico direto, o médico hematologista durante a consulta com o paciente, indicou a participação do paciente na pesquisa. Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram esclarecidos e assinaram o TCLE (anexo 10.2) e tiveram a amostra coletada.

4.4. Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão

No estudo foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico, em prontuário, para Trombocitemia essencial (CID47.3) e Mielofibrose (CID47.4) de ambos os sexos e idade a partir de 18 anos atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Não foram incluídos nesse estudo pacientes sem disponibilidade de acesso aos prontuários e pacientes que não apresentaram em seus prontuários as informações necessárias para a caracterização clínica e laboratorial para Trombocitemia essencial e Mielofibrose, e/ou optaram por recusar a participação da pesquisa, como é estabelecido no TCLE, também não foram incluídos.

Como critério de exclusão foi considerado pacientes que por algum motivo, seja particular ou outro, não se sentiram confortáveis ou seguros para fazer parte do estudo após estarem incluídos, e optaram por não querer mais participar e pacientes que tiveram as amostras biológicas inviáveis para a análise molecular e leitura do sequenciamento insatisfatória.

4.5. Coleta das amostras

A coleta das amostras foi de sangue periférico, por punção venosa em tubos com sistema a vácuo. Os tubos coletados por paciente foram no total de quatro unidades com a seguinte ordem: dois tubos com ácido etilenodiamino tetracético - EDTA- (INJEX VÁCUO® EDTA K3) para análise de parâmetros hematológicos e para análises moleculares; um tubo com gel separador de soro (BD Vacutainer® SSTTM), para análises bioquímicas; e um tubo LABOR IMPORT® com citrato de sódio 3,2%, para testes hemostáticos. As amostras coletadas foram fracionadas em criotubos identificadas com o código de cada paciente e armazenadas a -80°C.

4.6. Extração de DNA

O Brazol foi o reagente utilizado para a extração de DNA. Os passos foram seguidos conforme o estabelecido no Procedimento Operacional Padronizado de extração de DNA do LabGen-HEMOAM (Anexo 9.3). O material extraído foi quantificado por espectrofotometria com o *Nanodrop modelo 2000c* (*Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*).

A quantificação final, o valor de concentração de DNA considerado aceitável foi de $\geq 100\text{ng}/\mu\text{L}$. O parâmetro de pureza e qualidade da concentração das amostras, teve as relações aferidas de 260/280 e 230/260, conforme o estabelecido no Procedimento Operacional Padronizado de quantificação de DNA do LabGen-HEMOAM (Anexo 9.3). O material foi

armazenado a -80 °C, para a organização e realização das demais etapas como, reação em cadeia polimerase (PCR), purificação da PCR por polietilenoglicol (PEG) e sequenciamento.

4.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do material genético foi por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional. O mix para a amplificação do material genético teve o volume final de 25µL de reação, contendo 50-100ng de DNA. Os reagentes utilizados foram: Tampão (10x) com volume 2,5µL e concentração final 1x; MgCl₂ (50mM) com volume 0,75µL e concentração final 1,5mM; dNTP (10mM) com volume 2,5µL e concentração final 0,2µM; Iniciadores (10µM) com volume 1,0µL (cada iniciador) e concentração final 0,4µM; Taq (5U/µL) com volume 0,2µL e concentração de 1 Unidade. A água ultrapura foi utilizada para completar o volume supracitado.

Na amplificação dos fragmentos, o equipamento utilizado foi o ABI *Applied Biosystems Veriti*™. Os parâmetros de ciclagem seguidos foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos seguidos de 35 ciclos e extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para visualização do fragmento em fotodocumentador UV light *Gel Doc™ XR + System* (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, USA).

4.8. Desenho de primers

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para a região de investigação, foram desenhados a partir da ferramenta on-line *OligoAnalyzer* (disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Considerando as concentrações de oligonucleotídeos (0,25 µM), Magnésio (2,5 mM), Sódio e desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ambos a 0 mM). As características estruturais e termodinâmicas como tamanho e temperatura de melting (T_m), Selfdímero (SD), Heterodímero (HD) e Harpin (H) também foram avaliadas nessa mesma ferramenta. Em seguida, as sequências dos primers desenhadas passaram por análise no *PrimerBlast* (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), outra ferramenta do NCBI utilizada para mensurar a especificidade dos iniciadores com o alvo de interesse.

Os primers desenhados para flanquear a região de interesse, compreendem todo o éxon 10, além da região de íntron depois do éxon, gerando um amplicon de 300 pares de bases (pb)

(Figura 13). A sequências dos primers desenhados para a presente pesquisa estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Desenho dos primers para reação de PCR

Região	Primer	Sequência (5' – 3')	Amplicon
Éxon 10 <i>MPL</i>	Foward	TTGTCTCCTAGCCTGGATCT	300 pb
	Reverse	GTATAGTGGGCGTGTTAGAGTG	

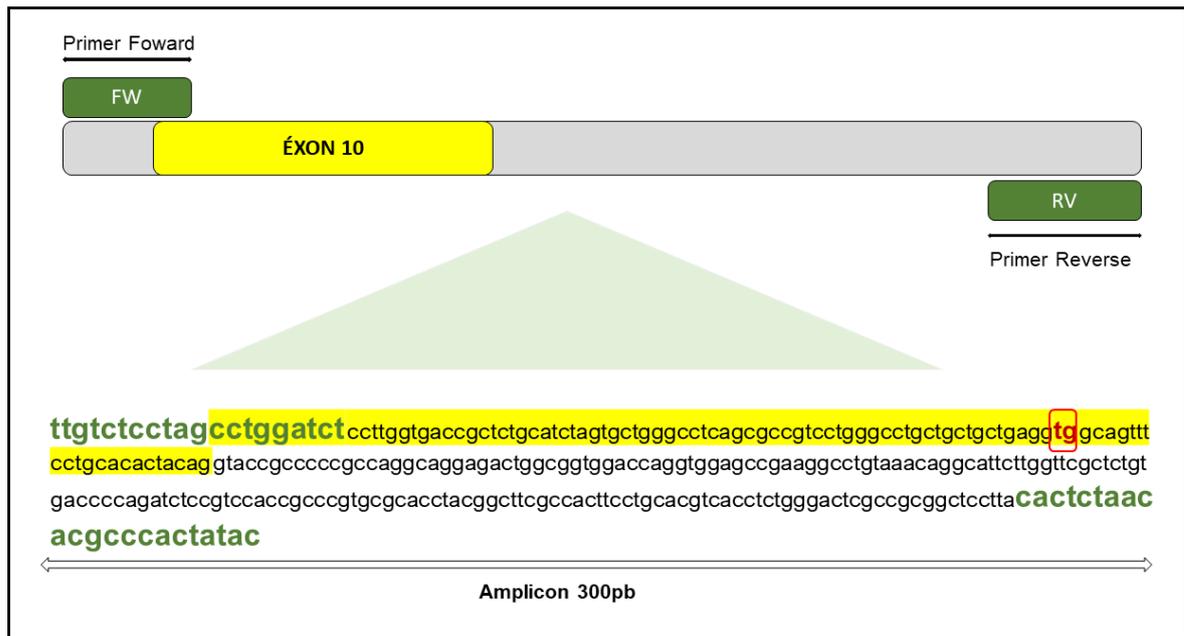


Figura 12: Região no DNA onde os primers serão flanqueados. Em amarelo, a região do éxon 10. As regiões em verde são as posições dos primers. Na região do éxon 10, em destaque de vermelho: os nucleotídeos onde se encontram as variantes.

Fonte: Autoria própria

4.9. Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol (PEG) foi o reagente utilizado, para a purificação dos produtos da PCR. O protocolo foi utilizado conforme o estabelecido no Procedimento Operacional Padronizado de Purificação e Precipitação de DNA por Polietilenoglicol (8000, *Promega*) do LabGen-HEMOAM (Anexo 9.4)^{55, 56, 57}

4.10. Sequenciamento de Sanger

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o primer reverse. O sequenciamento de nucleotídeos foi utilizado o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems, Foster City, Califórnia*) (Anexo 9.5 e 9.6). A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador de DNA ABI 3130 com o polímero POP-7TM. As sequências foram inicialmente analisadas

com o software SequencingAnalysis (*Applied Biosystems, v5.3.1*), com uma avaliação secundária realizada no Geneious (Biomatters, v6.0.6) para construir *contigs* em comparação com a sequência do gene de referência do *MPL* (GenBank ID: 4352).

4.11. Análise estatística

Os dados referentes a característica clínica e laboratorial dos indivíduos do estudo foram organizados em tabelas dinâmicas no *software* Excel 2019 (*Microsoft Office. 2019*), com auxílio da ferramenta de cálculos Power Query.

As variáveis foram expressas em valores absolutos (N) e frequência relativa (%). Na avaliação dos dados categóricos foram criadas tabelas de contingência, onde o teste utilizado foi o Chi-Quadrado (χ^2). As variáveis numéricas passaram primeiramente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e depois pelo teste exato de Mann-Whitney com intervalo de confiança de 95%. Os dados categóricos e numéricos foram expressos por mediana (Md), e intervalo interquartil (IQR) com primeiro (25%) e terceiro (75%) percentil como limites mínimo e máximo.

O software utilizado foi o GraphPad Prism v.9.0.0., onde o valor de $p < 0.05$ é considerado estatisticamente significativo na comparação entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos e clínico-laboratoriais

O estudo contou com 64 pacientes diagnosticados com TE e MF, sendo 85,27% indivíduos com TE (57) e 14,73% indivíduos com MF (7). A mediana de idade dos pacientes do grupo de TE foi de 58 anos (IQR: 43 – 72), enquanto no grupo de MF foi de 65 anos (53 – 74). Os grupos apresentaram significância quanto ao percentual de indivíduos dos gêneros masculino e feminino: em TE 78,95% (45) são predominantemente indivíduos do gênero feminino, enquanto em MF 57,14% (4) são do gênero masculino (Tabela 2).

Tabela 2: Características sociodemográficas dos participantes do estudo.

Características demográficas	TE N= 57	MF N=7	<i>P value</i>
Idade, Md, (IQR)	58 (43 - 72)	65 (53 - 74)	0,3857
Gênero, N (%)			
Masculino	21,05% (12)	57,14% (4)	0,0374
Feminino	78,95% (45)	42,86% (3)	

Abreviações: SD: Desvio padrão; os dados estão apresentados como SD, (%), ou N. Trombocitemia essencial (TE) versus Mielofibrose (MF); Para variáveis contínuas (idade) os dados foram comparados usando o Teste paramétrico t student. Para a variável categórica (gênero) foi usado o teste Chi-square. $p < 0,05$.

As características clínicas e laboratoriais analisadas nos grupos de pacientes com TE e MF neste estudo verificaram se os pacientes estavam em tratamento, se possuíam esplenomegalia, se tiveram eventos trombóticos e qual a mediana na contagem de plaquetas (Tabela 03).

Os pacientes que estavam em tratamento foram 96,49% (55) com TE e 71,43% (5) com MF. Quanto a esplenomegalia 81,82% (45) dos casos com TE e 57,14% (4) com MF não apresentaram este sintoma. A ausência de eventos trombóticos se mostrou em 75,44% (43) dos casos com TE e em todos os casos com MF. A mediana da quantidade de plaquetas no grupo de pacientes com TE foi de 467×10^6 , enquanto que no grupo de pacientes com MF foi de 280×10^6 . Os grupos de pacientes apresentaram significância quanto as suas variáveis, exceto na característica clínica de presença de eventos trombóticos, onde apenas 24,56% (14) dos pacientes de TE apresentaram este sintoma (Tabela 3).

Tabela 3: Características clínicas e contagem de plaquetas dos pacientes de TE e MF

	TE N= 57	MF N=7	P value
Tratamento, N (%)			
Sim	96,49% (55)	71,43% (5)	0,0097
Não	3,51% (2)	28,57% (2)	
Esplenomegalia, N (%)			
Sim	18,18% (10)	57,14% (4)	0,0202
Não	81,82% (45)	42,86% (3)	
Eventos trombóticos, N (%)			
Sim	24,56% (14)	0	0,1379
Não	75,44% (43)	100% (7)	
Plaquetas, Md, (IQR) *	467000 (342500- 547500)	280000 (219000- 356000)	0,0084

Abreviações: IQR: Intervalo Interquartil; os dados estão apresentados como, (%) e N. Trombocitemia essencial (TE) versus Mielofibrose (MF); os dados categóricos foram analisados utilizando o teste *Chi-square*. Os dados de plaquetas apresentaram distribuição não paramétrica, a análise foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. * O valor de referência considerado para a contagem de plaquetas foi de $>400 \times 10^9$ para o diagnóstico de TE e MF.⁶

O grupo de pacientes com MF foram analisados o hemograma. Os valores como contagem global de eritrócitos (RBC), Hemoglobina, Hematócrito e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) estiveram um pouco abaixo do valor normal. Valores de Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM) e Leucócitos se mantiveram dentro dos parâmetros considerados normais. Enquanto a Lactato desidrogenase (LDH) nestes pacientes se manteve acima do valor normal (Tabela 4).

Tabela 4: Hemograma dos pacientes com MF.

Parâmetros Hematológicos	Md	VN	P value
RBC (mil/mm ³)	3,6 (2,51-6,52)	3,9-5,3	-
Hemoglobina (g/dL)	10,5 (7-17,2)	12-16	-
Hematócrito (%)	33,5 (23,2-51,2)	36-48	-
VCM (fL)	91,2 (74,8-94,8)	80-100	-
HCM (pg)	28,6 (22,6-30,8)	27-33	-
CHCM (g/dL)	31,2 (30,2-33,6)	32-36	-

WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.050 (2.860-16.300)	3600-11000	-
LDH (U/L) *	986 (483,07-2865)	195-450	-

Abreviações: RBC: contagem global de eritrócitos; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); VCM: Volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; WBC: contagem global de leucócitos; LDH: desidrogenase láctica.

5.2. Dados moleculares

As variantes no éxon 10 do gene *MPL* estão relacionadas a uma ativação constitutiva da via JAK-STAT, as quais promovem substituições no códon W515. Essas substituições são do triptofano por uma leucina ou lisina. Para que se possa observar as variantes foram realizados PCRs em gel de agarose a 1%, em *amplicon* de 300pb (Figuras 14).

Os 64 pacientes tiveram suas amostras amplificadas em gel com boa visualização das bandas possibilitando que elas sejam submetidas ao sequenciamento.

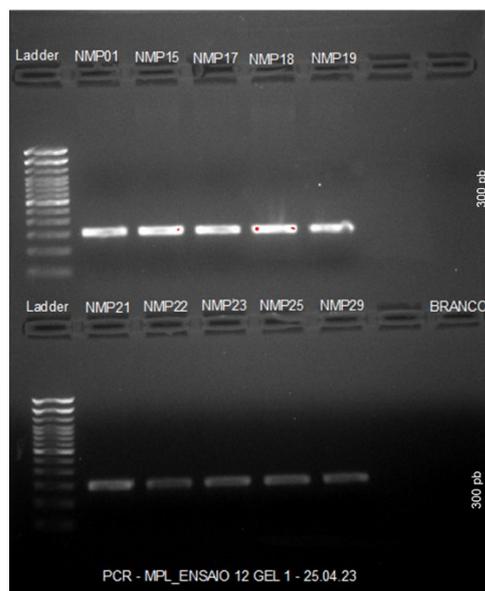


Figura 13: Gel de eletroforese a 1% para o amplicom de 300 pb.

Fonte: Autoria própria

A amplificação e sequenciamento do éxon 10 do gene *MPL* não evidenciou a presença de variantes nessa população (Figuras 15 e 16). As amostras desses pacientes fazem parte de outros dois estudos paralelos de caracterização genética desse grupo de pesquisa, onde já foram analisadas variantes nos genes *JAK2* e *CALR*.

