



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Morais Santos

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM HEMATO-
ONCOLOGIA**

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado de
Genética Clínica Laboratorial orientado pela Dr^a Margarida
Coucelo e pela Professora Doutora Isabel Carreira e apresentado à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.**

Junho de 2023

Agradecimentos

A todos que acreditaram e tornaram possível a concretização deste trabalho o meu enorme agradecimento.

À Dr^a Margarida Coucelo, minha orientadora, um agradecimento especial pela excelente orientação durante estes meses e por toda a dedicação, preocupação, incentivo e exigência para que me tornasse numa boa profissional. Agradeço também por todo o conhecimento transmitido, confiança e disponibilidade.

À Professora Doutora Isabel Carreira, minha orientadora, e à Professora Doutora Joana Barbosa de Melo, um agradecimento especial por possibilitarem a realização do estágio na UFHM e por todos os conhecimentos transmitidos durante o primeiro ano do mestrado.

À Dr^a Ana Teresa Simões e à Dr^a Ana Catarina Oliveira, um grande obrigada por todos os ensinamentos, confiança, simpatia e delicadeza, foi um gosto poder trabalhar na mesma equipa.

A toda a equipa da UFHM, agradeço por se mostrarem sempre disponíveis para me ajudar, pela simpatia, convívio e por me acolherem e fazerem sentir parte desta “casa”.

Aos amigos de Coimbra e Viseu, por estarem presentes sempre no momento certo e por todas as boas memórias que levamos juntos.

Ao Pedro, por todo o apoio, amor e por nunca me deixar ir abaixo nos piores momentos.

A toda a família, por todo o carinho e por acreditarem sempre nas minhas competências.

Aos meus pais e irmãos, que nunca desistiram do meu sucesso e me apoiaram incondicionalmente com todo o amor e força que me fazem estar aqui, a realizar uma das etapas mais importantes, que sem eles não seria possível.

Índice

Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas	VI
Lista de Abreviaturas	VII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1. Estágio – Contextualização	1
1.2. Unidade Funcional de Hematologia Molecular (UFHM)	2
1.2.1. Caracterização do Local	2
1.2.2. Procedimento Pré-Analítico	2
2. Hemato-Oncologia.....	4
2.1. Neoplasias Mieloproliferativas	5
2.1.1. Leucemia Mielóide Crónica (LMC).....	5
2.1.2. Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária	8
2.1.2.1. Genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i>	10
2.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA).....	11
3. Metodologias executadas no laboratório de Hemato-Oncologia.....	14
3.1. Extração de ácidos nucleicos: DNA e RNA	14
3.1.1. Extração em Coluna	16
3.1.2. Extração com partículas magnéticas	16
3.2. Quantificação dos ácidos nucleicos	17
3.2.1. Espectrofotometria UV.....	17
3.2.2. Fluorimetria	18
3.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	18
3.3.1. PCR Multiplex	20
3.3.2. PCR <i>Allele Specific</i> (ASO).....	21
3.3.3. PCR Nested	21
3.3.4. Uso de controlos.....	22
3.4. Eletroforese em Gel de Agarose	22
3.5. PCR em Tempo Real.....	23
3.6. HRM (<i>High Resolution Melting</i>)	25
3.7. Análise de Fragmentos.....	26
3.8. MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>).....	26
3.9. Sequenciação de Sanger	28
3.10. NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>)	29

4.	Algoritmos de estudo em Hemato-Oncologia.....	33
4.1.	Neoplasias Mieloproliferativas	33
4.1.1.	Leucemia Mielóide Crónica (LMC).....	33
4.1.2.	Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária	38
4.2.	LMA – Pesquisa de mutações nos genes <i>NPM1</i> e <i>FLT3</i> (ITD e TKD).....	42
4.3.	Aplicações MLPA.....	46
4.4.	Aplicações NGS	47
4.4.1.	Painel de RNA-Seq para genes de fusão (<i>Oncomine Myeloid Research Assay</i>)	49
4.5.	Estudos em linhagem não-hematopoiética/Estudos Familiares	51
5.	Estudo dos Telómeros	58
6.	Competências adquiridas no estágio	61
7.	Participação em reuniões/atividades multidisciplinares	62
	Conclusão.....	63
	Bibliografia.....	64
	Anexos	73
	Anexo I – Certificado de participação nas “Perspetivas em Hematologia”	73
	Anexo II – Certificado de participação no curso teórico-prático de Biologia Molecular	74
	Anexo III – Certificado de participação na 31ª Sabatina de Hematologia	75
	Anexo IV – Resumo submetido para a 31ª Sabatina de Hematologia	76
	Anexo V – Certificado da seleção do resumo para a 31ª Sabatina de Hematologia..	77

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da hematopoiese.

Figura 2 – Formação do oncogene *BCR::ABL1*, originado da translocação t(9;22)(q34;q11).

Figura 3 – Transcritos originados da fusão dos genes *BCR* e *ABL1*: e13a2, e14a2, e1a2.

Figura 4 – Distribuição das mutações no domínio tirosina cinase do gene *ABL1*.

Figura 5 – Via de sinalização JAK-STAT.

Figura 6 – Produto final de um gradiente de densidade.

Figura 7 – Etapas da extração em coluna com membrana de sílica.

Figura 8 – *Workflow* da extração com *beads*.

Figura 9 – Curva característica dos ácidos nucleicos, com absorção máxima aos 260 nm.

Figura 10 – Curva padrão de fluorescência.

Figura 11 – Etapas da PCR.

Figura 12 – Curva característica do PCR em Tempo Real Quantitativo.

Figura 13 – Representação da regressão linear.

Figura 14 – Representação de curvas de *melting*.

Figura 15 – Etapas da Análise de Fragmentos.

Figura 16 – Procedimento do MLPA, dividido em cinco etapas: desnaturação e hibridização, ligação das sondas, amplificação, separação dos fragmentos e análise de resultados.

Figura 17 – *Workflow* da Sequenciação de Sanger.

Figura 18 – *Workflow* do NGS.

Figura 19 – Química de sequenciação nas plataformas *Ion Torrent* e *Illumina*.

Figura 20 – Desenho da reação de PCR multiplex para pesquisa de transcritos *BCR::ABL1*.

Figura 21 – Visualização do PCR multiplex para pesquisa de transcritos *BCR::ABL1*.

Figura 22 – Representação dos *primers* e sonda para a reação de PCR em Tempo Real Quantitativo do *BCR::ABL1*.

Figura 23 – Exemplo do desenho da placa para a monitorização do transcrito p210.

Figura 24 – Representação da localização dos *primers* utilizados no PCR Nested.

Figura 25 – Eletroferogramas da Sequenciação de Sanger para pesquisa de mutações *BCR::ABL1* KD.

Figura 26 – Atividade dos inibidores TKI contra mutações *BCR::ABL1* KD.

Figura 27 – Resultados do ASO-PCR para a mutação *BCR::ABL1* T315I.

Figura 28 – Algoritmo de estudo das neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas.

Figura 29 – Desenho da reação ASO-PCR multiplex para a mutação *JAK2* V617F.

Figura 30 – ASO-PCR multiplex para pesquisa da mutação *JAK2* V617F.

Figura 31 – Exemplo do desenho da placa para a quantificação da mutação *JAK2* V617F.

Figura 32 – Exemplos de mutações no *JAK2* (Exão 12), *CALR* (Exão 9) e *MPL* (Exão 10).

Figura 33 – Tipo de mutações no gene *CALR*.

Figura 34 – Exemplos de mutações *CALR* Tipo 1 e Tipo 2.

Figura 35 – Exemplos de inserções identificadas no gene *NPM1*.

Figura 36 – Resultados da análise de fragmentos para pesquisa de mutações no gene *NPM1* (A) e *FLT3*-ITD (B) nos casos 3 e 4, em conjunto com dois controlos (CPos – controlo positivo; CNeg – controlo negativo).

Figura 37 – Eletroferograma da Sequenciação de Sanger do caso 3.

Figura 38 – Resultados do *screening* de mutações no domínio tirosina cinase do gene *FLT3*.

Figura 39 – Eletroferograma da Sequenciação de Sanger do caso 4.

Figura 40 – Exemplo da representação dos resultados do MLPA para o *SALSA MLPA Probemix P437 Familiar MDS-AML* no *Coffalyser*.

Figura 41 – Genes-*driver* de fusão do painel NGS de RNA.

Figura 42 – Representação do alinhamento do gene de fusão *BCR::ABL1* no IGV do *software IonReporter*.

Figura 43 – Representação do alinhamento do gene de fusão *ETV6::MECOM* no IGV do *software IonReporter*.

Figura 44 – *Primers* para a pesquisa da variante *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln.

Figura 45 – Eletroferogramas da amostra de *swab* para pesquisa das variantes *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg (A) e *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln (B).

Figura 46 – *Primers* selecionados para o estudo familiar.

Figura 47 – Eletroferogramas das amostras dos pais.

Figura 48 – Heredograma do estudo familiar descrito.

Figura 49 – Representação dos resultados obtidos para a avaliação do comprimento dos telómeros.

Índice de Tabelas

Tabela I – Recomendações da ELN 2020 e níveis de resposta molecular na Escala Internacional (IS).

Tabela II – Caracterização das neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph-negativas (PV, TE, MF).

Tabela III – Classificação genética da LMA.

Tabela IV – Estratificação de risco molecular da LMA.

Tabela V – Componentes essenciais à técnica de PCR.

Tabela VI – Exemplos da monitorização da doença residual mínima na LMC.

Tabela VII – Constituintes das reações.

Tabela VIII – Genes dos painéis customizados de Hemato-Oncologia.

Tabela IX – Representação das translocações conhecidas vs. Painel RNA *Oncomine Myeloid Research Assay*.

Lista de Abreviaturas

A – Adenina

ACA – *Additional chromosome abnormalities*

ACMG – *American College of Medical Genetics*

AHTLQ – *Absolute Human Telomere Length Quantification*

ASO-PCR – *PCR Allele Specific*

C – Citosina

cDNA – DNA complementar

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CNVs – *Copy number variations*

C_t – *Cycle Threshold*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

dATP – Desoxirribonucleotídeo adenina

dCTP – Desoxirribonucleotídeo citosina

ddNTP – Didesoxirribonucleotídeo trifosfato

dGTP – Desoxirribonucleotídeo guanina

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato

dTTP – Desoxirribonucleotídeo timina

DRM – Doença residual mínima

EAC – *Europe Against Cancer*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético

ELN – *European Leukemia Net*

ELTS – *EUTOS long term survival score*

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*

G – Guanina

GTC – *Guanidium Thiocyanate*

H – Hidrogénio

H₂O – Água

HRM – *High Resolution Melting*

IGHV – *Immunoglobulin heavy chain variable region genes*

IS – *International scale*

ISO – *International Organization for Standardization*

ITD – *Internal Tandem Duplication*

JAK – *Janus Kinase*

JH1 – *Janus Homology 1*

JH2 – *Janus Homology 2*

kb – Quilobase

KCl – Cloreto de potássio

KD – *Kinase domain*

kDa – Quilodalton

KDEL – *Golgi-to-ER retention signaling motif*

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LLC – Leucemia Linfoblástica Crónica

LMA/AML – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

Mb – Megabase

M-BCR – *Major breakpoint cluster region*

m-BCR – *Minor breakpoint cluster region*

MF – Mielofibrose Primária

Mg²⁺ – Ião Magnésio
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
mRNA – RNA mensageiro
mut – Mutado
N° – Número
NC – Número único de laboratório
(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amônio
NGS – *Next Generation Sequencing*
nm – Nanômetro
p190 – Peso molecular 190 quilodaltons
p210 – Peso molecular 210 quilodaltons
p230 – Peso molecular 230 quilodaltons
pb – Par de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
Ph – Cromossoma Filadélfia
PV – Policitemia Vera
RBCL – *Red Blood Cell Lysis Buffer*
RFU – Unidades relativas de fluorescência
RLT – *RNA lysis buffer*
RM – Resposta molecular
RMM – Resposta molecular *major*
RNA – *Ribonucleic acid*
RT-PCR – *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*
SCR – *Single copy reference*
SMD – Síndromes Mielodisplásicas
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
T – Timina
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TBE – Tris-Borato-EDTA
TE – Trombocitemia Essencial
TKD – *Tyrosine kinase domain*
TKI – Inibidores de tirosina cinase
T_m – Temperatura de *melting*
Tris-Cl – Tris-cloridrato
UFHM – Unidade Funcional de Hematologia Molecular
UV – Ultravioleta
VAF – *Variant Allele Frequency*
WES – *Whole Exome Sequencing*
WGS – *Whole Genome Sequencing*
WHO – *World Health Organization*
wt – *Wild-type*
μ-BCR – *Micro breakpoint cluster region*

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas no estágio curricular durante o segundo ano do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu entre setembro de 2022 e maio de 2023 e teve lugar na Unidade Funcional de Hematologia Molecular – Sector de Hemato-Oncologia, localizado no Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Os oito meses de estágio curricular foram essencialmente dedicados ao acompanhamento da rotina do Sector de Hemato-Oncologia, que tem como foco principal o diagnóstico de neoplasias hematológicas, essencial para a classificação, estratificação de risco, decisão e monitorização terapêutica. Durante o período de estágio curricular, tive a possibilidade de acompanhar e executar diferentes técnicas de biologia molecular, bem como participar na discussão de resultados, tendo sempre em vista a importância da interação clínico-laboratorial. Tive contacto com diferentes tipos de amostras (sangue periférico, medula óssea, raiz de cabelo e esfregaço da mucosa bucal (*swab*)); técnicas (das quais: extração de ácidos nucleicos e quantificação dos mesmos, diferentes tipos de PCRs e eletroforese, análise de fragmentos, *High Resolution Melting*, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, Sequenciação de Sanger e *Next Generation Sequencing*); e estratégias de diagnóstico, como por exemplo algoritmos de estudo.

Devido à diversidade das neoplasias hematológicas, o estágio curricular foi, maioritariamente, dedicado aos algoritmos de estudo no diagnóstico genético de neoplasias mieloproliferativas crónicas e leucemia mielóide aguda.

Neste relatório é feita uma breve apresentação do laboratório onde decorreu o estágio curricular, assim como das metodologias utilizadas em Hemato-Oncologia e aplicações destas a partir da descrição de casos práticos de acordo com os algoritmos de estudo.

Palavras-chave: laboratório, hemato-oncologia, neoplasias hematológicas, diagnóstico molecular, algoritmos de estudo

Abstract

The report presented here has the main purpose to describe the activities developed in the curricular internship during the second year of the Master's Degree in Clinical Genetics Laboratory at the Faculty of Medicine of the University of Coimbra. The internship took place between September 2022 and May 2023 in the Functional Unit of Molecular Hematology – Hemato-Oncology Sector, located at the Pediatric Hospital of the Coimbra Hospital and University Center.

The eight months of the curricular internship were essentially dedicated to the follow up of the routine of the Hemato-Oncology Sector, whose main focus is the diagnosis of hematological neoplasms, which is essential for classification, risk stratification, decision, and therapeutic monitoring. During the internship period, I was able to not only follow and perform different molecular biology techniques, as well as to participate in the discussion of results, always bearing in mind the constant need to perceive the high importance of clinical-laboratory interaction. I was also able to interact with different types of samples (peripheral blood, bone marrow, hair roots and swabs); techniques (including nucleic acid extraction and quantification, different types of PCR and electrophoresis, fragment analysis, High Resolution Melting, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Sanger sequencing and Next Generation Sequencing); and diagnostic strategies, for instance study algorithms.

Attributable to the diversity of hematological neoplasms, this curricular internship was foremost dedicated to the studying of algorithms in the genetic diagnosis of chronic myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia.

This report gives a brief presentation of the laboratory where the internship was conducted, as well as the methodologies utilized in Hemato-Oncology and their applications, based on the description of practical cases according to the study algorithms.

Keywords: laboratory, hemato-oncology, hematologic neoplasms, molecular diagnosis, study algorithms

1. Introdução

1.1. Estágio – Contextualização

A possibilidade de realizar um estágio curricular durante o segundo ano do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial proporciona a aquisição de competências e conhecimentos em laboratórios inseridos nesta área, onde o seu ambiente torna a parte prática numa ação real. Isto é conseguido pela possibilidade de integrar uma equipa multidisciplinar e interagir com a sua rotina diária. Além de preparar para uma vida profissional, é a oportunidade ideal de consolidar os conhecimentos adquiridos durante o primeiro ano letivo e inserir uma parte mais prática dos mesmos. É, também, um período onde o rigor, a responsabilidade e autonomia são cada vez mais importantes e essenciais para o começo de uma vida no mundo do trabalho, pelo que uma boa formação é a chave para adquirir tais competências.

A Unidade Funcional de Hematologia Molecular foi o local onde, durante 8 meses, foi realizado o estágio curricular. Foi possível acompanhar a rotina do Sector de Hemato-Oncologia, que se foca no diagnóstico de neoplasias hematológicas essencial para a classificação, estratificação de risco, decisão e monitorização terapêutica. Durante estes meses, o contacto com diferentes produtos biológicos e técnicas ou estratégias de diagnóstico ocorreu diariamente, além da integração na discussão de resultados, juntamente com a classificação, numa perspectiva clínico-laboratorial, das neoplasias hematológicas. Foi, também, um período onde tive a oportunidade de acompanhar a implementação de novas metodologias de suporte ao diagnóstico. De uma forma geral, os objetivos definidos para este estágio curricular foram:

- Conhecer e saber adequar técnicas de extração de DNA/RNA
- Executar e interpretar técnicas de PCR, Sequenciação de Sanger, MLPA, PCR em Tempo Real e *Next Generation Sequencing* (NGS)
- Interpretar e classificar variantes genéticas e discutir os resultados obtidos no contexto clínico-laboratorial
- Colaborar na implementação de novas metodologias

O acompanhamento das etapas laboratoriais, desde a fase pré-analítica à fase pós-analítica, foi fundamental para atingir tais objetivos.

1.2. Unidade Funcional de Hematologia Molecular (UFHM)

1.2.1. Caracterização do Local

A Unidade Funcional de Hematologia Molecular (UFHM) está inserida no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e o laboratório situa-se no Hospital Pediátrico do CHUC.

A UFHM está dividida em 3 setores clínico-laboratoriais: Eritropatologia e Metabolismo do Ferro, Hemostase e Microangiopatias e Hemato-Oncologia. É uma equipa multidisciplinar, com um total de 7 técnicos superiores de saúde e 3 técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica. A UFHM realiza estudos genéticos em todas as faixas etárias para o CHUC e outros hospitais.

O Laboratório está equipado com as mais recentes tecnologias, desde equipamentos automatizados para extração de ácidos nucleicos, câmaras de fluxo laminar e vários tipos de termocicladores, Eletroforese capilar/Sequenciação de Sanger e *Next Generation Sequencing* (NGS). Existe, para além do que já foi referido, uma grande variedade de reagentes e materiais para que a realização das técnicas seja feita com o maior sucesso.

As metodologias de extração de DNA, Sequenciação de Sanger e NGS são comuns às três equipas, existindo uma escala rotativa semanal.

É um laboratório certificado pela ISO 9001:2015 e informatizado (Clinidata XXI). Os diversos aparelhos e metodologias estão sujeitos a controlos de qualidade internos e externos e todos os estudos realizados têm um prazo de comprometimento.

1.2.2. Procedimento Pré-Analítico

O processo de cada doente começa com a chegada dos tubos de colheita e o seu registo na plataforma (Clinidata XXI). Os pedidos de estudos genéticos solicitados dentro do CHUC são acessíveis desde a sua colheita e os tubos triados à chegada ao laboratório.

Os pedidos externos ao CHUC são introduzidos no sistema pelas assistentes técnicas de acordo com o solicitado pelo médico.

Todas as amostras passam por uma triagem, onde lhes é atribuída uma etiqueta para que, durante a realização dos testes moleculares, estas passem a ser identificadas pelo número único de laboratório (NC), nome e número do processo. No caso de amostras de RNA, estas são acompanhadas de um número interno sequencial de RNA/DNA complementar (cDNA).