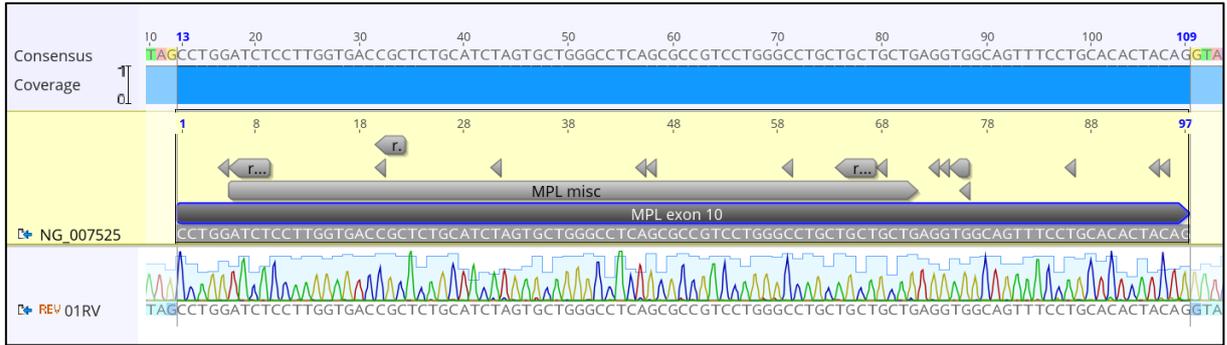


Figura 14: Eletroferograma do paciente NMP01 com TE representando a ausência de variantes no éxon 10 do gene *MPL*.

Fonte: Autoria própria

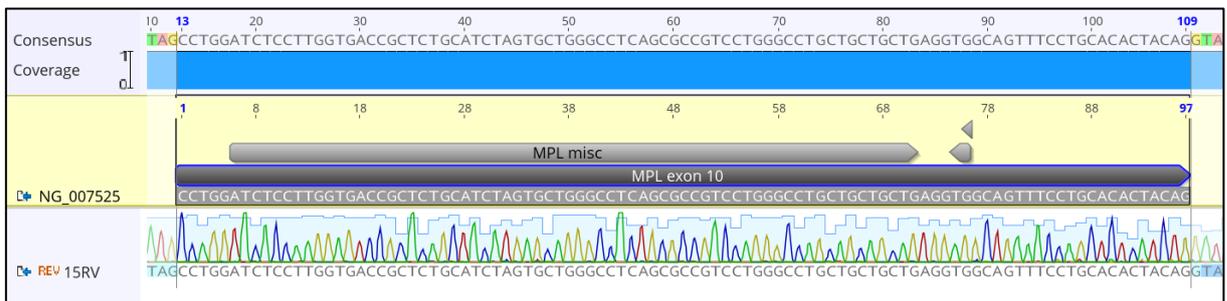


Figura 15: Eletroferograma do paciente NMP15 com MF representando a ausência de variantes no éxon 10 do gene *MPL*.

Fonte: Autoria própria

6. DISCUSSÃO

As variantes do éxon 10 do gene *MPL* fazem parte da tríade de genes (*JAK2*, *CALR* e *MPL*) que pertencem a um dos principais critérios de diagnóstico das NMP segundo as diretrizes estabelecidas pelo WHO (6). A presença das variantes no éxon 10 do gene *MPL* está associada a um mal prognóstico em pacientes diagnosticados com TE e MF, e estudos realizados nos Estados Unidos, Europa e países asiáticos já caracterizaram a suas populações com dados demográficos, clínico-laboratoriais e moleculares. No Brasil a caracterização molecular de pacientes com NMP ainda é escassa, uma vez que os estudos dessa população se concentram nas regiões Sul e Sudeste. O presente estudo descreve pela primeira vez a caracterização molecular do éxon 10 do gene *MPL* de pacientes atendidos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM.

Este estudo a maioria da população teve maior percentual de pacientes diagnosticados com TE (85,27%) do gênero feminino (78,95%). Os pacientes com MF não tiveram diferenças estatísticas quanto ao gênero devido ao seu número amostral, e o gênero masculino se sobressaiu com 57,14%. Quanto a idade o grupo de pacientes com TE teve a mediana de 58 anos, enquanto o grupo de pacientes com MF teve a mediana de 65 anos. As características observadas em nossa população de estudo corroboram com os demais estudos e com as características descritas no WHO.

Em um estudo coreano publicado por Kim et al (2015), dos 199 pacientes com NMP, 79 (39,69%) foram diagnosticados com TE e 54 (27,13%) foram diagnosticados com MF. Todos os pacientes eram coreanos com mediana de idade do grupo de pacientes com TE de 55 anos, e do grupo de pacientes com MF foi de 61 anos. No grupo de pacientes com TE o gênero predominante é o feminino com 67,1% (53), já no grupo com MF é o gênero masculino com 59,3% (32) (61). O estudo avaliou outras NMP e o maior número de pacientes foi com o diagnóstico para TE e o terceiro com MF. Os resultados deste estudo coreano com relação as variáveis idade e gênero corroboram com nossos resultados.

Mesa et al (2016) publicou um estudo nos Estados Unidos com 813 pacientes com NMP, destes 226 (27,79%) tinham diagnóstico para TE e 207 (25,46%) para MF. Os pacientes eram residentes do país, porém com diferentes etnias. A mediana de idade dos pacientes com TE foi de 62 anos e de MF foi de 66 anos. O gênero feminino é predominante nos grupos de pacientes com TE (72%) e em MF (54%). O estudo avaliou as três principais NMP (PV, TE e MF) e diferentemente do nosso estudo o diagnóstico de TE e MF não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (62). Quanto a idade, os resultados de Mesa et al (2016)

apresentaram mediana na faixa dos 60 anos tanto para o grupo de pacientes com TE quanto para MF. Os resultados quanto ao gênero, corroboram com nossos resultados onde predomina o gênero feminino no grupo de pacientes com TE e no grupo de MF não há uma diferença estatística marcante.

A maioria dos pacientes do nosso estudo estavam em algum tipo de tratamento e os sintomas como esplenomegalia e eventos trombóticos não foram identificados em mais de 50% deles, já a mediana da contagem de plaquetas ficou dentro dos parâmetros considerados abaixo do valor de referência. Os pacientes que estavam em tratamento foram observados na maioria deles o uso de medicamentos como Hidroxiureia e Anagrelida, que são considerados citorreduzores.

Os resultados do estudo de Stefano et al (2008) apresentaram eficácia na administração de medicamentos citorreduzores combinados com antiplaquetários ou anticoagulantes orais em pacientes diagnosticados com TE. O tratamento com citorreduzores reduz pela metade a incidência de retrombose, que o tratamento a longo prazo nestes pacientes é efetivo e previne novos episódios. Outro estudo com pacientes diagnosticados com TE, Larrán et al (2013) avaliaram o desempenho da administração da hidroxiureia, anagrelida e demais medicamentos. Este estudo concluiu que o uso combinado de citorreduzores e anticoagulantes reduz a incidência de eventos trombóticos.

Em estudo com administração apenas da hidroxiureia em pacientes com MF, Trillos et al (2010) tiveram melhora clínica somente em 40% dos pacientes e concluíram que a hidroxiureia deve ser administrada com outros medicamentos para amenizar outras manifestações clínicas. As literaturas tiveram resultados satisfatórios quanto ao uso de citorreduzores em pacientes com TE e MF, o que pode explicar os resultados do nosso estudo quanto aos dados clínicos e contagem de plaquetas.

O hemograma dos pacientes diagnosticados com MF do nosso estudo foi analisado, uma vez que a doença é descrita como a mais agressiva das NMP não leucêmicas e a anemia se faz presente devido a insuficiência medular. Nas diretrizes estabelecidas pelo WHO os critérios de diagnóstico para pacientes com MF são mais detalhados e requerem outros exames laboratoriais para avaliar outros componentes hematológicos. O resultado do hemograma dos pacientes com MF em um estudo dirigido por Mudireddy et al (2017) tiveram valores dentro da normalidade, sem alterações no valor de hemoglobina e leucócitos. Tefferi et al (2014) em estudo com pacientes com NMP os resultados laboratoriais do grupo de pacientes com MF não tiveram alterações nos valores de hemoglobina e leucócitos. Esses resultados clínicos e laboratoriais tanto dos pacientes com TE quanto de MF são consistentes com as demais literaturas e também

com nossos resultados, uma vez que os pacientes avaliados nesses estudos estão em tratamento com algum tipo de medicação.

O resultado molecular do nosso estudo não identificou variantes no éxon 10 do gene *MPL* em nenhum dos 64 pacientes diagnosticados com TE e MF. Conforme dados do WHO a frequência alélica de variantes para pacientes diagnosticados com TE é de 3 a 8% e para pacientes com diagnóstico de MF é de 5 a 10%.

O resultado do estudo das variantes W515L e W515K em 27 pacientes de Mercado et al (2015) encontrou a variante W515L apenas em um único paciente, mas esse estudo iniciou em 2005 quando foi identificada a variante *JAK2* V617F. Até a publicação foram identificadas variantes no gene *JAK2* em 5 pacientes com TE, no gene *CALR* em 3 pacientes com TE. Em pacientes com MF variantes foram encontradas no gene *JAK2* em 1 paciente, e no *CALR* em 1 paciente. A frequência das variantes no estudo de Mercado et al (2015) corroboram com nossos resultados e com demais literaturas científicas, mas a identificação de variante no gene *MPL* em 1 paciente desse estudo não pode ser comparado devido ao estudo ter um prazo de quase uma década.

Em um estudo com a população egípcia Eldeweny et al (2019) analisou o resultado molecular de 60 pacientes com NMP, 43,3% diagnosticados com TE e 33,3% com MF e em nenhum desses pacientes foi identificado variantes no éxon 10 do gene *MPL*. O número amostral deste estudo é aproximado ao nosso estudo, mas não analisamos os pacientes com diagnóstico para PV.

No Vietnã um estudo conduzido por VU et al (2019) com 395 pacientes diagnosticados com NMP teve o resultado da frequência de variantes na seguinte ordem: 222 pacientes com *JAK2*; 109 *CALR*; 4 *MPL* e 60 Triplo-negativos. Mesmo em um estudo com o número amostral elevado podemos perceber a baixa frequência de variantes no gene *MPL*, e os triplo-negativos possuem maior frequência se comparados com *MPL*. Esses dados corroboram com demais literaturas e com a caracterização molecular estabelecida pelo WHO.

Ainda sobre a frequência dos triplo-negativos o recente estudo de Abdelmagid et al (2023) analisou o resultado molecular de 103 pacientes diagnosticados com NMP, onde utilizou a técnica de sequenciamento de nova geração que é mais sensível para identificar variantes não somente em uma região do gene, mas em todo o gene e mais genes. O resultado apresentou que em 40% dos pacientes foram identificadas variantes no gene *ASXL1* e o *MPL* foram identificadas variantes em 6% dos pacientes (6/103), além de variantes nos genes *driver JAK2* e *CALR* outros 11 genes foram identificados variantes nesses pacientes com NMP. Apesar do número amostral superior ao nosso estudo e com a técnica de sequenciamento mais sensível, a

frequência de variantes no gene *MPL* ainda é baixa e muitos estudos em diferentes países e etnias corroboram com nossos resultados moleculares.

O presente estudo identificou algumas limitações relevantes: tamanho amostral, população em tratamento por longo período e técnica de sequenciamento. O tamanho amostral neste estudo (n=64) foi limitado se considerarmos as frequências estabelecidas pela literatura de 3% para TE e 5% para MF, onde a probabilidade de identificar variantes seria de 1,71% em TE e 0,35 em MF. Segunda limitação, a população de estudo estar em tratamento por anos com medicamentos citorrredutores onde 93% (60) quase toda a população pode ter afetado os resultados moleculares, devido a diminuição de células que podem conter variantes. E por fim a técnica utilizada o sequenciamento de Sanger, que possui sensibilidade de detecção de carga alélica variante acima de 20% e a junção dessas três limitações pode ter afetado a identificação de variantes no éxon 10 do gene *MPL* contudo apesar deste estudo não identificar nenhuma variante em nenhum indivíduo desta população, o resultado era esperado.

Em resumo este estudo fecha a linha de análise molecular dos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* o qual caracteriza pioneiramente os pacientes com NMP atendidos da FHMOAM. Os pacientes com TE e MF apresentaram maior prevalência no gênero feminino com diagnóstico em TE e mediana de idade entre 50 a 60 anos. A maioria dos pacientes em tratamento é de 93% e poucos ou nenhum possuem sintomas clínicos como esplenomegalia e eventos trombóticos, os resultados laboratoriais os valores hematológicos e contagem de plaquetas se encontram dentro da normalidade. No resultado molecular não foi identificado variantes no éxon 10 do gene *MPL* em nenhum paciente da população estudada. Embora o resultado apresentado neste estudo é necessário investigações posteriores para uma melhor caracterização molecular da população atendida na FHMOAM.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo fecha a linha de análise dos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* o qual caracteriza de forma pioneira a população com NMP atendida na FHEMOAM. A maior prevalência foi do gênero feminino com diagnóstico em TE com idades entre 50 a 60 anos. A maioria dos pacientes que estava em tratamento não possuem sintomas clínicos como esplenomegalia e eventos trombóticos, e os achados laboratoriais possuem valores considerados normais.

A técnica de sequenciamento de Sanger não identificou nenhuma variante na região do éxon 10 do gene *MPL* nas amostras analisadas neste estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tefferi A.; Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding and treatment strategies. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(5): 573-82.
2. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2006;355(23):2452-2504. doi:10.1056/nejmra063728.
3. ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, v. 127, n. 20, p. 2391 – 2406, 2016.
4. Vakil E., Tefferi A., *BCR::ABL1*-Negative Myeloproliferative Neoplasms: A Review of Molecular Biology, Diagnosis, and Treatment, *Clin. Lymphoma, Myeloma & leucemia.* 2011; 11:S37-45.
5. Chauffaille, Maria de Lourdes L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2010, v. 32, n., pp. 308-316. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000091>>. Epub 20 Ago 2010. ISSN 1806-0870. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000091>.
6. Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., Jaffe ES., Pileri SA., Stein H. et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Revised Edition.* 2017. 44(6): 53-4.
7. Macedo LC, Silva DM. Aplicação das Técnicas Moleculares no Diagnóstico das Neoplasias Mieloproliferativas. *SaBios.* 2018;12(1):57-65. <https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/2224>
8. Deininger MWN, Goldman JM, Melo J V, et al. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-3356.
9. Ross L. Levine, Mark Heaney; New Advances in the Pathogenesis and Therapy of Essential Thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 2008 (1): 76–82. doi: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.76>
10. Pereira, M. L. L., Furtado, A. L. R., Pinto, F. C. R., Flor, A. C., Teixeira, A. B., & Maia Filho, P. A. (2020). Trombose essencial: uma revisão da literatura. *Rev. bras. anal. clin*, 27-31.
11. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124:1062-9.
12. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1607–16.

13. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: Myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica*. 2014;99(9):1448–55.
14. Grando CA; Wagner SC. Avaliação Laboratorial da Doença Residual Mínima na Leucemia Mielóide Crônica por Real-Time PCR. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2008; 44(6): 433-440.
15. Monte-Mor BCR; Costa FF. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2008; 30(3): 241–248.
16. Cleyrat C, Darehshouri A, Steinkamp MP, Vilaine M, Boassa D, Ellisman MH, Hermouet S, Wilson BS. Mpl traffics to the cell surface through conventional and unconventional routes. *Traffic*. 2014 Sep;15(9):961-82. doi: 10.1111/tra.12185. Epub 2014 Jul 18. PMID: 24931576; PMCID: PMC4141020.
17. Stockklauser C, Klotter AC, Dickemann N, Kuhlee IN, Duffert CM, Kerber C, Gehring NH, Kulozik AE. A mutação P106L do receptor trombopoietina separa funcionalmente a atividade de sinalização do receptor da homeostase trombopoietina. *Sangue*. 12.125 de fevereiro de 2015(7):1159-69. doi: 10.1182/sangue-2014-07-587170. Epub 2014 Dez 23. 25538044.
18. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. 2016;129(6):667–79.
19. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017;102(1):7–17.
20. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900–11.
21. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European leukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):761-770. doi:10.1200/JCO.2010.31.8436.
22. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):680-693. doi:10.1182/blood-2016-10-695957.referred.
23. Randi ML, Putti MC. Essential thrombocytaemia in children: is a treatment needed? *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(5): 1009-14.
24. Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka HM., Barbui T., Hanson CA. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia

- vera, essential thrombocytemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007; 110(4):1092-7.
25. Giordano F., Bonicelli G., Schaeffer C., Mounier M., Carillo S., Lafon I. et al. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocytemia related to the new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica*. 2009; 94(6): 865-9.
 26. Ramirez G., García-Sánchez R., Plaza S. Tratamiento del paciente con trombocitemia esencial. *Medicina Clínica*. 2013;140(6): 278-282.
 27. Barbui T., Thiele J., Passamonti F., Rumi E., Boveri E. et al. Survival and disease progression in Essential Thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29(23): 3179-3184.
 28. Tokgoz H., Caliskan U., Yuksekkaya HA., Kucukkaya R. Essential Thrombocythemia with MPL W515K mutation in child presenting with Budd-Chiari syndrome. 2015; 26(8):805-8. doi:10.3109/09537104.2015.1041900.
 29. Vannucchi AM. Management of myelofibrosis. *Amer. Socie. Hematol*. 2011; 222-30.
 30. Bittencourt RI., Vassallo J., Chaffaille L., Xavier SG., Pagnano KB., Nascimento AC., et al. Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2012; 34(2): 140-9.
 31. Tavares RS, Nonino A, Pagnano KBB, Nascimento ACKV do, Conchon M, Fogliatto LM, et al. Guideline on myeloproliferative neoplasms: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular: Project guidelines: Associação Médica Brasileira – 2019. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 1 de julho de 2019 [citado 23 de março de 2020];41:1–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31248788>
 32. Hoffbrand, A. V., and P. A. H. Moss. Fundamentos em hematologia de Hoffbrand. Artmed Editora, 2018.
 33. Passamonti F., Mora B., Barraco D., Maffioli M. Post-ET and Post-PV Myelofibrosis: Updates on a distinct prognosis from primary myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018 Jun;13(3):173-182. doi: 10.1007/s11899-018-0453-y. PMID: 29713873.
 34. Carobbio A, Finazzi G, Thiele J, Kvasnicka HM, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Luigia Randi M, Bertozzi I, Vannucchi AM, Antonioli E, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Gangat N, Rambaldi A, Tefferi A, Barbui T. Blood tests may predict early primary myelofibrosis in patients presenting with essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2012 Feb;87(2):203-4. doi: 10.1002/ajh.22241. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22237692.
 35. Xin H., Zhigang C., Yangyan J., Xi Q., Xiaoying Z. Different mutations of the human c-MPL gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J. Hemat. Oncol*. 2013; 6(1): 11-9.

36. Bridgford JL, Lee SM., Lee CMM., Guglielmelli P., Rumi E., et al. Novel drivers and modifiers of MPL-dependent oncogenic transformation identified by deep mutational scanning. *Blood*. 2020. 135(4): 287-292.
37. Plo I., Chantelot CB., Mosca M., Mazzi S., Marty C., Vainchenker W. Genetic alterations of the thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis impacting megakaryopoiesis. *Journal Frontiers in Endocrinology*. 2017. 8:234.
38. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane cytoplasmatic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006; 107(5):1864-71.
39. Lee TS, Kantarjian H, Ma W, Yeh CH, Giles F, Albitar M. Effects of clinically relevant MIS no domínio transmembrano revelados a nível atômico através da modelagem computacional. *PLoS Um*. 2011;6(8):e23396. doi: 10.1371/journal.pone.0023396. Epub 2011 Ago 17. PMID: 21858098; PMCID: PMC3157383.
40. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P et al. New mutations of *MPL* in primitive myelofibrosis: only the *MPL* W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008; 22(8): 1557-66.
41. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjana Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochem Soc Trans*. 2013 Aug 1;41(4):1002–7.
42. Chou F-S, Mulloy JC. The Thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *J Cell Biochem*. 2011 Jun;112(6):1491–8.
43. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):1140–51.
44. Xie J, Chen X, Gao F, Hou R, Tian T, Zhang Y, Fan L, Hu J, Zhu G, Yang W, Wang H. Two activating mutations of *MPL* in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Cancer Med*. 2019 Sep;8(11):5254-5263. doi: 10.1002/cam4.2387. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31294534; PMCID: PMC6718619.
45. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6. doi: 10.1182/blood-2006-04-018879. Epub 2006 Jul 25. PMID: 16868251.

46. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, Huntly B, Erber WN. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2010 Apr;149(2):250-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08083.x. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20151976.
47. Villarouco da Silva GA, Barletta Naveca RH. Haplotype of the Promoter Region of TNF Gene May Mark Resistance to Tuberculosis in the Amazonas State, Brazil. *J Clin Cell Immunol.* 2016;7(3).
48. The International HapMap Consortium, 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature*, pp. 1299- 1320.
49. The 1000 Genomes Project Consortium, 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, Volume 467, pp. 1061-1073.
50. The 1000 Genomes Project Consortium, 2015a. A global reference for human genetic variation. *Nature*, pp. 68-74.
51. The 1000 Genomes Project Consortium, 2015b. An integrated map of structural variation in 2504 human genomes. *Nature*, pp. 75-81.
52. Li, J. Z. et al., 2008. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*, pp. 1100-1104.
53. Jakobsson, M. et al., 2008. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature*, pp. 998-1003.
54. Garrigan, D. et al., 2007. Inferring human population sizes, divergence times and rates of gene flow from mitochondrial, X and Y chromosome resequencing data. *Genetics*, Volume 177, pp. 2195-2207.
55. Silva GAV, Naveca FG, Ramasawmy R, Boechat AL. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):130–3. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.12.002
56. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 1991 Mar 25;19(6):1346. doi: 10.1093/nar/19.6.1346. PMID: 2030954; PMCID: PMC333871.
57. Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 1980;65(1):347-53. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65044-7. PMID: 6246357.

58. Himmelstein MS, Sanchez DT. Masculinity impediments: internalized masculinity contributes to healthcare avoidance in men and women. *J Health Psychol.* 2016;21(7):1283–92.
59. Gomes R, Nascimento EF do, Araújo FC. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior Why do men use health services less than women? Explanations by men with low versus higher education. *Cad Saúde Publica - Rio Janeiro.* 2007;23(3):565–74.
60. Lucena R. Os homens (ainda) não vão ao médico [Internet]. *Diário de Pernambuco.* 2019. Available at: <https://www.diariodepernambuco.com.br/noticia/opiniao/2019/10/os-homens-ainda-nao-vao-ao-medico.html>
61. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Lee DS. CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. *Am J Clin Pathol.* 2015 May;143(5):635-44. doi: 10.1309/AJCPUAAC16LIWZMM. PMID: 25873496.
62. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S, Ma X, Wilson W, Paranagama DC, Dubinski DG, Boyle J, Mascarenhas JO. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *BMC Cancer.* 2016 Feb 27;16:167. doi: 10.1186/s12885-016-2208-2. PMID: 26922064; PMCID: PMC4769833.
63. Tefferi A. Mielofibrose primária: atualização de 2021 sobre diagnóstico, estratificação de risco e manejo. *Sou J Hematol.* 2021 Jan;96(1):145-162. DOI: 10.1002/ajh.26050. EPub 2020 2 de dezembro. PMID: 33197049.
64. Mudireddy, M., Shah, S., Lasho, T., Barraco, D., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Gangat, N., Pardanani, A. and Tefferi, A. (2018), Prefibrotic *versus* overtly fibrotic primary myelofibrosis: clinical, cytogenetic, molecular and prognostic comparisons. *Br J Haematol*, 182: 594-597. <https://doi.org/10.1111/bjh.14838>.
65. Tefferi A, Alkhateeb H, Gangat N. Blast phase myeloproliferative neoplasm: contemporary review and 2024 treatment algorithm. *Blood Cancer J.* 2023 Jul 18;13(1):108. doi: 10.1038/s41408-023-00878-8. PMID: 37460550; PMCID: PMC10352315.
66. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17:1-12.

67. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: Incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008;93(3):372–80.
68. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Besses C. Cytoreduction plus low-dose aspirin versus cytoreduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythaemia: an observational study. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(6):865-71. PubMed PMID: 23577924
69. Hernández-Boluda JC, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1205-10; quiz 1387. PMID: 20508163
70. Gugliotta L, Besses C, Griesshammer M, Harrison C, Kiladjian JJ, Coll R, et al. Combination therapy of hydroxycarbamide with anagrelide in patients with essential thrombocythemia in the evaluation of Xagrid(R) efficacy and long-term safety study. *Haematologica*. 2014 Apr;99(4):679-87. PMID: 24334294
71. Barosi G1, Besses C, Birgegard G, Briere J, Cervantes F, Finazzi G, Gisslinger H, Griesshammer M, Gugliotta L, Harrison C, Hasselbalch H, Lengfelder E, Reilly JT, Michiels JJ, Barbui T. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):277-80.
72. Claire N. Harrison, et al. Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide. *Blood* 2017 130:1889-1897
73. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce S, Et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5418-24. PMID: 19826111
74. Wells G, Shea B, O'Connell D, Robertson J, Peterson J, Welch V, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Disponible em: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp
75. Petti MC, Latagliata R, Spadea T, Spadea A, Montefusco E, Aloe Spiriti MA, Avvisati G, Breccia M, Pescarmona E, Mandelli F. Melphalan treatment in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2002;116(3):576-81. Erratum in: *Br J Haematol* 2002;117(4):1002. PubMed PMID: 11849213.

76. Tefferi A, Jiménez T, Gray LA, Mesa RA, Chen MG. Radiation therapy for symptomatic hepatomegaly in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur J Haematol.* 2001;66(1):37-42. PubMed PMID: 11168506.
77. Wagner H Jr, McKeough PG, Desforges J, Madoc-Jones H. Splenic irradiation in the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia or myelofibrosis with myeloid metaplasia. Results of daily and intermittent fractionation with and without concomitant hydroxyurea. *Cancer.* 1986;58(6):1204-7. PubMed PMID: 2427184.
78. Bachleitner-Hofmann T, Gisslinger H. The role of interferon-alpha in the treatment of idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol.* 1999;78(12):533-8. Review. PubMed PMID: 10647876.
79. Löfvenberg E, Wahlin A. Management of polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and myelofibrosis with hydroxyurea. *Eur J Haematol.* 1988;41(4):375-81. PubMed PMID: 3197824.
80. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, Díaz-Beyá M, Cervantes F. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann Hematol.* 2010;89(12):1233-7. PubMed PMID: 20567824.
81. Manoharan A. Management of myelofibrosis with intermittent hydroxyurea. *Br J Haematol.* 1991;77(2):252-4. PubMed PMID: 2004030.
82. Engström KG, Löfvenberg E. Treatment of myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability. *Blood.* 1998;91(10):3986-91. PubMed PMID: 9573039.
83. Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, Tefferi A. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol.* 2008;83(5):363-5. PubMed PMID: 18266209.
84. Nand S, Stock W, Godwin J, Fisher SG. Leukemogenic risk of hydroxyurea therapy in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Am J Hematol.* 1996;52(1):42-6. PubMed PMID: 8638610.
85. Nielsen I, Hasselbalch HC. Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan. *Am J Hematol.* 2003;74(1):26-31. PubMed PMID: 12949887.

86. Levels of Evidence and Grades of Recommendations - Oxford Centre for Evidence Based Medicine. Disponível em URL: http://cebm.jr2.ox.ac.uk/docs/old_levels.Htm
87. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17:1-12.
88. Wells G, Shea B, O'Connell D, Robertson J, Peterson J, Welch V, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Disponível em: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp
89. Goldet G, Howick J. Understanding GRADE: an introduction. *J Evid Based Med* 2013; 6:50-4.
90. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, Sant'Antonio E, Ferretti V, Pancrazzi A, Rotunno G, Severgnini M, Pietrelli A, Astori C, Fugazza E, Pascutto C, Boveri E, Passamonti F, De Bellis G, Vannucchi A, Cazzola M; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4388-95. doi: 10.1182/blood-2013-02-486050. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23575445; PMCID: PMC3663431.
91. Pietra D, Brisci A, Rumi E, Boggi S, Elena C, Pietrelli A, Bordoni R, Ferrari M, Passamonti F, De Bellis G, Cremonesi L, Cazzola M. Deep sequencing reveals double mutations in cis of MPL exon 10 in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011 Apr;96(4):607-11. doi: 10.3324/haematol.2010.034793. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21228032; PMCID: PMC3069239.
92. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, Huntly B, Erber WN. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2010 Apr;149(2):250-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08083.x. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20151976.
93. Brisci A, Damin F, Pietra D, Galbiati S, Boggi S, Casetti I, Rumi E, Chiari M, Cazzola M, Ferrari M, Cremonesi L. COLD-PCR and innovative microarray substrates for detecting and genotyping MPL exon 10 W515 substitutions. *Clin Chem*. 2012 Dec;58(12):1692-702. doi: 10.1373/clinchem.2012.192708. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23065476.

94. Lee Tokar L, Kearney L, Langabeer SE. *MPL* exon 10 mutations in Irish patients with a suspected myeloproliferative neoplasm. *EXCLI J*. 2021 Feb 1; 20:197-198. doi: 10.17179/excli2021-3454. PMID: 33628158; PMCID: PMC7898040.
95. Chen X, Qi X, Tan Y, Xu Z, Xu A, Zhang L, Wang H. Detection of *MPL* exon10 mutations in 103 Chinese patients with *JAK2V617F*-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood Cells Mol Dis*. 2011 Jun 15;47(1):67-71. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.04.004. Epub 2011 May 8. PMID: 21555228.
96. Ivanova MI, Shivarov VS, Hadjiev EA, Naumova EJ. Novel multiplex bead-based assay with LNA-modified probes for detection of *MPL* exon 10 mutations. *Leuk Res*. 2011 Aug;35(8):1120-3. doi: 10.1016/j.leukres.2011.04.012. Epub 2011 May 12. PMID: 21570117.
97. Sugimoto Y, Nagaharu K, Ohishi K, Nakamura M, Ikejiri M, Nakatani K, Mizutani M, Tamaki S, Ikeda T, Tawara I, Katayama N. *MPL* exon 10 mutations other than canonical *MPL* W515L/K mutations identified by in-house *MPL* exon 10 direct sequencing in essential thrombocythemia. *Int J Hematol*. 2021 May;113(5):618-621. doi: 10.1007/s12185-021-03134-6. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33770389.
98. Moncada A, Pancrazzi A. Lab tests for MPN. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2022; 366:187-220. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.02.010. Epub 2021 Apr 5. PMID: 35153004.
99. Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol*. 1999 Feb;52(1):1-10. doi: 10.1136/mp.52.1.1. PMID: 10439832; PMCID: PMC395663.
100. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol*. 2014; 1099:65-75. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_7. PMID: 24243196.
101. Green MR, Sambrook J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 May 1;2018(5). doi: 10.1101/pdb.prot095117. PMID: 29717051.
102. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.
103. Frawley T, O'Brien CP, Conneally E, Vandenberghe E, Percy M, Langabeer SE, Haslam K. Development of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay to Detect Diagnostically Relevant Mutations of *JAK2*, *CALR*, and *MPL* in Myeloproliferative Neoplasms. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018 Feb;22(2):98-103. doi: 10.1089/gtmb.2017.0203. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29323541.

104. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009 Jan;67(1):6-20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x. PMID: 19120456.
105. Akpınar TS, Hançer VS, Nalçacı M, Diz-Küçükaya R. MPL W515L/K Mutations in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Turk J Haematol.* 2013 Mar;30(1):8-12. doi: 10.4274/tjh.65807. Epub 2013 Mar 5. PMID: 24385746; PMCID: PMC3781658.
106. Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015 Mar;8(1):16-21. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25637689.
107. Rozovski U, Verstovsek S, Manshouri T, Dembitz V, Bozinovic K, Newberry K, Zhang Y, Bove JE 4th, Pierce S, Kantarjian H, Estrov Z. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2, CALR, and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2017 Jan;102(1):79-84. doi: 10.3324/haematol.2016.149765. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27686378; PMCID: PMC5210235.
108. Vu HA, Thao TT, Dong CV, Vuong NL, Chuong HQ, Van PNT, Nghia H, Binh NT, Dung PC, Xinh PT. Clinical and Hematological Relevance of JAK2V617F, CALR, and MPL Mutations in Vietnamese Patients with Essential Thrombocythemia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Sep 1;20(9):2775-2780. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.9.2775. PMID: 31554376; PMCID: PMC6976857.
109. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL, Williams GM, Carbonell MM, Pratti AF. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with *BCR::ABL1*-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2018 May;23(4):208-211. doi: 10.1080/10245332.2017.1385891. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28990497.

9. ANEXOS

9.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

Pesquisador: ANDRÉA MONTE RO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39991420.6.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.450.813

Apresentação do Projeto:

As Neoplasias Mieloproliferativas crônicas são doenças clonais causadas pela proliferação aberrante de células hematopoiéticas na medula óssea. Caracterizam-se por rearranjos genéticos cujos produtos atuam nas principais vias de transdução de sinais celulares (JAK/STAT, a via PI3K-AKT e proteínas da via MAPK) que conduzem a uma superprodução simples ou multilinear dos elementos eritróides, mielóides e megacariocíticos. Entre as neoplasias mieloproliferativas crônicas mais frequentes destacam: Leucemia Mielóide Crônica (BCR-ABL1 +), Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária; estas últimas classificadas como BCR-ABL.

As neoplasias mieloproliferativas crônicas representam um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética, sendo caracterizadas por proliferação elevada, mas com diferenciação e maturação relativamente preservadas.

Nos últimos anos, diversos estudos permitiram a descoberta das bases moleculares dessas doenças, que têm, em comum, a ativação constitutiva da tirosinoquinase decorrente de mutações adquiridas pela célula-tronco hematopoética.

Sabe-se que a detecção de mutações nos genes JAK2, MPL e CARL e o conhecimento de fatores genético individuais podem contribuir para uma melhor avaliação prognóstica dos pacientes com NMC que, apesar de diagnóstico definido respondem de forma diferente durante o curso do tratamento. Assim, ao conhecer o background genético dos pacientes espera-se traçar um perfil

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

clínico baseadas nas variantes encontradas nesta população a fim de que biomarcadores moleculares sejam utilizados para ajudar a controlar o avanço da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

Objetivo Secundário:

- Rastrear a translocação BCR-ABL1 p210 mediante análise de transcritos b2a2 e b3a2;
- Determinar a frequência de mutações nos genes JAK2 (JAK2V617F, éxon 12), CALR (mutações éxon 9) e MPL (mutações éxon 10);
- Avaliar a presença simultânea da mutação BCR-ABL1 e JAK2V617F;
- Identificar o haplótipo do gene JAK2 (pesquisa do alelo G pelo SNP rs10974944);
- Avaliar a associação da presença do alelo G com a mutação V617F do gene JAK2;
- Associar as mutações nos genes JAK2, MPL e CALR com características clínicas e laboratoriais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos da pesquisa caracterizam-se por perda de amostras, de informações dos pacientes e quebra de sigilo. A fim de evitá-los, as amostras serão identificadas e armazenadas corretamente tornando-se viáveis para estudos futuros. Os dados pessoais dos participantes da pesquisa serão armazenados em planilha do software Microsoft Excel, acessível somente aos pesquisadores do estudo em estado de sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Benefícios:

Os benefícios da participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas na população Amazonense, à compreensão de novos achados genéticos que geram grande impacto no manejo e tratamento destas malignidades hematológicas. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aquisição de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população alvo.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP.HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, metodologia coerente com objetivos e cronograma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de rosto anexada à PB;
- 2) Cartas de anuência anexadas à PB;
- 3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anexado à PB;
- 4) Instrumento da Pesquisa junto com o projeto anexado à PB;
- 5) Riscos: Anexados à PB;
- 6) Benefícios: Anexados à PB;
- 7) TCUD anexado à PB;
- 8) Currículo lattes do pesquisador responsável anexado à PB.
- 9) Cronograma: Adequado.

Recomendações:

Vide conclusões ou pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é importante para caracterizar molecularmente pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária, sendo viável do ponto de vista ético e de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1658907.pdf	04/12:2020 18:46:29		Ace to
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEfinal.pdf	04/12:2020 18:46:00	ANDRÉA MONTEIRO TARFAGÓ	Ace to
Outros	AndreaTarrago.pdf	02/12:2020 18:05:17	ANDRÉA MONTEIRO	Ace to
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.pdf	09/11:2020 16:49:52	ANDRÉA MONTEIRO	Ace to

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

Investigador	projeto.pdf	09/11/2020 16:49:52	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	09/11/2020 16:42:42	ANDRÉA MONTEIRO TARFAGÓ	Áce to
Outros	tcud.pdf	09/11/2020 16:38:18	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Instituição e Infraestrutura	hemoam.pdf	09/11/2020 16:35:37	ANDRÉA MONTEIRO TARFAGÓ	Áce to
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/11/2020 16:29:12	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Outros	labgen.pdf	09/11/2020 16:23:30	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Outros	SAME.pdf	09/11/2020 16:23:05	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Emanuela.pdf	09/11/2020 16:20:31	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Lucivana.pdf	09/11/2020 16:20:05	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Wanessa.pdf	09/11/2020 16:17:36	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Nelson.pdf	09/11/2020 16:17:18	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Dania.pdf	09/11/2020 16:16:56	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Miliane.pdf	05/11/2020 18:14:02	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Juliana.pdf	05/11/2020 18:13:26	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Adriana.pdf	05/11/2020 18:12:50	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Allyson.pdf	05/11/2020 18:12:19	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to
Declaração de Pesquisadores	Andrea.pdf	05/11/2020 18:12:01	ANDRÉA MONTEIRO	Áce to

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

MANAUS, 09 de Dezembro de 2020

Assinado por:
SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Conforme Resolução N° 466/12 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

O presente documento visa convidá-lo para participar no projeto de pesquisa que tem por título: “**Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas**”, sendo a pesquisadora responsável: Dra. Andréa M. Tarragó e colaboradores. Assim, o estudo tem como objetivo caracterizar as alterações genéticas que estão presentes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas: Leucemia mielóide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MP).

JUSTIFICATIVA: Mediante da sua participação nesta pesquisa, a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia de Amazonas- HEMOAM permitirá oferecer ferramentas no diagnóstico/prognóstico em pacientes que sejam atendidos na Fundação com doenças no sangue chamadas neoplasias mieloproliferativas crônicas. Assim como compreender novos conhecimentos que provocam grande impacto no acompanhamento do tratamento destas doenças. No Estado de Amazonas não existem pesquisas sobre estudo molecular de Neoplasias Mieloproliferativas crônicas, que identifiquem alterações em genes denominados *JAK2*, *MPL* e *CALR*, importantes no desenvolvimento de doenças no sangue (neoplasias mieloproliferativas crônicas). O estudo proposto abrange seres humanos; portanto envolve certos riscos/ desconfortos e benefícios, os quais são apresentados a seguir:

RISCOS E DESCONFORTOS: Sua participação nesta pesquisa não está associada a nenhum tipo de risco, os únicos desconfortos estão associados ao processo de coleta do sangue, manifestando uma possível aparição de hematoma, sangramento no sítio de punção, ardor causado pelo álcool, lesão de nervo (raramente), náuseas, vômitos ou desmaios. Ressalta-se que a equipe de coleta de amostras é altamente qualificada, os quais possuem manuais e treinamentos para identificar e tratar reações que possam surgir durante ou após extração do sangue.

BENEFÍCIOS: Os benefícios indiretos da sua participação nesta investigação estão direcionados ao estudo molecular (material genético) de doenças no sangue chamadas neoplasias Mieloproliferativas crônicas na população Amazonense e à aquisição de novos conhecimentos que provocam grande impacto no monitoramento e tratamento destas doenças. Com isso, a realização desta pesquisa contribuirá à aplicação de ferramentas diagnósticas/prognósticas a favor da população em estudo; não originando nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes desta pesquisa.

Em caso de você aceitar participar do estudo, serão realizados os seguintes procedimentos:

PROCEDIMENTO DE COLETA DO SANGUE/ ANÁLISE LABORATORIAL: Será extraída uma amostra de sangue, limpando o sítio de punção com algodão e álcool, empregando agulhas e tubos plásticos novos e estéreis. As amostras do sangue serão coletadas em quatro tubos (um com tampa azul, um com tampa amarela e dois com tampa roxa), utilizando um volume de sangue acorde às indicações do fabricante. Ao finalizar a punção, a amostra se armazenará em condições ótimas até sua análise laboratorial.

REVISAO DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS: Serão revisados os seus prontuários médicos tanto nos arquivos físicos como nos arquivos digitais (arquivos armazenados no sistema do HEMOAM) para obtenção de dados clínicos como Sexo, Idade, diagnóstico (CID= Código estabelecido para uma determinada doença) resposta ao tratamento e quadro clínico manifestado.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contactar diretamente Dra. Andréa Monteiro Tarragô, pesquisadora responsável pelo estudo, através do telefone (92) 99136-0001 ou por e-mail andrea_s_monteiro@hotmail.com. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar e do seu acompanhante. A equipe da pesquisa irá garantir que você receba assistência imediata para reparação a dano (caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios), sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Após conhecer os procedimentos que serão realizados para desenvolver o estudo, você deverá saber o seguinte:

VOLUNTARIEDADE: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito a recusar-se a participar ou retirar-se do estudo em qualquer momento, sem que esta decisão afete a qualidade de atendimento médico (ou de outra índole) no HEMOAM. Cabe mencionar, que você não perderá nenhum direito legal por assinar este documento.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais durante o desenvolvimento da pesquisa toda, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. Assim mesmo, os dados obtidos de testes realizados poderão ser utilizados de forma anônima para publicações científicas ou ser apresentados em uma reunião científica. Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cephemam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos futuros. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Desta forma, o Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras relacionadas com o estudo de alterações genéticas que desenvolvem doenças no sangue?

() Sim ou () Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)



(Assinatura do pesquisador)

(Impressão dactiloscópica)

Manaus, ____/____/____

9.3. Protocolo de extração de DNA

EXTRAÇÃO DE DNA – BRAZOL

1.0. Fase pré-extração de DNA:

- 1) Separar as amostras que serão extraídas e descongelar naturalmente;
- 2) Certificar se o banho-maria está na temperatura ideal de 56°C;
- 3) Verificar a disponibilidade de microtubos de 2,0 mL e 1,5 mL e identifica-los;
- 4) Verificar se existe quantidade suficiente de etanol 100% e clorofórmio;
- 5) Separar caixa com gelo para manter os reagentes (todos devem ser mantidos no gelo).

2.0. Fase de extração de DNA:

- 1) Pipetar 200 µL (microlitros) da amostra de sangue em um microtubo de 2,0 mL, devidamente identificados. A amostra deve ser homogeneizada antes de pipetar. Em algumas situações é possível pipetar o *buffy coat*.
- 2) Adicionar 400 µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vórtex até a amostra adquirir aspecto homogêneo;
- 3) Adicionar 100 µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturar no vórtex até a amostra adquirir uma coloração “**cor de chocolate**”;
- 4) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A (22°C);
- 5) Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em duas partes;
- 6) Pipetar cuidadosamente a fase superior (**SOBRENADANTE**) e transferir para tubos de 1,5 mL identificados corretamente.

3.0. Fase de precipitação do DNA genômico:

- 1) Adicionar 500 µL de etanol 100% gelado (armazenado a 4°C), homogeneizar no vórtex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 – 60 segundos;
- 2) Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A (22°C);
- 3) Descartar o sobrenadante e adicionar novamente 500 µL de etanol 100% gelado (armazenado a 4°);
- 4) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- 5) Descartar o sobrenadante;
- 6) Remover o etanol residual com pipeta e colocar no banho seco 56°C por 10 minutos;
- 7) Adicionar 100 µL de água destilada estéril em cada tubo (H₂O_{dd}) – **OBS.:** adicionar primeiro 50 µL, ver a concentração e, se necessário, adicionar mais 50 µL em casos em que a concentração está alta. Se estiver baixa (abaixo de 50 ng) adicionar apenas 50 µL.
- 8) Quantificar o DNA genômico no Nanodrop;
- 9) Armazenar o DNA purificado a 4°C ou -20°C.

9.4. Protocolo: Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG)

A precipitação com PEG atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1 ul da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou como primer-dimers.

Antes de iniciar o procedimento:

- Armazene etanol 80% a -20 C. (utilizar etanol 80% ou preparar a partir de etanol absoluto $C1V1=C2V2$, sendo V1 meu X)
- Programe o banho-maria seco a 37° C.
- Prepare placas de sequenciamento ou tubos de máximo 1,5 mL.
- Em caso necessário, preparar o PEG 20% W\V PEG 2,5 M NaCl) Para sua preparação, usar:
10 g de PEG 8000
7,3 g de NaCl
Adicione 35 mL de ddH₂O. Agite para solubilizar o PEG durante 20 min ou até solubilizar. Após agitação, completar o volume para 50 mL com ddH₂O.

Procedimento:

- 1- Transfira o volume do PEG no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento.
*LEMBRE-SE: O volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR. Neste caso 20 uL + 20 uL.
- 2- Transfira o volume do amplicon no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento. 3- Agite suavemente por 10 seg (em caso de ser tubo) e incube a 37° C por 15 min.
- 4- Após incubação, centrifugue a 2500 rcf (6000 rpm) por 15 min a temperatura ambiente em caso de ser tubo. Em caso de ser placa centrifugar entre 2200-2500 rcf por 25 min a temperatura ambiente.
- 5- Descarte o sobrenadante (por inversão da placa) e adicione 125 uL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf (4500 rpm) por 2 min a 4° C.
- 6- Descarte o sobrenadante, dei um spin com a placa invertida e deixe secando a 60°C por 10 min para remoção de resíduos de etanol. Deixe a placa sem adesivo. Em caso de tubos, a secagem pode ser a 37°C entre 20-50 min.
- 7- Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione H₂O milli Q ou ultrapura, adicionando o mesmo volume inicial da PCR (20 uL). *LEMBRE-SE: Amostras com banda fraca ou pouca quantidade de amostra devem ser ressuspensas em menor quantidade de H₂O, 12 uL de água.
- 8- Homogenice e armazene a amostra a -80°C. *LEMBRE-SE: Antes de armazenar as amostras a -80°C, armazene a 4-5°C por algumas horas para melhor eluição de DNA.
- 9- Quantificar as amostras pelo menos 3 dias após precipitação, passando do freezer (-80°C) à geladeira 4-5°C pelo menos 2 H antes da quantificação.