As amostras que dão entrada no laboratório são, maioritariamente, tubos de colheita de sangue periférico ou medula óssea em EDTA-K3. Contudo, são, por vezes, enviadas amostras de outros tecidos, como o cabelo, gânglios ou humor vítreo.

2. Hemato-Oncologia

As neoplasias hematológicas compreendem um vasto número de doenças malignas que podem ter origem nas diferentes linhagens hematopoiéticas (Figura 1) e manifestação aguda ou crônica [1]. A forma aguda caracteriza-se por uma rápida progressão e aparecimento de células hematopoiéticas imaturas por perda de capacidade de diferenciação e ganho na vantagem de auto-renovação/proliferação. Em relação à forma crônica, as células que se acumulam são diferenciadas terminalmente e têm uma progressão mais lenta [1].

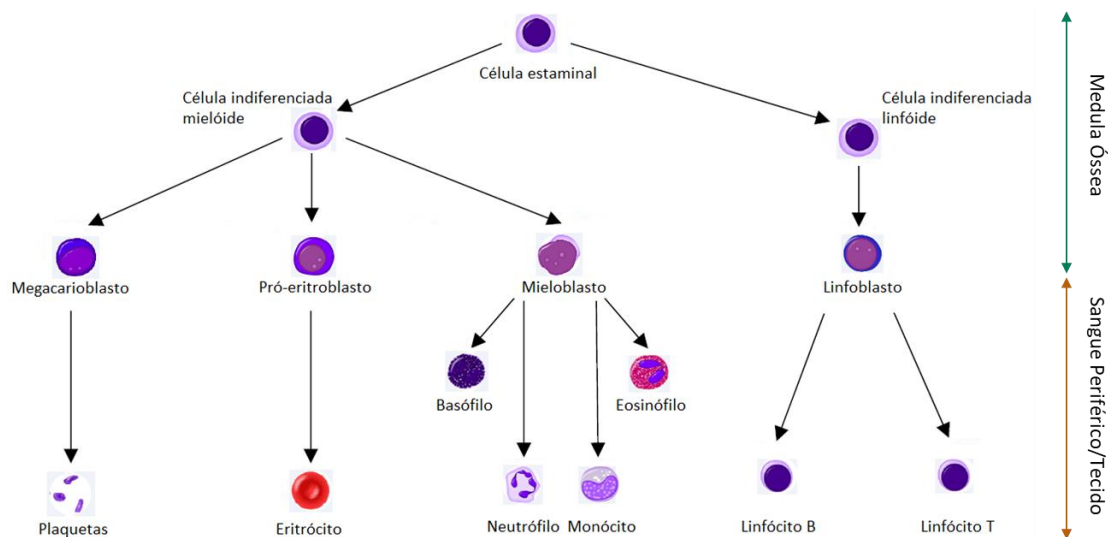


Figura 1 – Esquema representativo da hematopoiese. Adaptado de [2].

A Classificação da Organização Mundial de Saúde para Tumores Hematopoiéticos foi recentemente revista em 2022 (WHO 2022) [3] e, em linha com as anteriores (2016 e 2008), tem como base uma classificação genética destas entidades. Contudo, para o seu reconhecimento é também essencial a análise morfológica do sangue periférico e/ou medula óssea, imunofenótipo e análise histológica. No conjunto, todos estes achados permitem o diagnóstico, classificação, estratificação de risco, adequação terapêutica e monitorização da doença (doença residual mínima, DRM) [4].

Atualmente, as técnicas de biologia molecular e a sua aplicação são indispensáveis para o estudo das neoplasias hematológicas [5].

A atividade do Laboratório de Hemato-Oncologia da UFHM é maioritariamente dedicada ao estudo de neoplasias mielóides crónicas (LMC) e síndromes mielodisplásicas (SMD), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), síndromes de falência medular congénitos/síndromes de predisposição. São estudadas amostras de sangue periférico, medula óssea, gânglios e outros líquidos biológicos onde são efetuados os estudo genéticos. Por vezes, é necessário o estudo genético em células de linha não-hematopoiética, sendo utilizado, preferencialmente, cabelo ou esfregaço bucal (*swab*).

Dada o vasto número de neoplasias hematológicas estudadas, o estágio foi maioritariamente dedicado aos algoritmos de diagnóstico genético de neoplasias mieloproliferativas crónicas e leucemia mielóide aguda.

2.1. Neoplasias Mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas são neoplasias hematopoiéticas clonais com origem nas células precursoras hematopoiéticas, que se distinguem pela proliferação excessiva de uma ou mais linhagens mielóides. Estas neoplasias caracterizam-se por alterações genéticas adquiridas (somáticas), que promovem a ativação constitutiva das vias de transdução de sinal da hematopoiese, resultando numa proliferação anormal e acumulação de células maduras de uma ou mais linhagens hematopoiéticas. Estas doenças são mais frequentes em idade adulta [6], [7].

As neoplasias mieloproliferativas são divididas em dois grupos: as *BCR::ABL1* positivo – Leucemia Mielóide Crónica (LMC), e *BCR::ABL1* negativo, onde se enquadram a Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MF) [7].

2.1.1. Leucemia Mielóide Crónica (LMC)

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) foi a primeira neoplasia mieloproliferativa a ser associada a uma alteração genética, havendo, atualmente, um conhecimento muito vasto a nível molecular sobre a doença e seus tratamentos [8].

A LMC é caracterizada pela presença da translocação $t(9;22)(q34;q11)$, que origina o oncogene *BCR::ABL1* pela fusão do protooncogene da tirosina cinase (*ABL1*), no cromossoma 9, com o gene *BCR* no cromossoma 22, denominado cromossoma

Filadélfia (Ph) [8] (Figura 2). O resultado desta fusão é a formação de uma oncoproteína que, ao estar constantemente ativa, altera a atividade da tirosina cinase, levando à desregulação da proliferação da linhagem mielóide [9], [10].

Atualmente, a LMC é uma leucemia tratável com fármacos inibidores de tirosina cinase (TKIs). Existem vários inibidores aprovados para o tratamento da LMC: inibidores de 1ª geração (Imatinib), inibidores de 2ª geração (Dasatinib, Nilotinib e Bosutinib) e inibidores de 3ª geração (Ponatinib) [11].

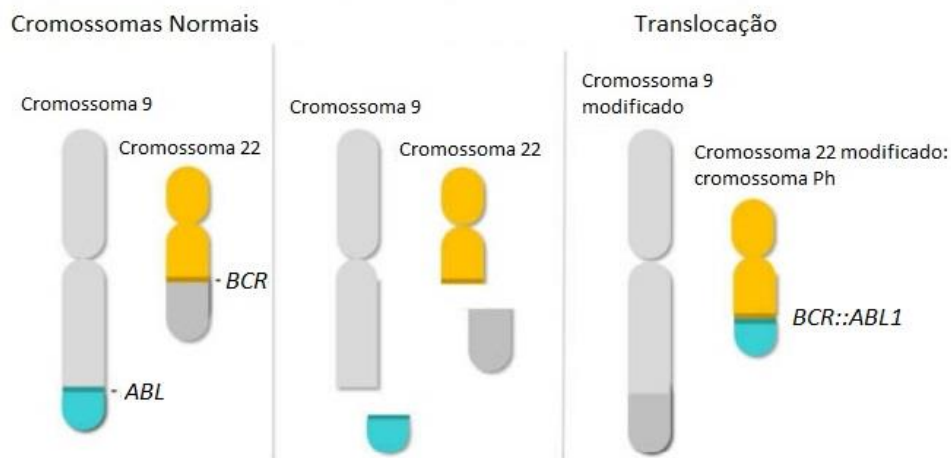


Figura 2 – Formação do oncogene *BCR::ABL1*, originado da translocação $t(9;22)(q34;q11)$. Adaptado de [12].

O gene *BCR* possui vários pontos de quebra, sendo os mais comuns: M-*BCR* (*Major breakpoint cluster region*), m-*BCR* (*Minor breakpoint cluster region*) e μ -*BCR* (*Micro breakpoint cluster region*) (Figura 3) [8], [9]. No gene *ABL1*, o local de quebra frequentemente envolvido na translocação ocorre no exão 2.

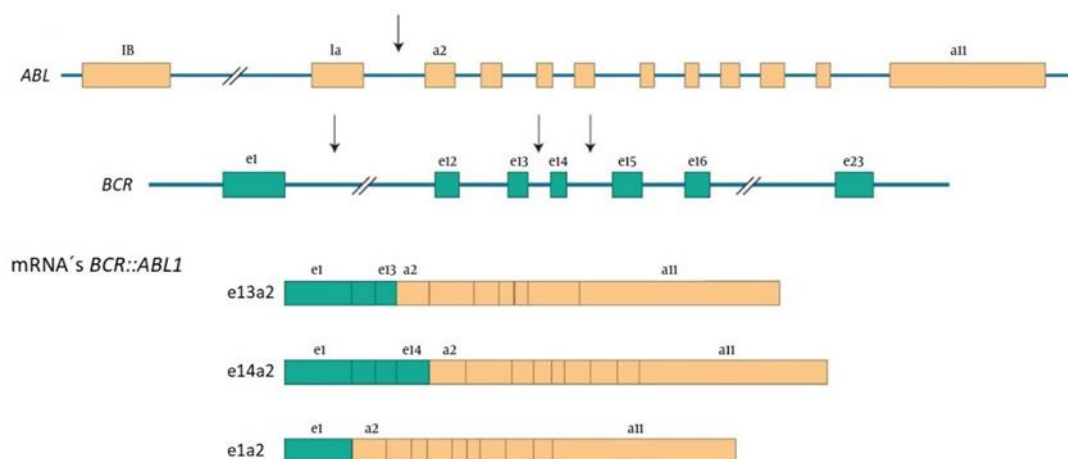


Figura 3 – Transcritos originados da fusão dos genes *BCR* e *ABL1*: e13a2, e14a2, e1a2. Adaptado de [13].

M-BCR é o ponto de quebra mais comum que se localiza entre o exão 12 e 16, sendo mais frequente a quebra nos exões 13 e 14, originando os transcritos e13a2 e e14a2, respetivamente. Estes codificam uma proteína de 210 kDa (p210) [8], [14]. O ponto de quebra *minor* do BCR (m-BCR) ocorre entre os exões 1 e 2, resultando no transcrito e1a2 e na proteína p190 (190 kDa). O μ -BCR é o menos frequente, ocorre entre os exões 19 e 20 com a formação da proteína p230 (230 kDa) e do transcrito e19a2 [9].