9.5.Preparação do mastex mix para sequenciamento

- 1- Preparar o mapeamento de amostras, colocando as amostras por duplicata (metade da placa para leitura de Primer Forward e a outra metade para leitura do primer Reverse), sendo o nosso protocolo de trabalho o seguinte,
- 2- Aliquotar do Primer-Forward e do primer reverse utilizados na PCR. (Calcular a quantidade a utilizar segundo número de amostras).
- 3- Preparar o mix com os seguintes reagentes:

MIX DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE SANGER		
Reagente	1 Reação Vol (1 uL)	22 Reações (Vol uL)
H2O ultrapura	4,5/5,0/5,5	99
Tampão 5X	2,0	44
Primer [3.3 Mm]	1,0	22
BigDye	0,5	11
Produto amplificado	2,0/1,5/1,0	2
TOTAL por poço/tubo	10	10

Após mescla, levar para termociclador e preparar a seguinte programação de ciclagem:

Stage 1	96°C por 1 min	1 ciclo
Stage 2	96°C por 10 seg	15 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 15 seg	
Stage 3	96°C por 10 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 30 seg	
Stage 3	96°C por 10 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 1 min, 30 seg	
Stage 4	96°C por 10 seg	5 ciclos
	55°C por 15 seg	
	60°C por 2 min	
Stage 5	4°C, ∞	1 ciclo

9.6.Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol)

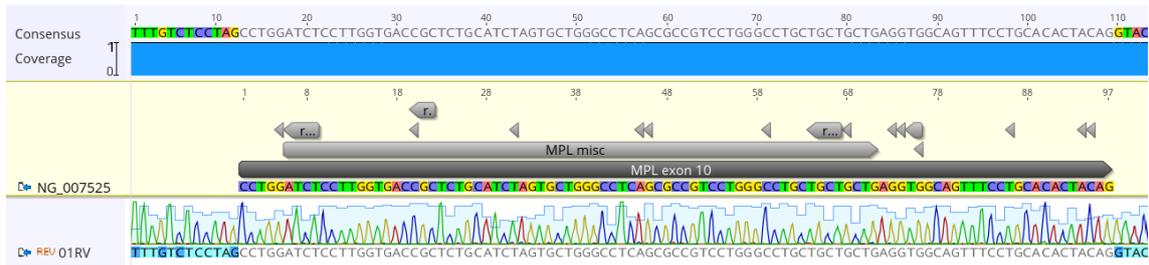
- 1- Após reação de sequenciamento, centrifugar a placa a 2000 rpm x 2 min a 4°C. 2- Em cada poço, adicionar:
 - 2,5 uL de EDTA (125 mM)
 - 25 uL de etanol 100% gelado
- 3- Realizar um spin e incubar a temperatura ambiente e protegido da luz por 15 min. 4- Centrifugar a 2000 rcf x 45 min a 4°C.
- 5- Inverter a placa na pia para descartar material não aderido na reação e centrifugar a placa invertida a 100 rcf x 1 min.
- 6- Adicionar 35 uL de etanol 70% (temperatura ambiente) em cada poço. 7- Centrifugar a 1650 rcf por 15 min a 4°C.
- 8- Inverter a placa na pia para descartar material não aderido na reação e centrifugar a placa invertida a 100 rcf x 1 min.
- 9- Secar a placa no termociclador a 60°C x 10 min (OBSERVAÇÃO: Colocar a placa sem tampa).
- 10- Armazenar a -20°C as placas até realizar leitura no sequenciador. As placas podem ficar até 1 mês. Em caso de ler no mesmo dia não congelar.

9.7.Preparação de amostras pré-leitura no sequenciador

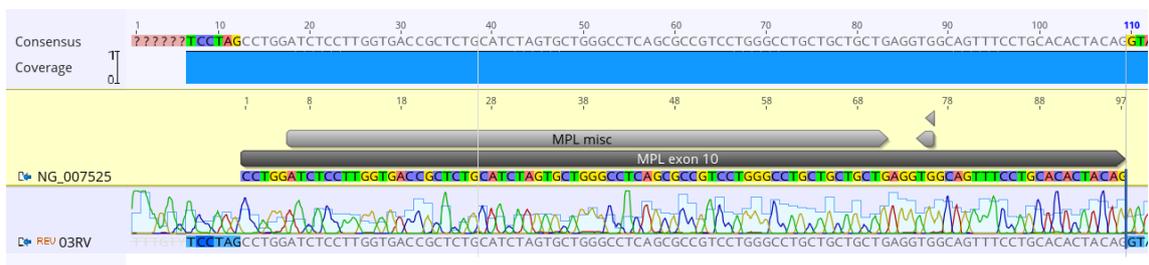
Prepare o termociclador ou termobloco a 95°C.

- 1- Nas amostras que foram armazenadas a -20°C, adicione 10 uL de Formamida em cada poço.
- 2- Realizar um breve spin na placa.
- 3- Aquecer a placa no termociclador a 95°C por 1 minuto.
- 4- Ler no sequenciador. (Em caso de não ser lidas nesse momento congelar a -20°C)

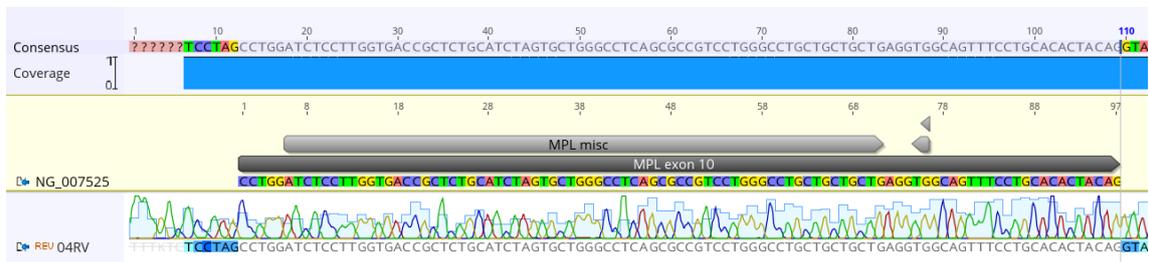
9.8. Eletroferograma dos pacientes incluídos no estudo