Ao diagnóstico é essencial identificar o transcrito do gene *BCR::ABL1*, uma vez que a avaliação da eficácia do tratamento com inibidores de tirosina cinase (TKIs) é realizada por monitorização de resposta a nível molecular por PCR em Tempo Real Quantitativo (*gold-standard*). Esta avaliação tem um papel importante no seguimento dos doentes com LMC, sendo realizada de 3 em 3 meses até atingimento de resposta molecular *major* (RMM, RM^{3.0}) e, posteriormente, de 6 em 6 meses de acordo com as recomendações estabelecidas pela *European Leukemia Net* (ELN) de 2020 [11], tal como representado na Tabela I. Deve ser tido em conta o transcrito associado à LMC em cada doente e a resposta molecular tem de ser reportada à Escala Internacional (IS) no caso dos transcritos da p210 [10].

Tabela I – Recomendações da ELN 2020 e níveis de resposta molecular na Escala Internacional (IS).

	ÓTIMO	ALERTA	FALHA
<i>Time-points</i>	Não aplicável	Alto risco de ACA e ELTS	Não aplicável
3 meses	≤ 10%	> 10%	> 10% se confirmado dentro de 1-3 meses
6 meses	≤ 1%	> 1-10%	> 10%
12 meses	≤ 0.1%	> 0.1-1%	> 1%
> 12 meses	≤ 0.1%	> 0.1-1%, perda de resposta ≤ 0.1%	> 1%, mutações de resistência, alto risco de ACA

RM^{3.0}: *BCR::ABL1*^{IS} ≤ 0,1%

RM^{4.0}: *BCR::ABL1*^{IS} ≤ 0,01% ou indetetável com 10000-31999 cópias *ABL1*

RM^{4.5}: *BCR::ABL1*^{IS} ≤ 0,0032% ou indetetável com >32000-99999 cópias *ABL1*

RM^{5.0}: *BCR::ABL1*^{IS} ≤ 0,001% ou indetetável com >100000 cópias *ABL1*

ACA – *Additional chromosome abnormalities*; **ELTS** – *EUTOS long term survival score*; **IS** – *International scale*; **RM** – Resposta molecular

Quando, nos *time-points* preconizados para avaliação de resposta, não é atingida uma resposta ótima, poderá estar subjacente um mecanismo de resistência ao tratamento dependente ou independente do *BCR::ABL1* [8], [10], sendo os mais comuns a aquisição de mutações no domínio tirosina cinase do *ABL1* e a adesão à terapêutica, respetivamente.

Estão descritas inúmeras mutações pontuais identificadas no domínio tirosina cinase do *ABL1* do gene de fusão (*BCR::ABL1* KD) (Figura 4), que conferem diferentes graus de resistência aos TKIs, pelo que a escolha de um novo inibidor depende do local e tipo de variante presente [15].

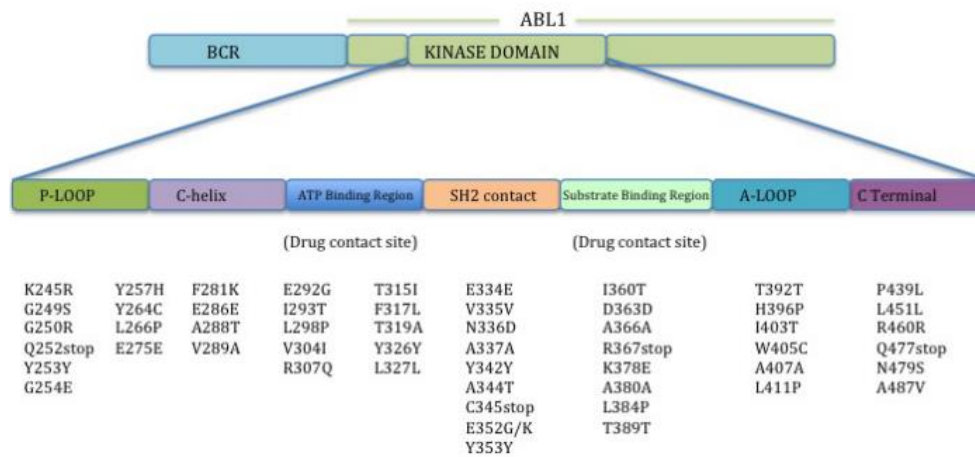


Figura 4 – Distribuição das mutações no domínio tirosina cinase do gene *ABL1*. Retirado de [16].

2.1.2. Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária

A Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e a Mielofibrose Primária (MF) são neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativas caracterizadas pela ativação constitutiva da via de sinalização JAK-STAT, que promove a expansão clonal/proliferação descontrolada de células maduras de uma ou mais linhagens mielóides no sangue periférico [6], [17]. Estas patologias partilham características genéticas comuns e todas apresentam risco de progressão para leucemia aguda, em particular a MF. Atualmente, estão identificados três genes *driver* (*JAK2*, *CALR* e *MPL*) que são capazes de iniciar este processo após mutação somática, e que constituem critérios de diagnóstico *major* destas patologias [6]. Na Tabela II está representada uma visão geral dos 3 tipos de neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativas.

Tabela II – Caracterização das neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativas (PV, TE, MF).

	Manifestações clínicas e morfológicas	Genes <i>driver</i>	Relação genótipo-fenótipo
Policitemia Vera	<ul style="list-style-type: none"> Eritrocitose combinada com trombocitose e/ou leucocitose Associada a supressão da produção de eritropoietina 	<ul style="list-style-type: none"> <i>JAK2</i> (V617F) em 96% dos doentes <i>JAK2</i> (Exão 12) em 4% dos doentes 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento do risco de trombose Progressão para MF
Trombocitemia Essencial	<ul style="list-style-type: none"> Trombocitose Medula óssea com proliferação de megacariócitos 	<ul style="list-style-type: none"> <i>JAK2</i> (V617F) em 60-65% dos doentes <i>CALR</i> (Exão 9) em 25-30% dos doentes <i>MPL</i> (Exão 10) em 4-5% dos doentes Cerca de 10% são triplo negativos 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento do risco de trombose e hemorragia Progressão para PV ou MF
Mielofibrose Primária	<ul style="list-style-type: none"> Proliferação de granulócitos e megacariócitos na medula óssea Vários graus de fibrose na medula óssea Esplenomegalia 	<ul style="list-style-type: none"> <i>JAK2</i> (V617F) em 60-65% dos doentes <i>CALR</i> (Exão 9) em 20-25% dos doentes <i>MPL</i> (Exão 10) em 4-5% dos doentes Entre 5-10% são triplo negativos 	<ul style="list-style-type: none"> Pior prognóstico (varia conforme a mutação presente) Risco de progressão para LMA

MF – Mielofibrose Primária; **PV** – Policitemia Vera; **LMA** – Leucemia Mielóide Aguda

A Policitemia Vera caracteriza-se por uma pan-mielose, isto é, o aumento dos níveis de eritrócitos, leucócitos e plaquetas com uma produção excessiva de eritrócitos que ocorre independentemente dos mecanismos que normalmente regulam a eritropoiese. A detecção da mutação *JAK2* V617F (c.1849G>T, p.Val617Phe) ou no exão 12 do *JAK2* são critérios *major* ao diagnóstico de uma PV [6], [7].

Na Trombocitemia Essencial está envolvida a linhagem megacariocítica, ocorrendo, no sangue periférico, um aumento do número de plaquetas acima do valor de referência. Na medula óssea, os megacariócitos apresentam um número mais elevado que o normal. A mutação *JAK2* V617F, mutações no *CALR* ou *MPL* são critérios *major* de diagnóstico, sendo necessário excluir a presença de *BCR::ABL1* [7].

A Mielofibrose Primária é a neoplasia mielóide crônica Ph-negativa mais agressiva, caracterizada por uma proliferação de megacariócitos e granulócitos anormais na medula óssea, deposição de tecido conjuntivo fibroso e hematopoiese extramedular [7]. Mutações no *JAK2* (*JAK2* V617F), *CALR* ou *MPL* são critérios *major* ao diagnóstico, sendo necessário excluir a presença de *BCR::ABL1*. Cerca de 80% dos doentes com MF apresentam alterações genéticas adicionais, sendo que mutações nos genes *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1* e *TP53* são consideradas de alto risco molecular [7]. Atualmente as alterações genéticas estão incorporadas em *scores*

moleculares que predizem a sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global. Atualmente, o único tratamento curativo na MF é o transplante alogénico.

Nas neoplasias mieloproliferativas crônicas Ph-negativas, a estratégia de tratamento passa pela citoredução com Hidroxiureia ou na redução da superativação da via JAK-STAT com o uso de inibidores de *JAK2*, que visam atenuar os sintomas constitucionais, maioritariamente na Mielofibrose Primária [17].

2.1.2.1. Genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*

O gene *JAK2* pertence à família janus cinases e é um dos sinalizadores intermediários da hematopoiese. Este associa-se ao domínio citoplasmático de recetores não-cinase (recetores de eritropoietina e trombopoietina), direcionando as células para a produção da proteína *JAK2* [17], constituída por dois domínios (JH1 e JH2), em que JH1 tem atividade cinase e o JH2 inibe a atividade do JH1 [6], [17]. A mutação *JAK2* V617F ocorre no domínio JH2 do gene *JAK2*, impedindo a função inibitória, levando a um ganho de função por parte do domínio JH2 e ativando constitutivamente a via JAK-STAT (Figura 5). As células hematopoiéticas ficam mais sensíveis a fatores de crescimento (eritropoietina e trombopoietina), o que desregula a hematopoiese e provoca a produção descontrolada das células sanguíneas [6], [18].

O gene *CALR* codifica a proteína calreticulina, responsável pela homeostase do cálcio no retículo endoplasmático, e tem funções de apoptose, fagocitose e proliferação [6]. Em neoplasias mieloproliferativas, mutações no exão 9 do gene *CALR* eliminam o domínio C-terminal KDEL, responsável pela recuperação da calreticulina do aparelho de Golgi para o retículo endoplasmático, e introduzem uma nova sequência que termina em 36 aminoácidos comuns. A proteína *CALR* mutante liberta-se do retículo endoplasmático e forma complexos estáveis com o recetor da trombopoietina, ativando a via JAK-STAT de forma independente da citocina trombopoietina, levando à proliferação clonal anormal [6], [17], [19].

O gene *MPL* codifica o recetor da trombopoietina, que regula a produção de plaquetas. Mutações no domínio transmembranar que envolvem o exão 10 afetam a conformação do recetor, o que leva à ativação permanente da via JAK-STAT mesmo na ausência da ligação com a trombopoietina, tornando-o constitutivamente ativo [6], [17].

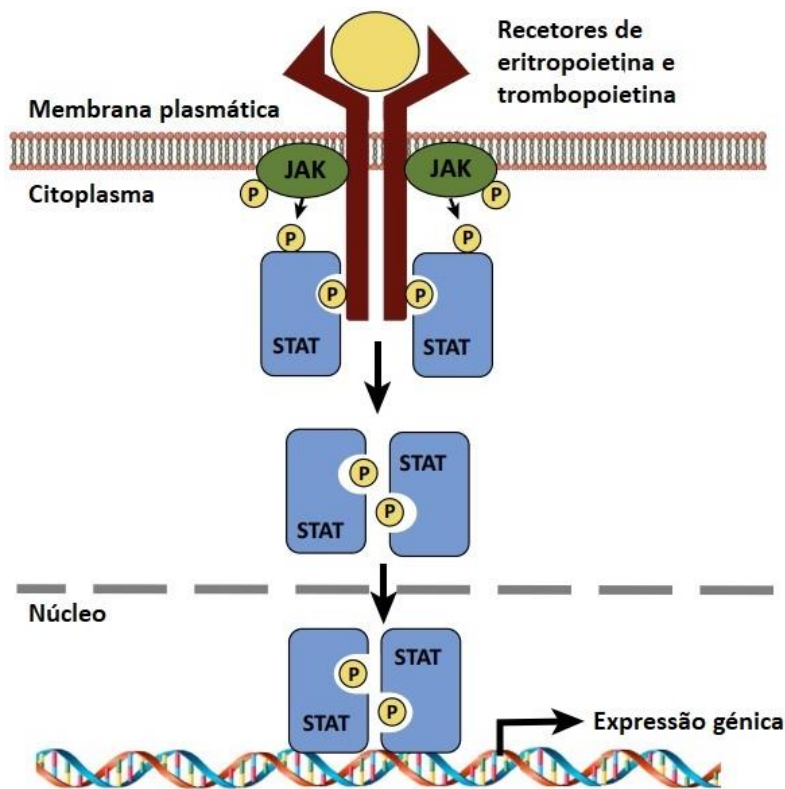


Figura 5 – Via de sinalização JAK-STAT. Após a ligação do JAK aos receptores de eritropoietina e trombopoietina, é desencadeada uma cascata de reações de fosforilação e dimerização dos STAT até ao núcleo, onde atuam como fatores de transcrição. Adaptado de [20].

2.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença hematológica que resulta da acumulação de células malignas precursoras (blastos) na medula óssea com expressão no sangue periférico [21]. É uma doença clínica e biologicamente heterogênea, com uma arquitetura clonal dinâmica caracterizada pela aquisição de diferentes alterações genéticas que promovem o bloqueio da diferenciação e expansão clonal [22].

A LMA apresenta uma variedade de características morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares que, no seu conjunto, são essenciais ao diagnóstico [23]. As alterações genéticas na LMA são translocações, rearranjos e mutações que servem de base à sua classificação, estratificação de risco e decisão terapêutica. Os critérios de classificação da LMA estão definidos na WHO 2022 [3] (Tabela III).

Tabela III – Classificação genética da LMA.

LMA com alterações genéticas definidoras
Leucemia Promielocítica Aguda com translocação <i>PML::RARA</i>
LMA com translocação <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
LMA com translocação <i>CBFB::MYH11</i>
LMA com translocação <i>DEK::NUP214</i>
LMA com translocação <i>RBM15::MRTFA</i>
LMA com translocação <i>BCR::ABL1</i>
LMA com rearranjo <i>KMT2A</i>
LMA com rearranjo <i>MECOM</i>
LMA com rearranjo <i>NUP98</i>
LMA com mutação <i>NPM1</i>
LMA com mutação <i>CEBPA</i>
LMA com mutações relacionadas com mielodisplasia*
LMA com outras alterações genéticas definidas**

* *ASXL1, BCOR, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2*

** Novas entidades emergentes com alterações genéticas menos frequentes

A abordagem ao estudo genético da LMA compreende a utilização de várias técnicas para a identificação das alterações genéticas, nomeadamente o cariótipo convencional, FISH e biologia molecular. No conjunto, estas técnicas permitem a avaliação global da LMA, sendo o cariótipo e o FISH técnicas particularmente úteis ao diagnóstico, nomeadamente na identificação de translocações e rearranjos, enquanto as técnicas de biologia molecular têm também um papel essencial na monitorização da resposta ao tratamento.

Dado o número de alterações genéticas necessárias para a classificação, estratificação de risco e decisão terapêutica, o NGS é cada vez mais utilizado na abordagem ao estudo genético da LMA através da utilização de painéis de genes dirigidos em DNA. Mais recentemente, a abordagem de RNA-Seq para identificação de translocações, em particular das menos frequentes, tem vindo a ser implementada neste grupo de doentes [24].

As alterações genéticas, para além de permitirem a correta classificação da LMA, são essenciais para a estratificação de risco molecular e influenciam a abordagem terapêutica. O consórcio da *European Leukemia Net* (ELN) para a LMA reviu recentemente a estratificação de risco molecular (ELN AML 2022 [25]) onde, para além das alterações que classificam a LMA, são incluídas outras alterações genéticas que estabelecem prognóstico, nomeadamente mutações no gene *TP53* e *FLT3* (duplicações internas em *tandem*, ITD) (Tabela IV).

Com o aparecimento de terapias direcionadas, em particular do tratamento com inibidores FLT3, é essencial a identificação de mutações *FLT3*-ITD e no domínio tirosina cinase (*FLT3*-TKD) numa fase precoce do diagnóstico [24].

Tabela IV – Estratificação de risco molecular da LMA.

Risco Favorável	Risco Intermédio	Risco Adverso
<ul style="list-style-type: none"> t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3</i>-ITD <i>CEBPA</i> mutado 	<ul style="list-style-type: none"> <i>NPM1</i> mutado com <i>FLT3</i>-ITD <i>NPM1 wild-type</i> com <i>FLT3</i>-ITD (sem alterações genéticas de risco adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3::KMT2A</i> Alterações citogenéticas e/ou moleculares não classificadas como favoráveis ou adversas 	<ul style="list-style-type: none"> t(6;9)(p23.3;q34.1); <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i>, <i>MECOM(EV11)</i> t(3q26.2;v); rearranjo <i>MECOM(EV11)</i> -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariótipo complexo Mutações nos genes <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i> e/ou <i>ZRSR2</i> <i>TP53</i> mutado

3. Metodologias executadas no laboratório de Hemato-Oncologia

3.1. Extração de ácidos nucleicos: DNA e RNA

A extração e purificação de ácidos nucleicos em amostras biológicas é um procedimento laboratorial fundamental à realização dos estudos moleculares. A escolha do método de extração é crucial e passa por uma análise crítica do tipo e volume de amostra a extrair, quantidade e qualidade do ácido nucleico, reprodutibilidade da técnica e custo-benefício [26], [27]. Um dos maiores desafios é o ajuste dos protocolos, de modo a que seja sempre garantido o maior rendimento.

Na extração de DNA, uma molécula de cadeia dupla estável, a captura do ácido nucleico pode ser feita diretamente da amostra biológica, seja esta sangue periférico ou medula óssea. Os contaminantes desta extração são as proteínas, pelo que o uso de uma protease irá digeri-las [28], [29].

No RNA, e sendo o ácido nucleico de cadeia simples e instável, há necessidade de uma estabilização pré-extração para evitar a degradação com RNAses, que são muito estáveis e ativas. Esta preparação tem por base o isolamento dos leucócitos, após lise dos eritrócitos com *Red Blood Cell Lysis Buffer* (RBCL), que são armazenados num tampão estabilizador (RLT, GTC, Trizol) com agentes redutores que desnaturam irreversivelmente as RNAses [30]. Este procedimento deve ser feito no máximo até 48h após a colheita, de modo a minimizar a perda de sensibilidade, em particular para estudos de monitorização da doença residual mínima. O processo é realizado em câmara de fluxo laminar e o técnico que executa deverá exercer boas práticas laboratoriais, como o uso de luvas e material esterilizado e RNA *free*. Em relação à eliminação de contaminantes durante a extração de RNA, a enzima utilizada é uma DNase, para que o DNA seja degradado, e inibidores de RNAses [28], [31]. Existem, também, comercializados tubos de colheita para amostras biológicas que contêm estabilizantes do RNA, que permitem aumentar o tempo entre a colheita e o processamento pré-extração (por exemplo, *PAXgene® Blood RNA Tube*).

No final da extração de RNA é realizada a transcrição reversa (RT-PCR), em que o RNA servirá de molde à síntese de uma cadeia de DNA complementar (cDNA). Sendo uma estrutura de cadeia dupla, é mais estável do que o RNA e não possui os intrões,

sendo uma vantagem, por exemplo, na pesquisa de genes de fusão. Para tal, é utilizado um *kit* composto por um *buffer*, dNTPs, *random primers*, enzima transcriptase reversa e inibidores de RNAses, juntamente com água e o RNA molde. A finalidade desta reação é gerar uma *pool* de cDNA que será utilizada posteriormente [32]. A principal preocupação neste processo é, novamente, a eliminação de qualquer possibilidade de contaminação, pelo que, mais uma vez, todas as precauções devem partir do técnico que realiza a tarefa, como o uso de componentes livres de RNAses [33].