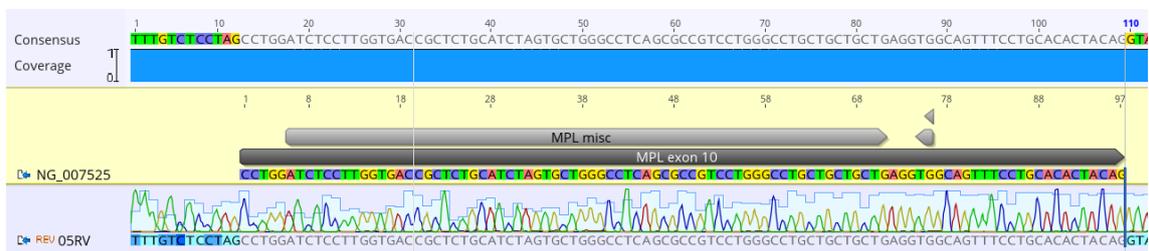
Paciente NMP1



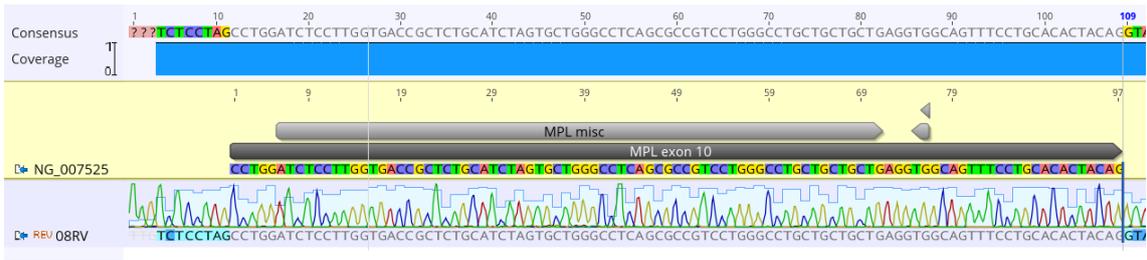
Paciente NMP3



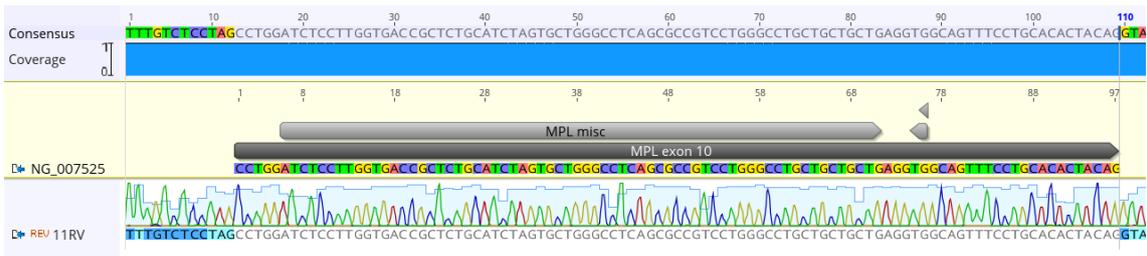
Paciente NMP4



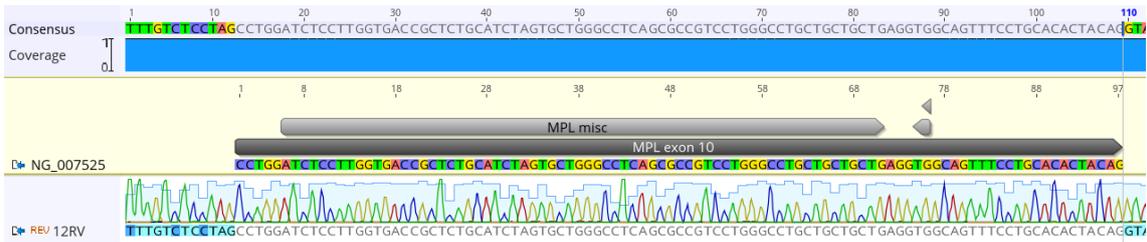
Paciente NMP5



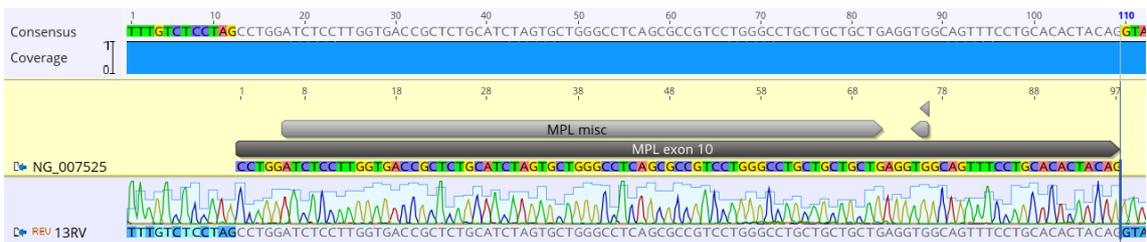
Paciente NMP8



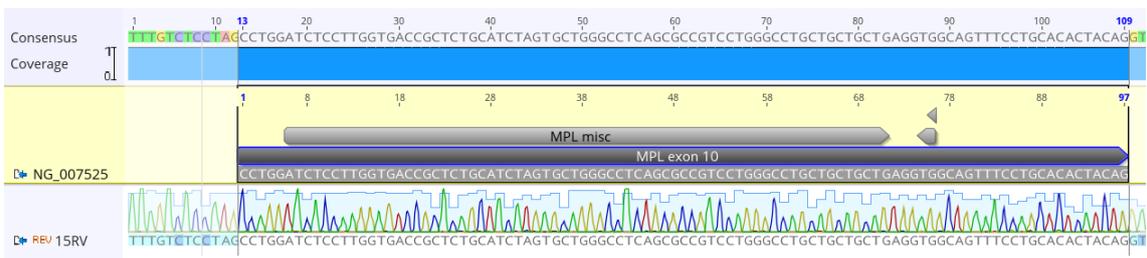
Paciente NMP11



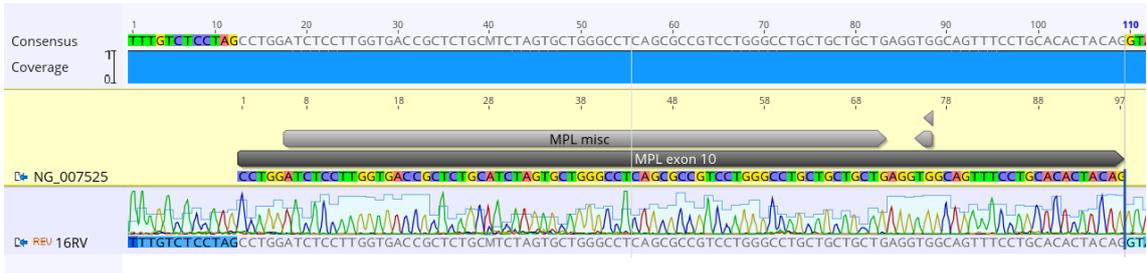
Paciente NMP12



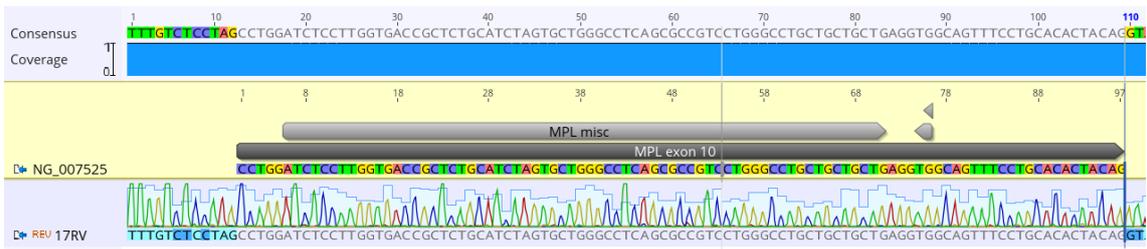
Paciente NMP13



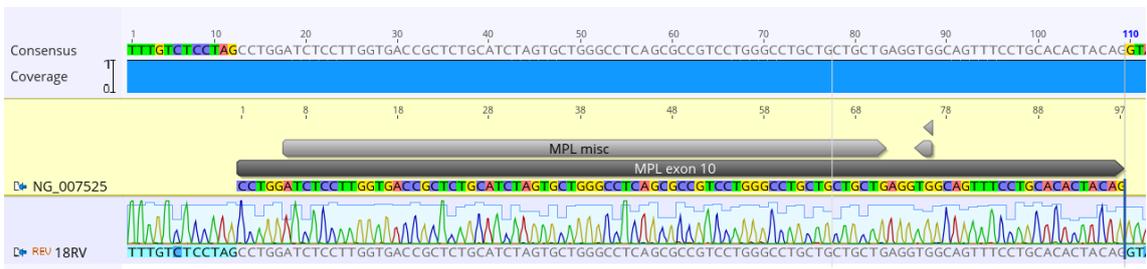
Paciente NMP15



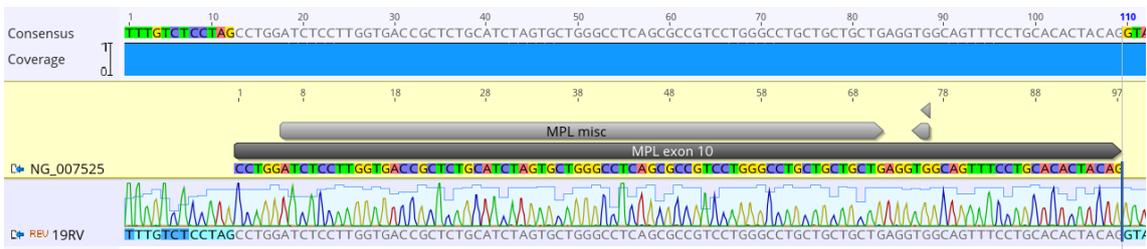
Paciente NMP16



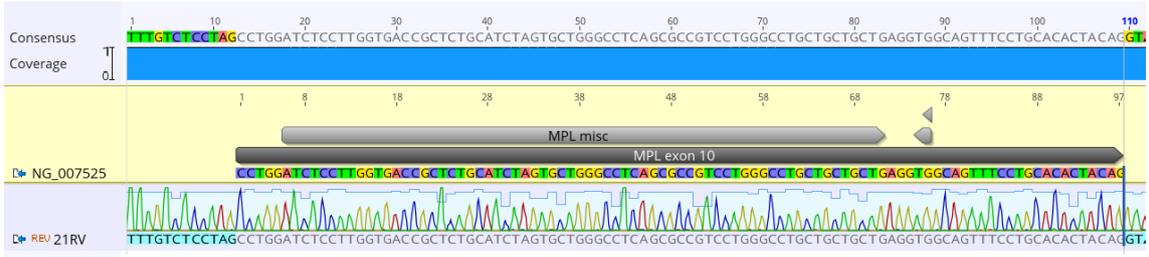
Paciente NMP 17



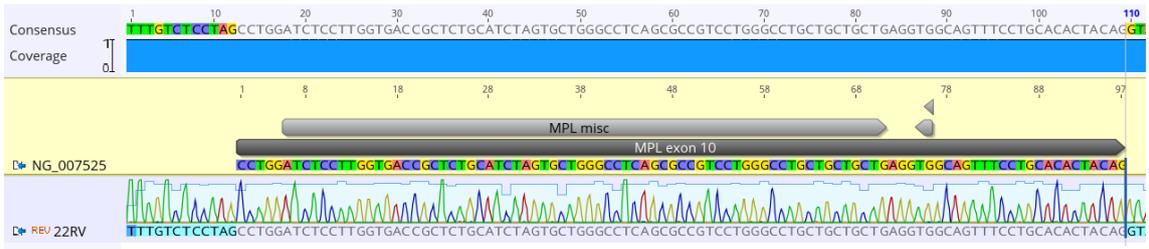
Paciente NMP18



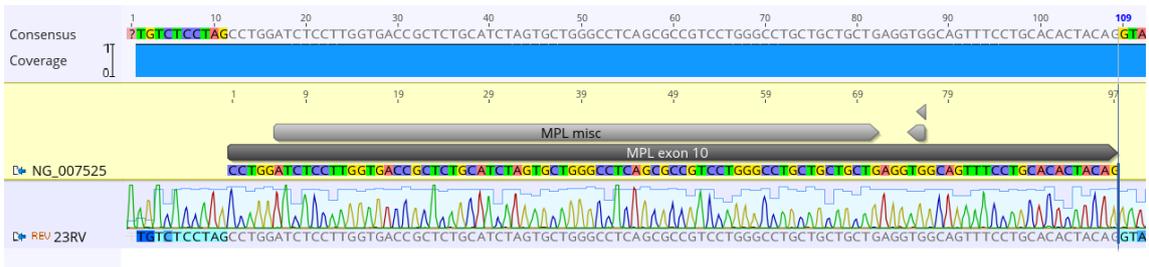
Paciente NMP19



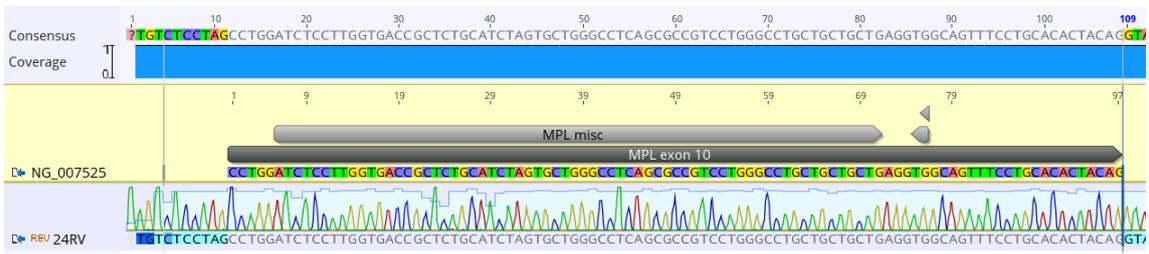
Paciente NMP21



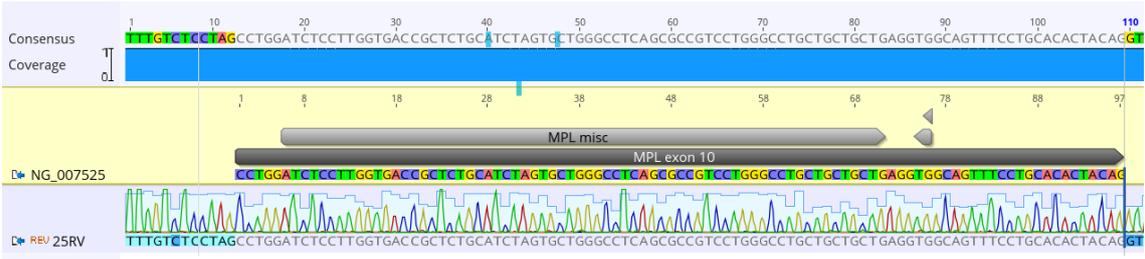
Paciente NMP22