No laboratório de Hemato-Oncologia, o método de extração de DNA e/ou RNA depende do tipo de estudo genético a realizar. A pesquisa de mutações somáticas é realizada maioritariamente a partir de DNA, todavia, em casos que se pretende identificar genes de fusão ou avaliar a expressão génica, recorre-se à extração de RNA. Outra particularidade da extração são estudos que envolvem populações específicas de células, das quais são enviadas amostras de *cell sorting* ou é efetuado, no laboratório, um gradiente de densidade (Figura 6), que permite o isolamento de granulócitos, células mononucleares, plaquetas e também de adipócitos (apenas em medula óssea) por centrifugação.

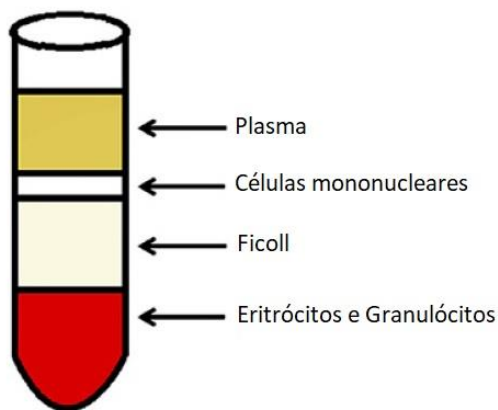


Figura 6 – Produto final de um gradiente de densidade. É utilizado um meio de gradiente de densidade (por exemplo, Ficoll) que, após a adição da amostra biológica sob o mesmo e centrifugação, obtém-se as camadas de interesse. Adaptado de [34].

Em situações em que há necessidade de confirmar se uma variante previamente identificada é de origem germinativa ou somática, é extraído DNA de amostra de tecido não-hematopoiético, normalmente raiz cabelo.

Os métodos de extração utilizados no laboratório baseiam-se na extração em coluna de sílica ou com partículas magnéticas. Em ambos, a extração engloba 5 passos fundamentais: destruição das estruturas celulares, isolamento do ácido nucleico, ligação do ácido nucleico a uma matriz de purificação, lavagem e eluição. Anualmente, são realizadas, em média, 4400 extrações de DNA e 1400 extrações de RNA.

3.1.1. Extração em Coluna

A extração em coluna (Figura 7) utiliza membranas de sílica que promovem a extração de ácidos nucleicos de alta pureza, pois apresentam propriedades que lhes conferem elevada afinidade com os mesmos. A membrana, ao estar carregada positivamente, faz com que tanto o DNA como o RNA se liguem, pois têm carga negativa [26].

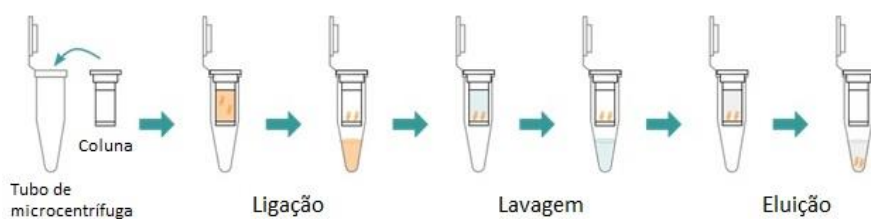


Figura 7 – Etapas da extração em coluna com membrana de sílica. Processo inicia com a adição da enzima e o *buffer* para a lise celular. De seguida ocorre a ligação à membrana, são efetuadas 2 etapas de lavagem e, por último, é adicionado o *buffer* para a eluição. Adaptado de [35].

Na rotina do laboratório de Hemato-Oncologia, a extração em coluna de sílica por método manual é realizada sempre que é necessário extrair DNA ou RNA para um estudo genético urgente, amostras de raiz de cabelo, massas tumorais pequenas e perante amostras com baixa celularidade.

3.1.2. Extração com partículas magnéticas

A extração com esferas paramagnéticas (Figura 8) procede do mesmo modo que a extração em coluna. Aqui, em vez de ser usada uma membrana de sílica, a captura dos ácidos nucleicos é feita através de *beads* e utiliza um íman que faz a captura das *beads* e posterior separação dos ácidos nucleicos. Todas as condições e etapas são semelhantes à extração anteriormente descrita [36], [37].

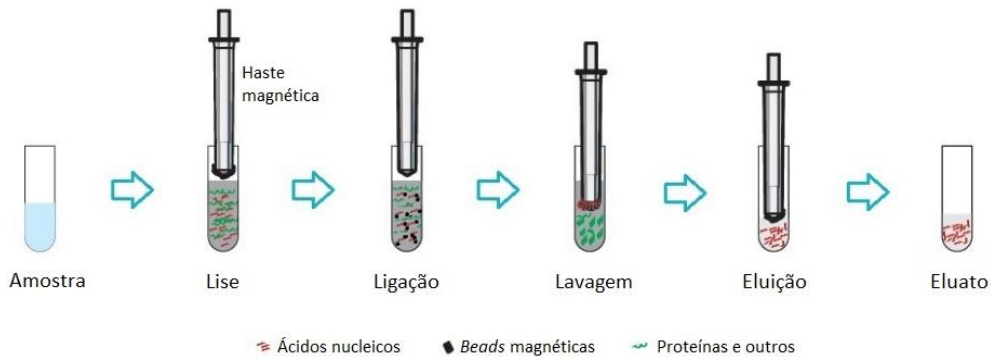


Figura 8 – Workflow da extração com *beads*. Adaptado de [38].

O *QIAasympyphony* é o instrumento de extração de DNA e RNA utilizado na rotina do laboratório e que tem a capacidade de extrair até 96 amostras simultaneamente. Ao ser um processo automatizado, tem também a vantagem de eliminar o erro humano [37].

3.2. Quantificação dos ácidos nucleicos

3.2.1. Espectrofotometria UV

A espectrofotometria UV permite determinar a pureza e concentração de DNA ou RNA através da medição da absorção de luz UV em 3 comprimentos de onda diferentes: 230 nm, 260 nm e 280 nm (Figura 9) [26], [39].

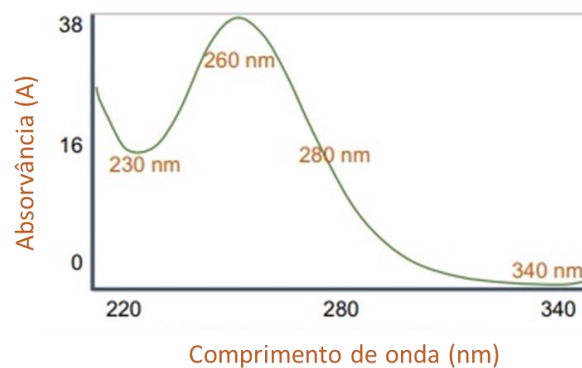


Figura 9 – Curva característica dos ácidos nucleicos, com absorção máxima aos 260 nm. A concentração é calculada aplicando a lei de *Lambert-Beer*. Adaptado de [40].

A pureza dos ácidos nucleicos é avaliada pelas proporções A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . No DNA, a proporção A_{260}/A_{280} é cerca de 1,8 e A_{260}/A_{230} é 2,0. No RNA, os valores de

ambas as proporções devem ser cerca de 2 [39], [40]. Uma vez que a absorção da luz UV não é restrita aos ácidos nucleicos, esta metodologia não é muito específica, pois as concentrações obtidas poderão não refletir a concentração real de DNA/RNA [41].

3.2.2. Fluorimetria

A fluorimetria utiliza um corante fluorogénico que se liga, seletivamente, ao DNA ou RNA, permitindo que seja medida, apenas, a intensidade do sinal se os corantes estiverem ligados aos ácidos nucleicos [27], [40], [41]. O fluorímetro gera uma curva de calibração a partir de amostras padrão com concentrações conhecidas, permitindo, através das unidades relativas de fluorescência (RFU), determinar a concentração de amostras desconhecidas (Figura 10) [27], [41].

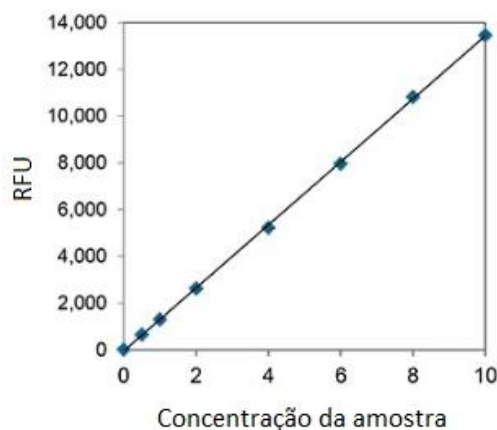


Figura 10 – Curva padrão de fluorescência. Adaptado de [42].

A grande vantagem da fluorimetria é o elevado grau de sensibilidade e especificidade, uma vez que a fluorescência emitida corresponde, somente, aos ácidos nucleicos, eliminando interferências de possíveis contaminantes [40], [41].

3.3. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A PCR é um método *in vitro* baseado no processo de amplificação de sequências de interesse do DNA por meio de uma síntese enzimática [43]. Esta estratégia permite obter milhões de cópias de uma região alvo a partir de uma quantidade reduzida de DNA [44]. Para que a amplificação ocorra, são essenciais os componentes descritos na Tabela V, bem como água e a amostra que servirá como molde à reação [45], [46].

Tabela V – Componentes essenciais à técnica de PCR.

Componente	Função/Características principais
<i>Buffer</i>	<ul style="list-style-type: none">• Mantem as condições químicas ideais à atividade da enzima• Composto por: Tris-Cl, MgCl₂, KCl ou (NH₄)₂SO₄• Mg²⁺ → Cofator da DNA polimerase
dNTP's	<ul style="list-style-type: none">• Quantidades equimolares de dATP, dCTP, dTTP, dGTP• Formam as novas cadeias de DNA
<i>Primers</i>	<ul style="list-style-type: none">• Oligonucleótidos que flanqueiam a região alvo• Sequência complementar à cadeia molde• Local de partida para a DNA polimerase• Dois <i>primers</i>: <i>primer forward</i> e <i>primer reverse</i>
DNA Polimerase	<ul style="list-style-type: none">• Enzima termoestável, isolada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>• Estende os <i>primers</i> na direção 5' → 3'• Mais usada: Taq Polimerase

A PCR é composta por 3 etapas: desnaturação, hibridização (*annealing*) e extensão (Figura 11) [46].