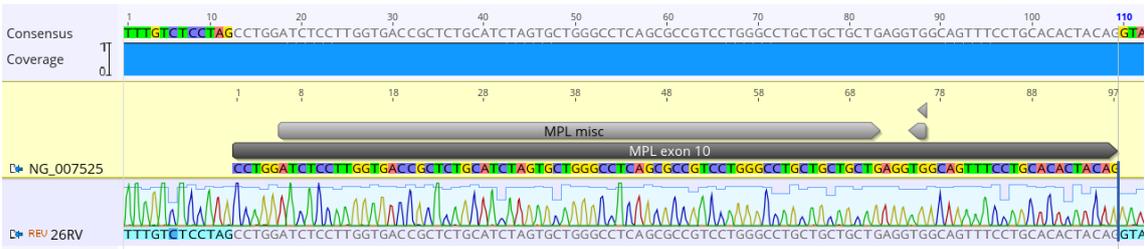
Paciente NMP23



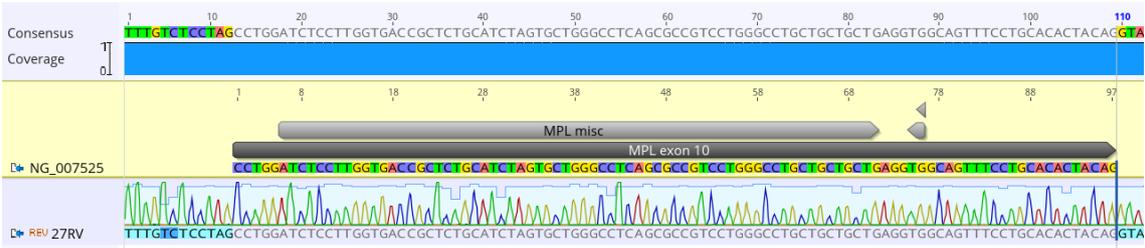
Paciente NMP24



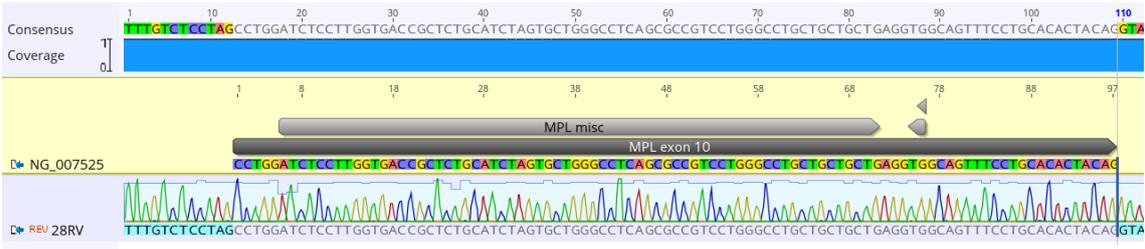
Paciete NMP25



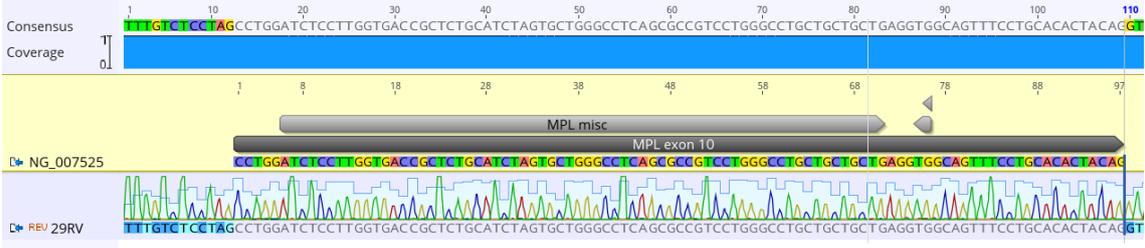
Paciete NMP26



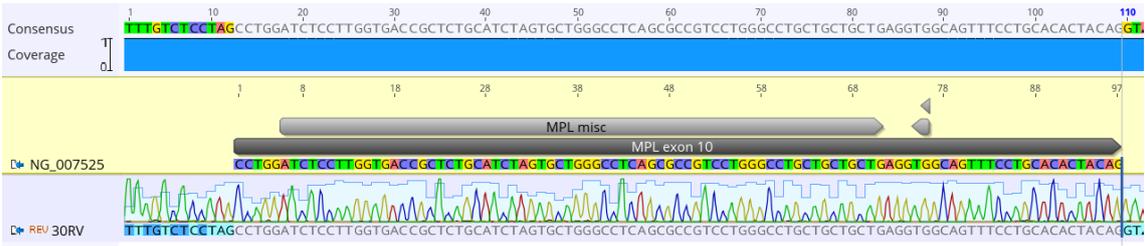
Paciete NMP27



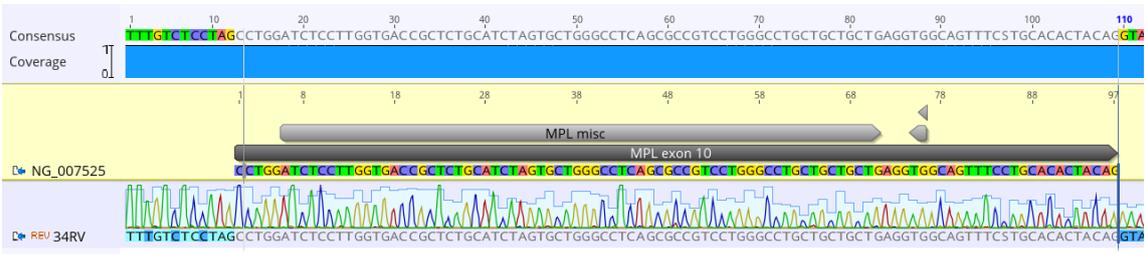
Paciete NMP28



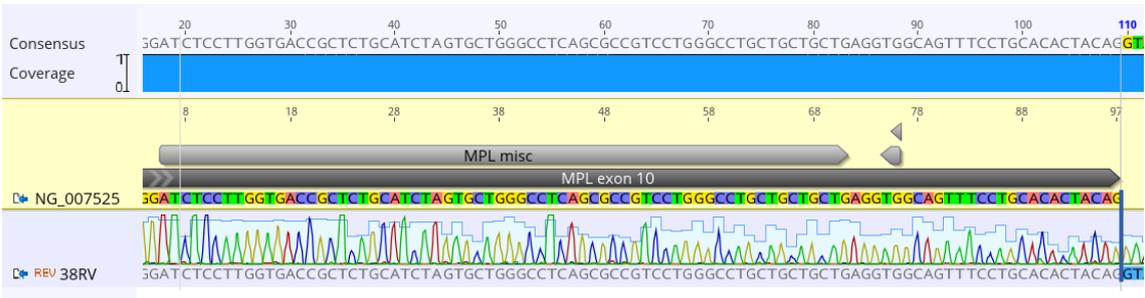
Paciete NMP29



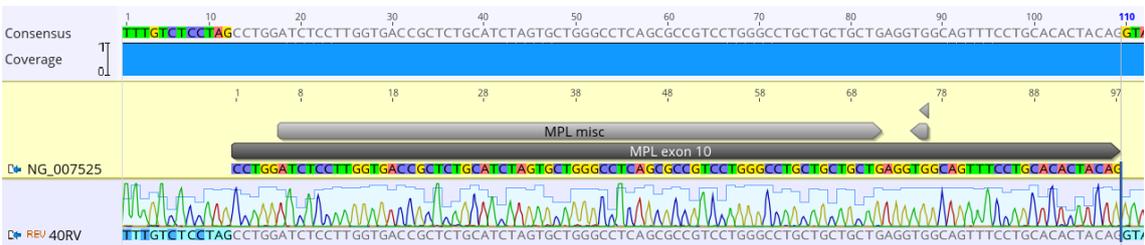
Paciente NMP30



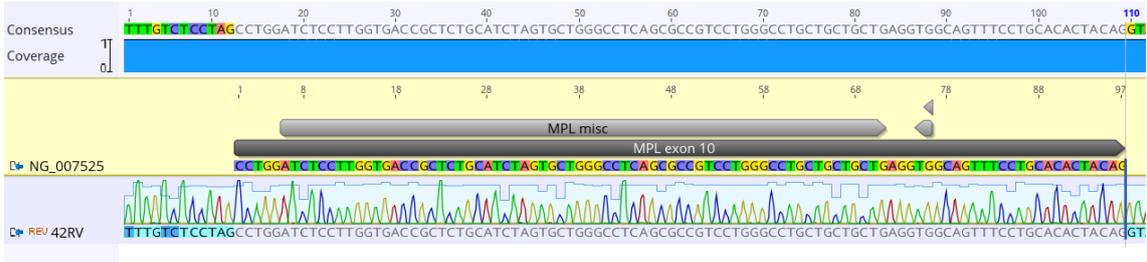
Paciente NMP34



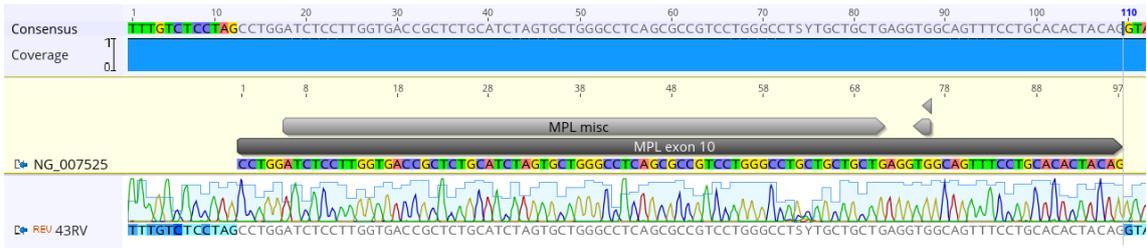
Paciente NMP38



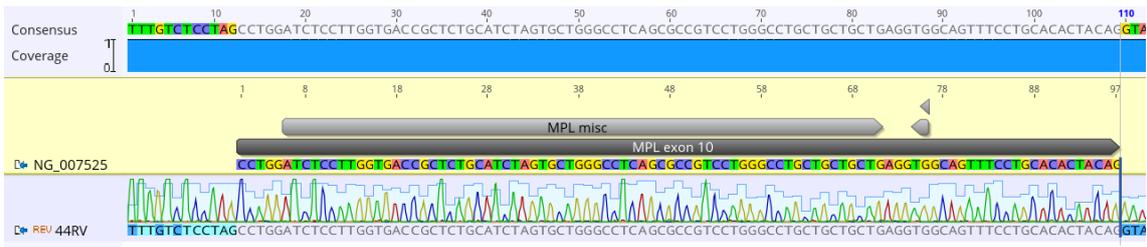
Paciente NMP40



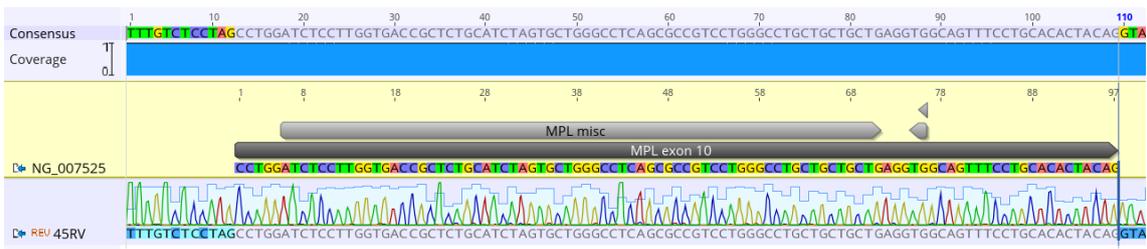
Paciente NMP42



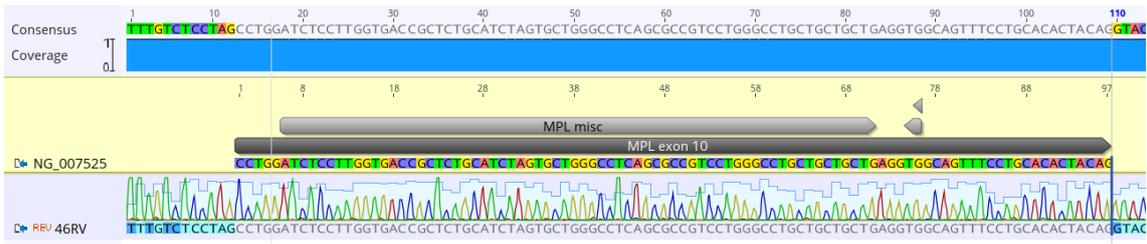
Paciente NMP43



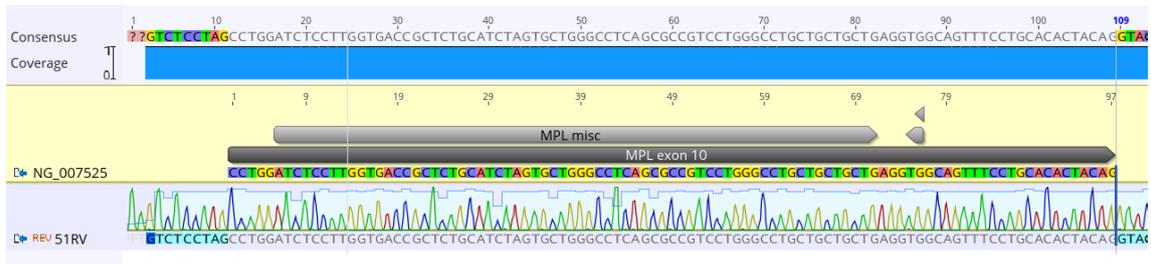
Paciente NMP44



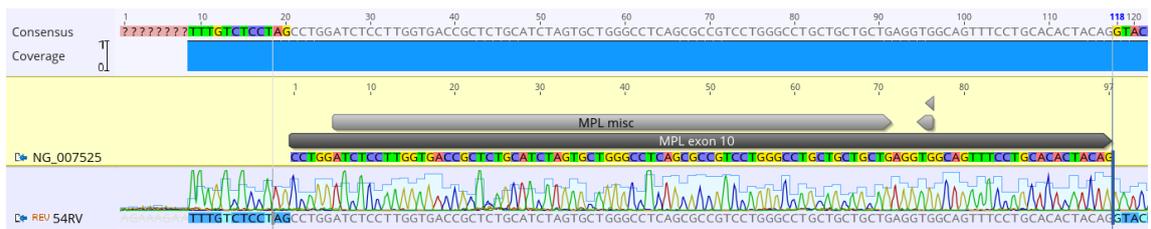
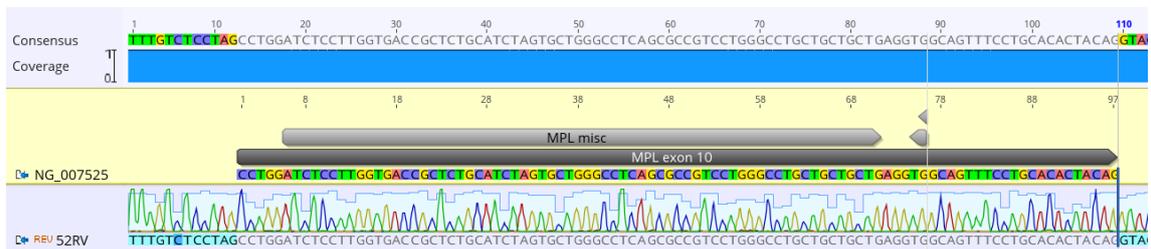
Paciente NMP45



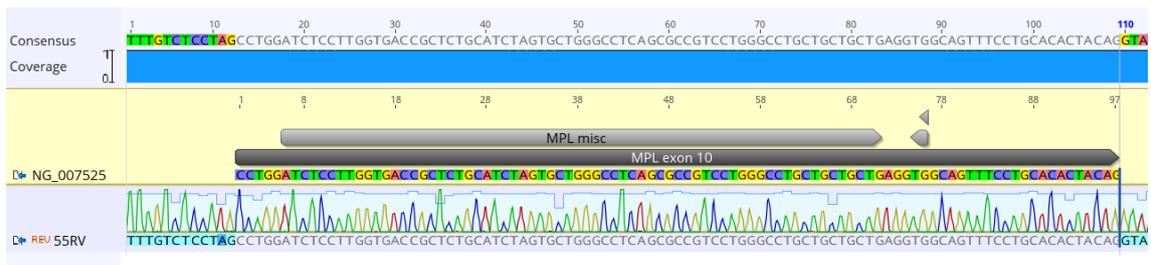
Paciente NMP46



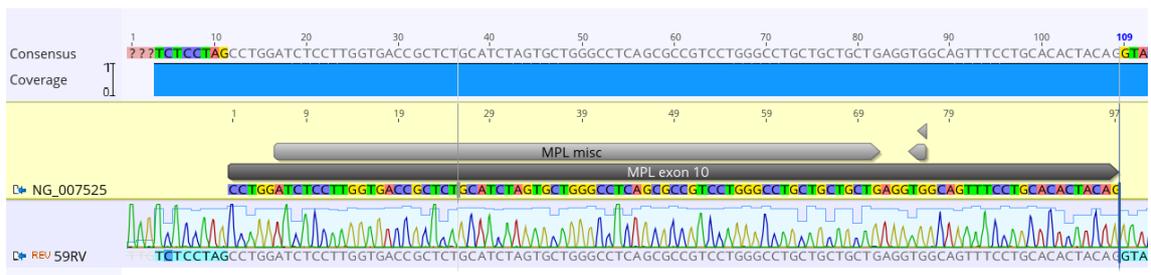
Paciente NMP51



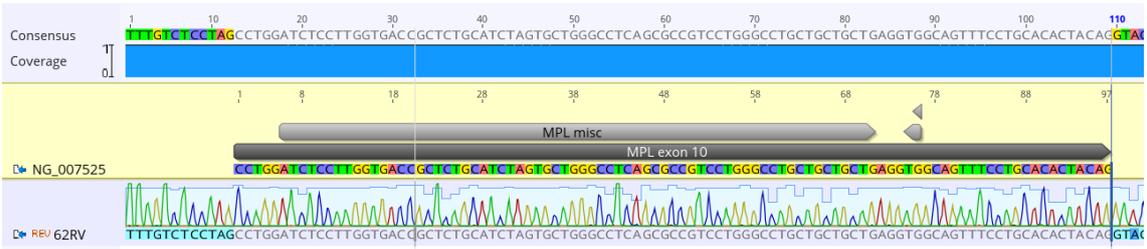
Paciente NMP52



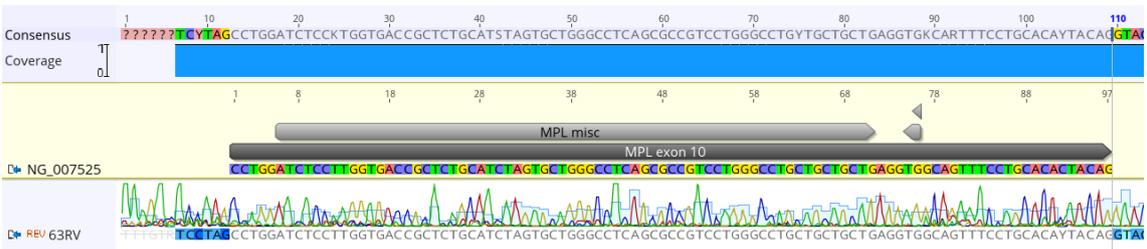
Paciente NMP55



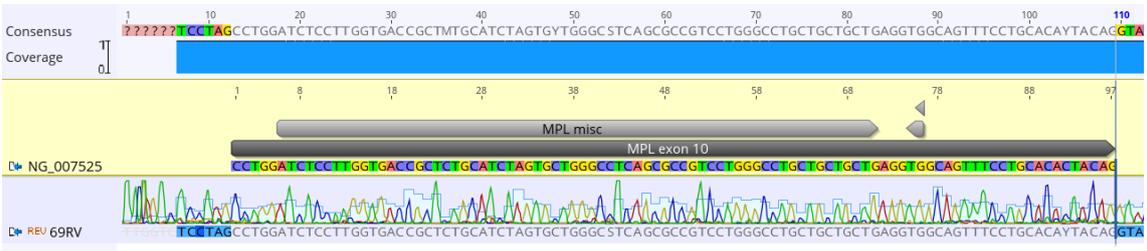
Paciente NMP59



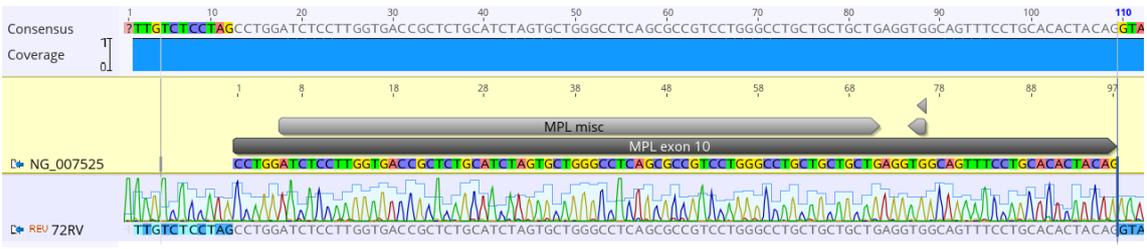
Paciente NMP62



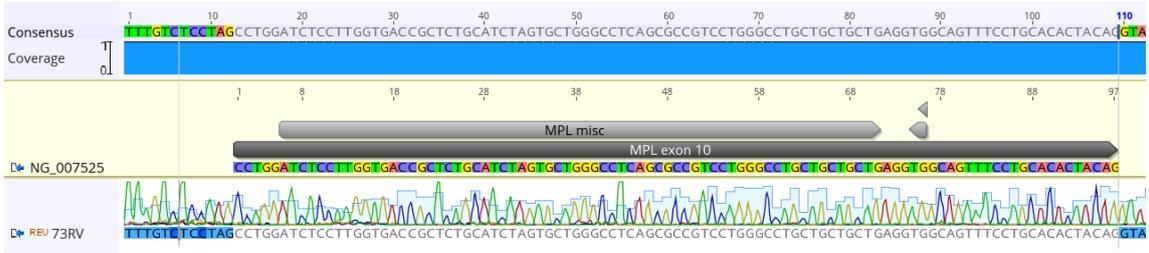
Paciente NMP63



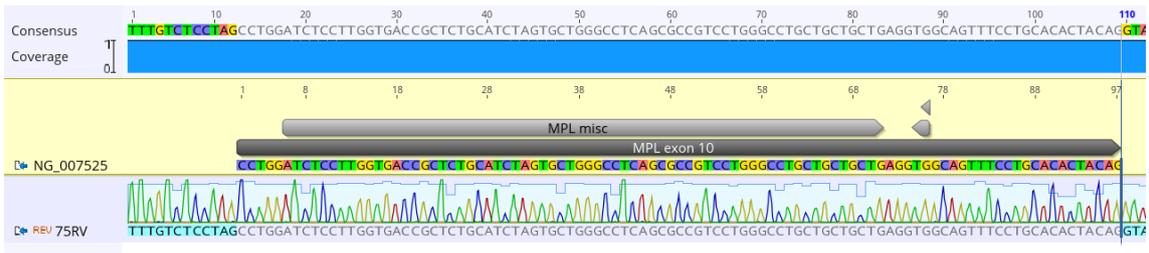
Paciente NMP69



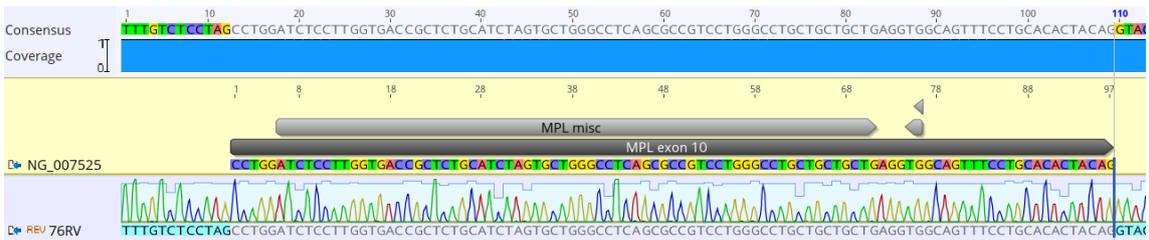
Paciente NMP72



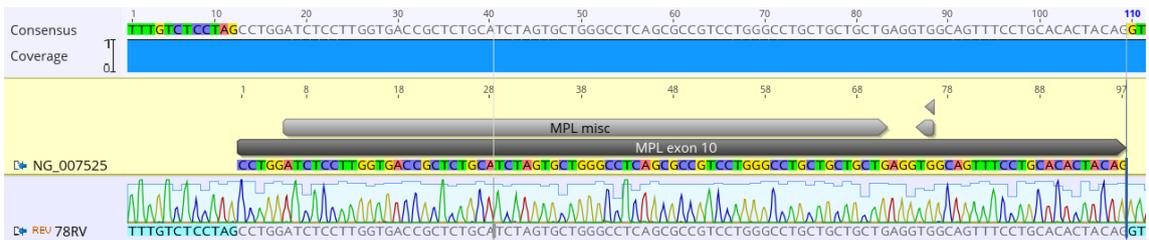
Paciente NMP73



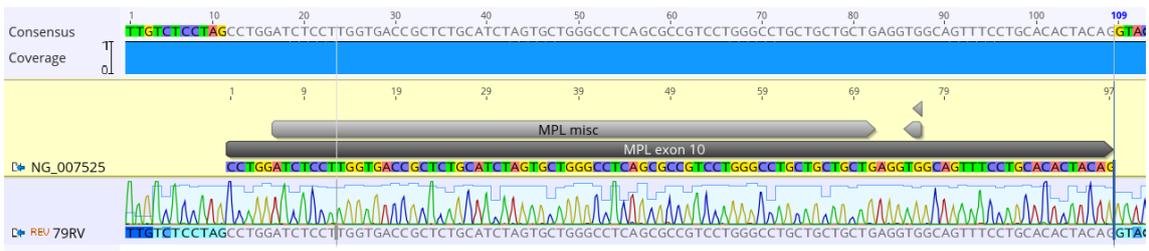
Paciente NMP75



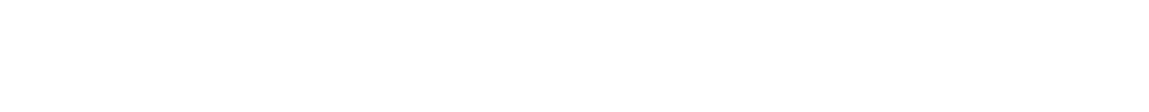
Paciente NMP76



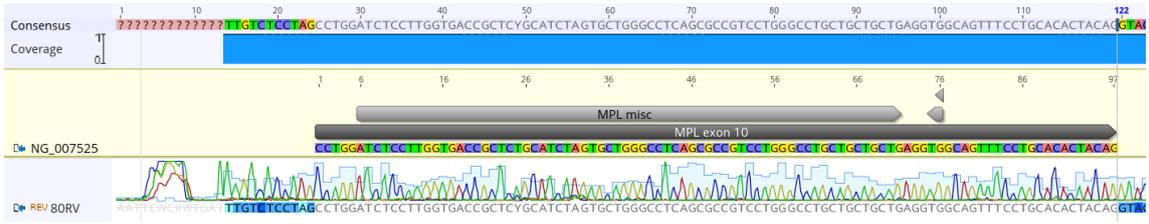
Paciente NMP77



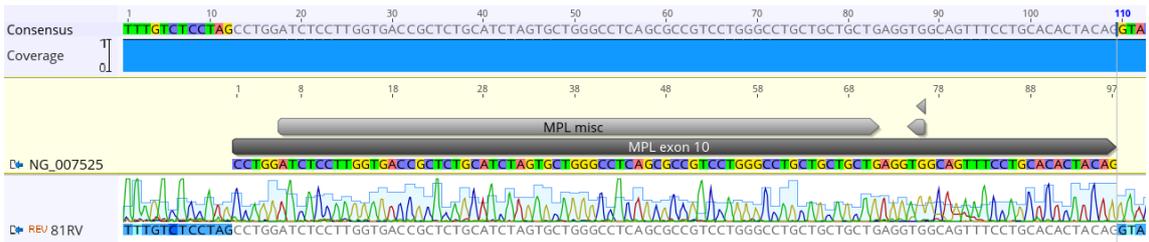
Paciente NMP78



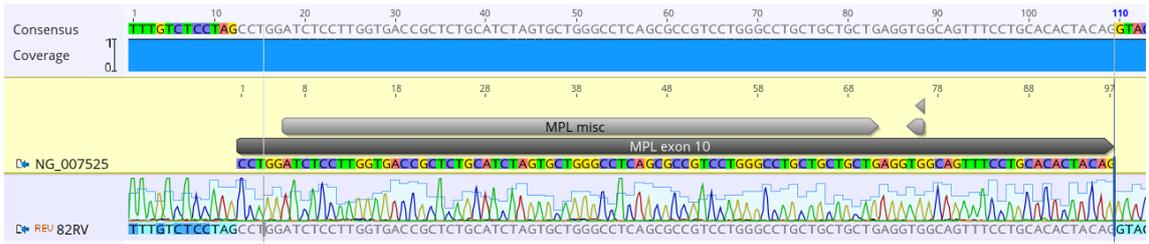
Paciente NMP79



Paciete NMP80



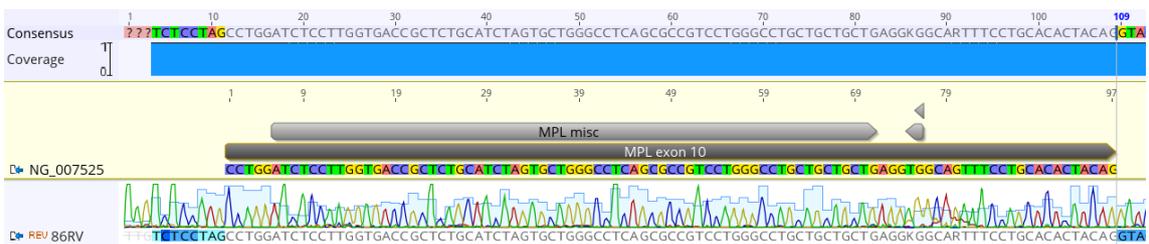
Paciete NMP81



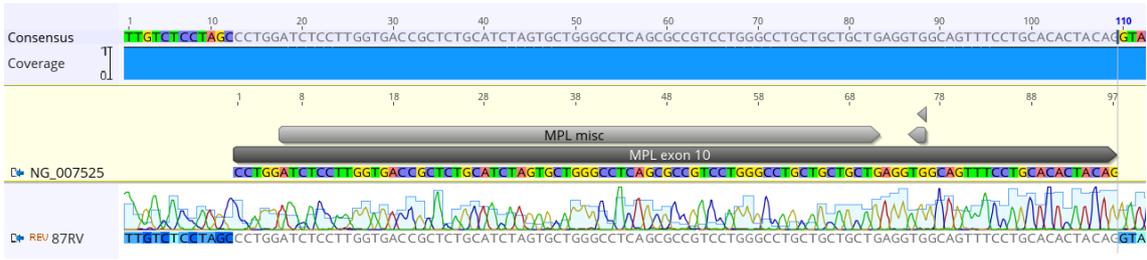
Paciete NMP82



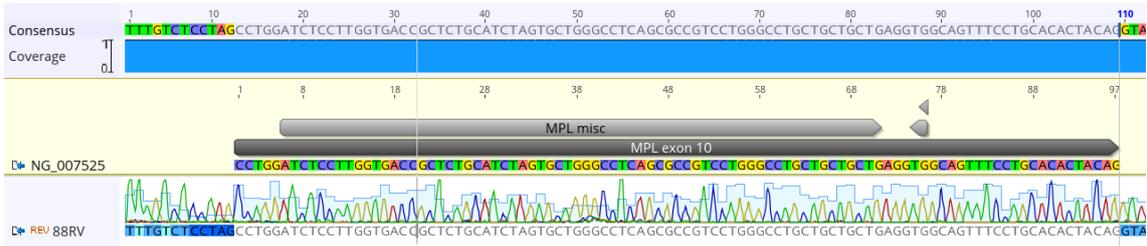
Paciete NMP84



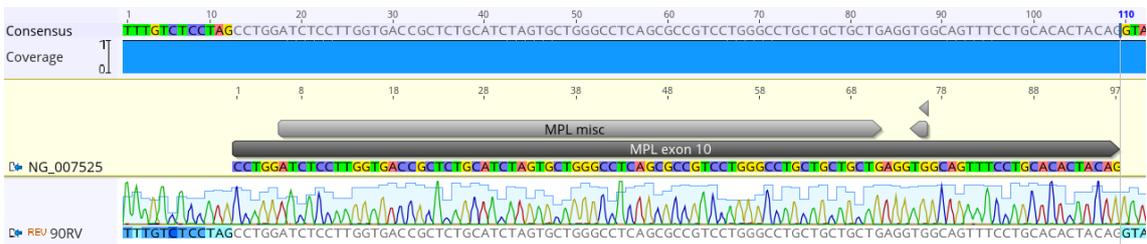
Paciete NMP86



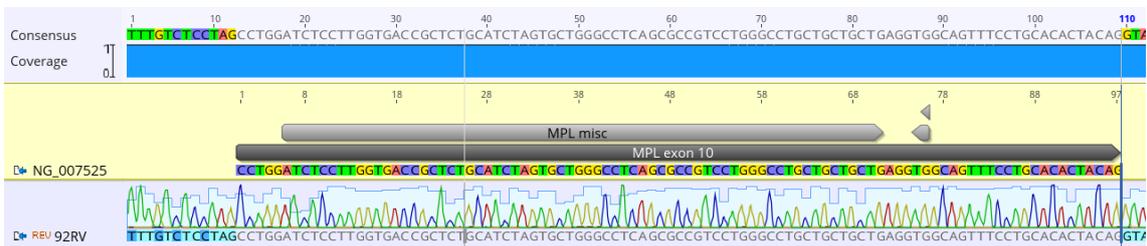
Paciente NMP87



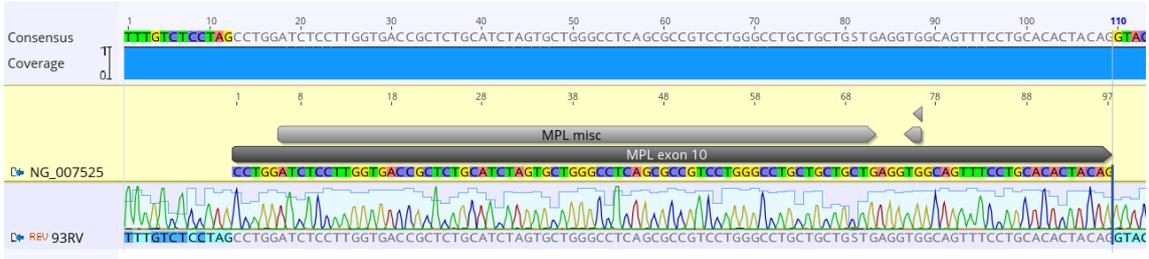
Paciente NMP88



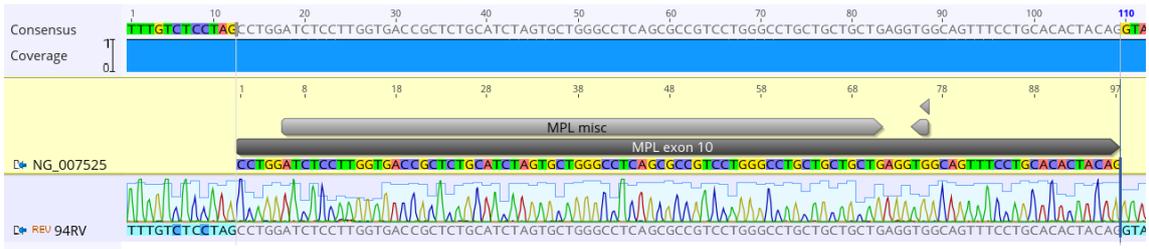
Paciente NMP90



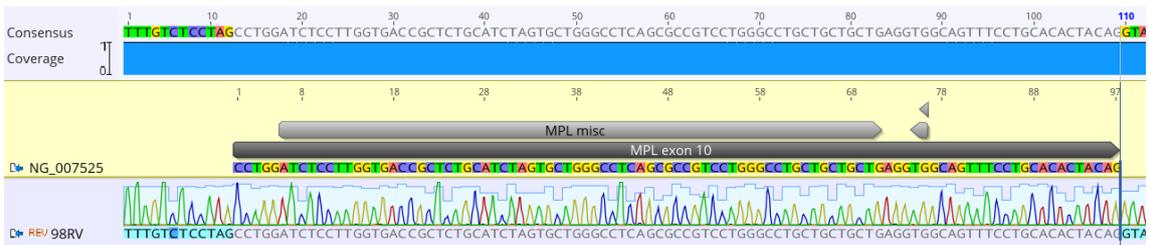
Paciente NMP92



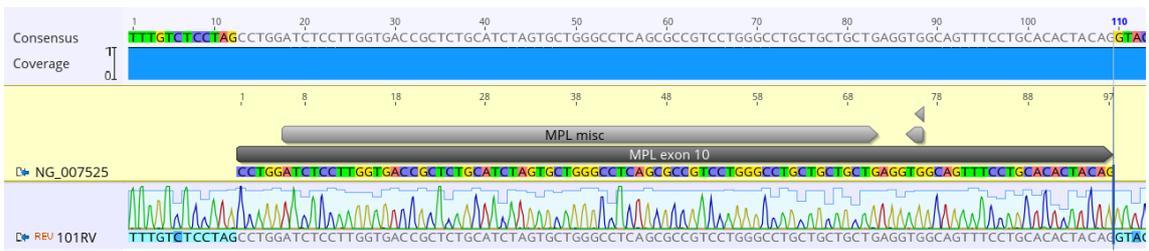
Paciente NMP93



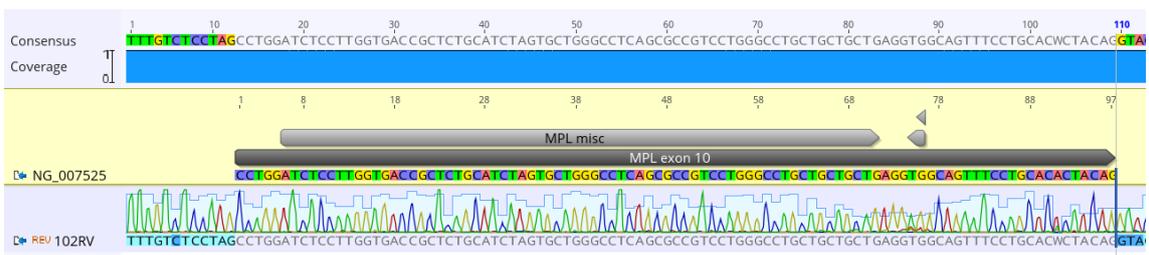
Paciente NMP94



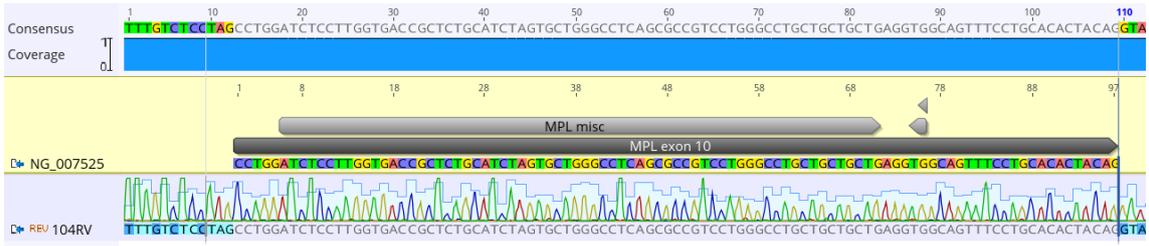
Paciente NMP98



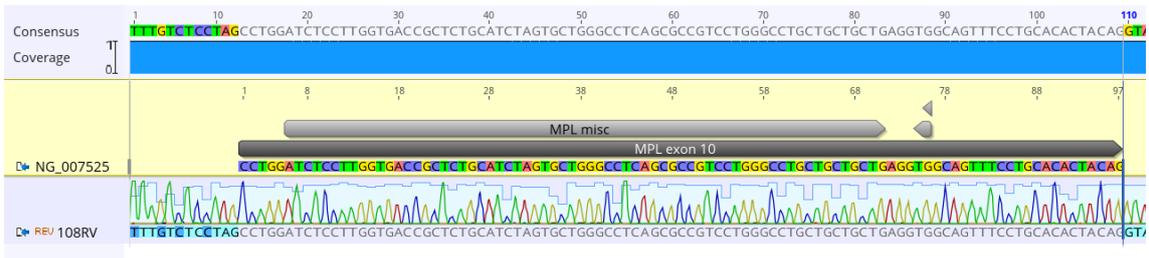
Paciente NMP101



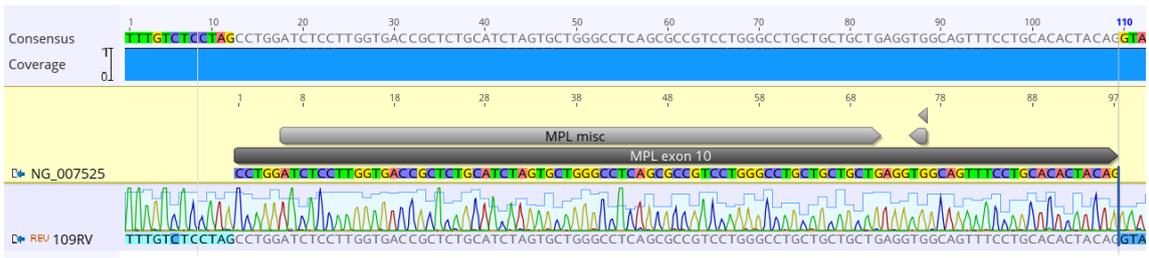
Paciente NMP102



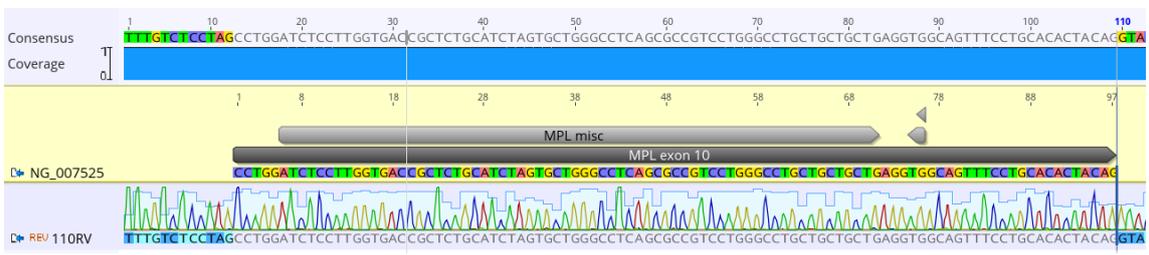
Paciente NMP104



Paciente NMP108



Paciente NMP109



Paciente NMP110

9.9. Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio