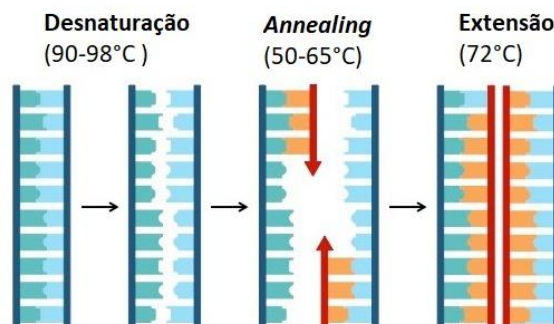


Figura 11 – Etapas da PCR. Adaptado de [47].

A desnaturação corresponde à separação da cadeia dupla do DNA/cDNA molde em duas cadeias simples, em que a temperatura varia entre 90-98°C. Segue-se a hibridização, onde os *primers* flanqueiam a região de interesse nas cadeias simples, com as temperaturas a variar entre 50-65°C conforme a temperatura de *annealing* dos *primers* [46].

Por último, na etapa de extensão, a DNA polimerase inicia a ligação dos dNTP's à cadeia, a uma temperatura de aproximadamente 72°C. A cada ciclo, o número de cópias do alvo duplica, pelo que o número total de cópias pode ser definido pela exponencial 2^n , onde n corresponde ao número de ciclos. Quando as novas cadeias estão formadas,

o processo ocorre até que a concentração dos *primers* ou dNTP's se torne limitante [43], [45], [46]. No final da reação é esperada a existência de várias cópias da região alvo.

Numa reação de PCR, o *design* dos *primers* é de extrema importância e deve ter em conta características como o tamanho, conteúdo em GC, não complementaridade, temperaturas de *melting* e *annealing* [48], [49]. O conteúdo GC está diretamente relacionado com a temperatura de *annealing* (temperatura em que o *primer* se liga à cadeia molde), pois quanto maior o conteúdo em GC na sequência, maior será a temperatura de *annealing*. Assim, o conteúdo GC deve ser semelhante, com um valor percentual entre 40-60% [48]. A temperatura de *melting* (T_m) é a temperatura na qual metade da cadeia se encontra na forma desnaturada. Deve estar entre 55-70°C e é calculada a partir da fórmula [46], [50]:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(A + T) + 4(C + G)$$

O uso de *softwares*, como por exemplo o *Primer3* e *Primer-BLAST*, facilita a escolha dos *primers*.

3.3.1. PCR Multiplex

A PCR Multiplex caracteriza-se pela amplificação simultânea de várias sequências alvo numa só reação através do uso de mais do que um par de *primers* [46], [51]. Ao contrário da PCR convencional, esta permite a amplificação de vários fragmentos do mesmo gene ou de vários genes em simultâneo, o que gera uma maior quantidade de informação numa só reação [50], [52].

A otimização de uma estratégia de PCR Multiplex pode ser desafiante, uma vez que tem de garantir que todos os pares amplificam as respetivas regiões sem que haja competição de amplificação, não sejam homólogos entre si, tenham temperaturas de *melting* semelhantes e geram fragmentos com tamanhos diferentes o suficiente para que seja possível distingui-los [46]. Existem, no mercado, *kits* com especificações que facilitam a amplificação de reações de PCR Multiplex.

No laboratório é utilizado o Multiplex PCR kit (*QIAGEN*) que contém água, *master mix* e *Q Solution* [53]. A *master mix* contém *buffer*, dNTP's, MgCl_2 e uma DNA polimerase (*HotStarTaq* DNA Polimerase) modificada da Taq Polimerase e que exige, no início da

reação, um tempo de incubação maior (15 min). Isto evita a hibridização inespecífica dos *primers* e a formação de dímeros entre si, o que melhora a eficiência da reação [53]. A *Q Solution* facilita a amplificação de amostras de DNA que tenham tendência a formar estruturas secundárias e que possuam um elevado conteúdo de GC, o que, em condições normais, pode tornar difícil a amplificação das regiões alvo [53].

A estratégia de PCR Multiplex é utilizada no laboratório, por exemplo, na identificação dos principais tipos de transcritos do gene *BCR::ABL1* e na pesquisa da mutação *JAK2 V617F*.

3.3.2. PCR *Allele Specific* (ASO)

A estratégia de PCR específico de alelo utiliza *primers* específicos para a(s) variante(s) que se pretende identificar. Para além de ser específico e dirigido, é bastante sensível, sendo uma vantagem na identificação de variantes somáticas num *background* de células normais [54], com uma sensibilidade de $10^{-3}/10^{-4}$.

O ASO-PCR é muitas vezes utilizado em estratégia multiplex, utilizando um *primer* específico para o nucleótido *wild-type* e outro para a mutação pontual, em conjunto com um *primer* comum, permitindo discriminação alélica numa só reação [50], [54].

No laboratório, esta estratégia é utilizada para pesquisa de mutações pontuais, nomeadamente *JAK2 V617F*, *BRAF V600E* e *BCR::ABL1 T315I*.

3.3.3. PCR Nested

Em situações onde é necessário aumentar a sensibilidade da reação, recorre-se ao PCR Nested. A técnica envolve duas reações sequenciais, onde cada uma, normalmente, utiliza um par de *primers* diferente [55].

A primeira reação é semelhante à PCR convencional, em que um par de *primers* flanqueia uma região alvo e amplifica-a. A segunda reação utiliza como molde o produto do primeiro PCR e, com o segundo par de *primers*, amplifica o fragmento de interesse dentro da região alvo. O segundo par de *primers* é, normalmente, mais interno em relação ao primeiro, ou seja, vai amplificar uma sub-região [50], [55].

No laboratório, a estratégia de PCR Nested é utilizada na pesquisa de mutações no domínio tirosina cinase do *ABL1*, identificação do gene de fusão *FIP1L1::PDGFR α* e para a avaliação de genes de fusão em contexto de doença residual mínima.

3.3.4. Uso de controlos

Nas reações de PCR Multiplex, ASO-PCR e PCR Nested, são incorporados na reação controlos positivos e negativos.

O controlo positivo é usado, sobretudo, para excluir erros na preparação da *mix* da reação e garantir que a reação amplificou corretamente o alvo. O controlo negativo e o branco são utilizados para excluir falsos positivos, contaminação dos *primers* e dos reagentes [50]. Estes controlos são, essencialmente, amostras em que já é conhecido o diagnóstico da variante em estudo.

3.4. Eletroforese em Gel de Agarose

A avaliação dos produtos de PCR é uma etapa necessária em todas as reações, uma vez que a partir dessa avaliação é possível dar um resultado ou prosseguir estudos com a certeza de que a região de interesse está amplificada. Um dos métodos utilizados para este fim é a eletroforese em gel de agarose [56].

A eletroforese em gel de agarose consiste na separação e identificação de fragmentos de DNA/cDNA com base nos respetivos tamanhos. A agarose consiste num polissacarídeo que, após ser dissolvida num tampão (TAE ou TBE), forma um conjunto de cadeias poliméricas que funcionam como uma malha [50]. Com a aplicação de corrente elétrica, os fragmentos migram ao longo de uma matriz de agarose e são separados de acordo com o seu tamanho [56], [57].

A escolha da concentração de agarose é um fator importante, pois determina a gama de resolução e porosidade do gel. Quanto maior a concentração de agarose, menor será o tamanho dos poros da malha (rede polimérica), o que dificulta a migração de fragmentos de maior comprimento, aumentando a resolução [50], [57].

3.5. PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real permite a quantificação relativa ou absoluta de um DNA/cDNA alvo durante a fase exponencial da amplificação, ao contrário do que acontece nos restantes PCRs. A cada ciclo em que ocorre amplificação, é emitida fluorescência, seja através da utilização de corantes intercalantes de DNA, como o *SYBR Green*, ou sondas de hidrólise, por exemplo a *TaqMan* [58], [59]. O *SYBR Green* é um dos corantes mais utilizado que se liga a todo o DNA de cadeia dupla. Ao intercalar-se entre pares de bases adjacentes durante a extensão dos *primers*, leva à emissão e deteção de fluorescência. Contudo, o uso destes corantes tem a desvantagem de não serem específicos, sendo aconselhada a análise de uma curva de *melting* (HRM) [58], [60]. A sonda *TaqMan* corresponde a um oligonucleótido marcado com fluorescência na extremidade 5' (*reporter*) e contém um supressor de fluorescência na extremidade 3' (*quencher*). A sonda liga-se juntamente com os *primers* e, na fase de extensão, a atividade da DNA polimerase cliva a sonda, fazendo com que a emissão de fluorescência do *reporter* não ocorra mais para o *quencher* e o sinal seja detetado pelo aparelho [59]–[61].

A monitorização da reação é feita através de uma curva sigmoide e contém 3 fases distintas: exponencial, linear e plateau (Figura 12).

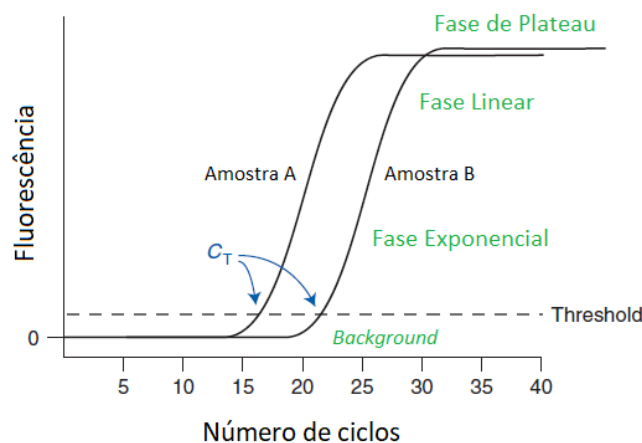


Figura 12 – Curva característica do PCR em Tempo Real Quantitativo. Adaptado de [62].

O sinal de fluorescência capturado permite a monitorização da reação em tempo real. O ciclo de amplificação na qual o sinal de fluorescência atinge o *threshold* é

denominado valor de C_t (*Cycle Threshold*), que é inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra [60], [63].

A eficiência da reação é obtida através de calibradores ou diluições seriadas de uma amostra, que formam uma reta de calibração em que o declive corresponde à eficiência e deve estar entre 90-110% [58], [63].

A utilização do PCR em tempo real permite uma quantificação relativa ou absoluta de um determinado alvo na amostra.

A quantificação relativa compara a expressão do gene alvo de uma amostra com um gene de referência. É um método de C_t comparativo e os resultados são expressos em ordem de grandeza [58], [60]. A expressão relativa é calculada através das seguintes equações:

$$(1) \Delta C_t (\text{amostra A}) = C_t (\text{alvo A}) - C_t (\text{referência A})$$

$$(2) \Delta C_t (\text{amostra B}) = C_t (\text{alvo B}) - C_t (\text{referência B})$$

$$(3) \Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{amostra A}) - \Delta C_t (\text{amostra B})$$

$$(4) \text{Expressão Relativa} = 2^{-(\Delta \Delta C_t)}$$

No caso da quantificação absoluta, esta possibilita a determinação do número exato de cópias do gene/sequência alvo em estudo a partir de uma curva padrão. A curva é uma regressão linear conseguida através da amplificação de calibradores com concentrações conhecidas (Figura 13). O número de cópias é calculado de acordo com os valores da regressão linear [59], [60].

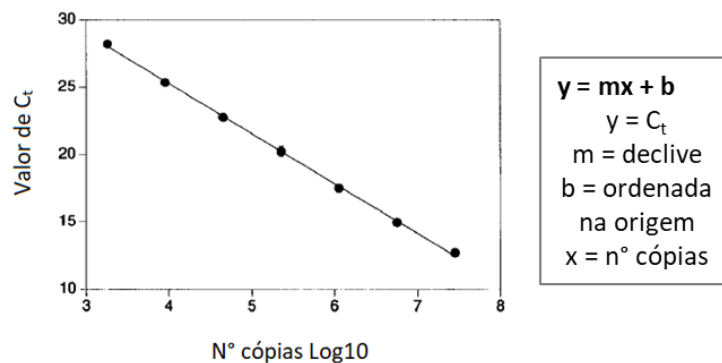


Figura 13 – Representação da regressão linear. Adaptado de [61].

Por ser uma técnica mais sensível e específica, é a técnica recomendada e utilizada no laboratório para monitorização da doença residual mínima [64], nomeadamente para quantificação de transcritos do gene *BCR::ABL1*, *NPM1*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* e *CBFB::MYH11*.

3.6. HRM (*High Resolution Melting*)

A metodologia de *High Resolution Melting* baseia-se nas características de dissociação do DNA de cadeia dupla com o aumento da temperatura. A temperatura de *melting* (temperatura na qual metade da cadeia se encontra na forma desnaturada) depende do conteúdo em GC e da distribuição das bases no DNA [65]. Alterações genéticas num segmento de DNA vão influenciar a sua dissociação e T_m , permitindo distinguir perfis de dissociação diferentes em relação a amostras controlo [66].

Esta metodologia requer a utilização de agentes intercalantes da dupla cadeia de DNA (*SYBR Green*, *EvaGreen*), sendo os produtos amplificados de tamanho ~100 pb. Posteriormente, o produto de PCR é submetido a um aumento gradual de temperatura com deteção de fluorescência. Assim, à medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui até que deixe de existir DNA de cadeia dupla [65], [67]. Na análise de dados é feita a comparação dos perfis de *melting* das amostras desconhecidas com amostras controlos (Figura 14).

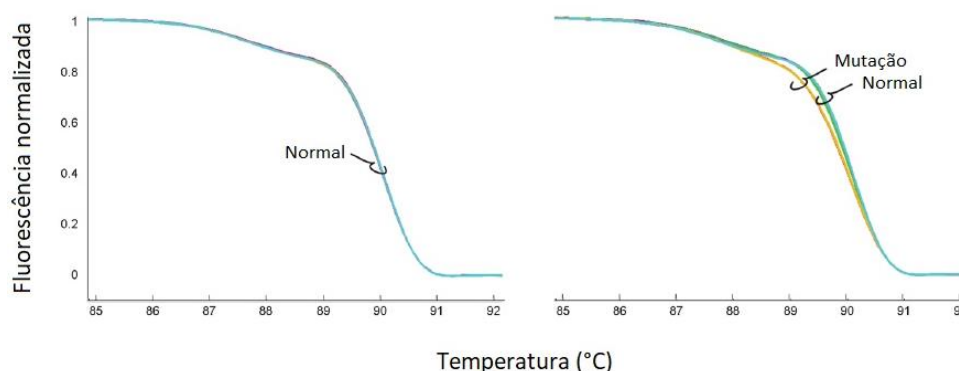


Figura 14 – Representação de curvas de *melting*. Adaptado de [68].

No laboratório, esta estratégia é utilizada para o *screening* de mutações no domínio tirosina cinase do gene *FLT3* (*FLT3-TKD*).

3.7. Análise de Fragmentos

A análise de fragmentos ou *Gene Scann* combina a amplificação de fragmentos de DNA/cDNA marcados com fluorescência com a separação por eletroforese capilar. Esta técnica tem uma ampla variedade de aplicações devido à sua capacidade de separar fragmentos com alta resolução (1 base) e permite uma quantificação relativa [69].

A técnica compreende 4 etapas: extração de DNA, amplificação por PCR, eletroforese capilar e análise de dados (Figura 15).

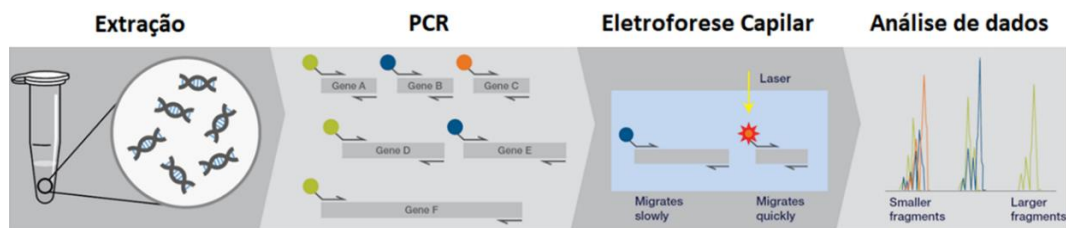


Figura 15 – Etapas da Análise de Fragmentos. Adaptado de [69].

Na etapa de PCR, um dos *primers* está marcado com fluorescência, podendo ser também utilizada uma estratégia multiplex com diferentes fluorocromos. Posteriormente a amostra é submetida a uma eletroforese capilar, juntamente com um marcador de peso molecular (adicionado a cada produto de PCR) e formamida. Os fragmentos migram por ordem crescente de tamanho no capilar e passam por um laser que deteta fluorescência [69].

Esta técnica é utilizada na rotina do laboratório para pesquisa de mutações no gene *NPM1* e *FLT3-ITD*, bem como no estudo da hipermutação somática da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV para identificação de rearranjos clonais).

3.8. MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MLPA é um método de PCR multiplex que, com um único par de *primers* universal, amplifica um conjunto de sondas, em que cada uma deteta uma sequência específica de DNA. Esta técnica permite a detecção simultânea de variação do número de cópias (CNVs) de até 50 sequências diferentes de DNA genômico [70]–[72].

O procedimento de MLPA (Figura 16) contém uma mistura de sondas, em que cada uma é constituída por duas hemi-sondas para regiões alvo. Apresentam, na sua

constituição, uma sequência universal para a ligação dos *primers* e uma sequência *stuffer* que confere diferenças de tamanho, dando a cada sonda comprimentos únicos [71], [73].

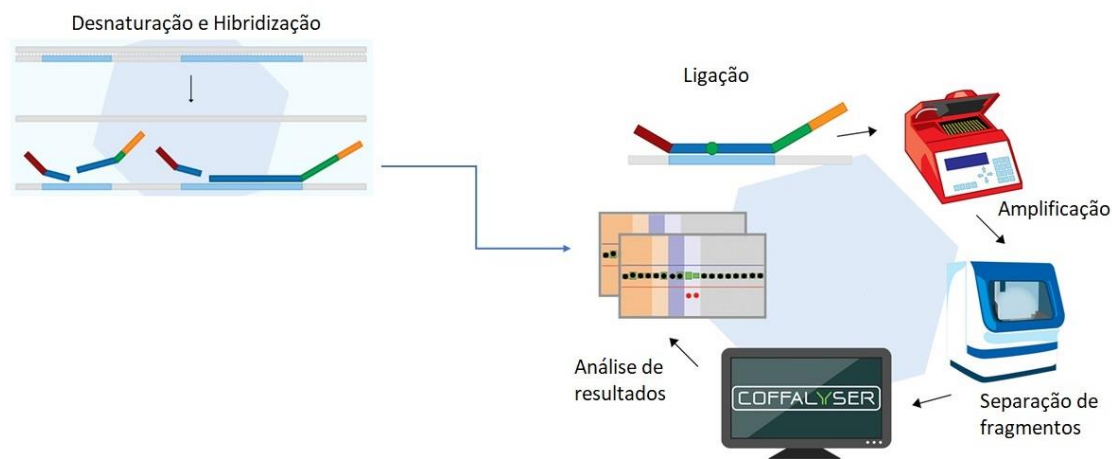


Figura 16 – Procedimento do MLPA, dividido em cinco etapas: desnaturalização e hibridização, ligação das sondas, amplificação, separação dos fragmentos e análise de resultados. Adaptado de [74].

As hemi-sondas hibridizam com as sequências de DNA alvo imediatamente adjacentes [70]. Após a ligação das hemi-sondas, o número de sondas ligadas corresponde ao número de sequências alvo na amostra [71]. Segue-se a amplificação e somente as sondas ligadas anteriormente são amplificadas [73].

A separação ocorre por eletroforese capilar, onde os fragmentos de cada sonda, em conjunto com um marcador de peso molecular e formamida, são separados de acordo com o tamanho, produzindo um eletroferograma específico com um padrão de picos [75], [76].

O *software* de análise é o *Coffalyser* e, sendo o MLPA uma técnica semi-quantitativa, a análise é realizada pela comparação das amostras em estudo com amostras controlo, indicando o número de cópias relativo da sequência de DNA alvo [71], [73]. Outra representação gráfica dos resultados é a normalização dos rácios das sondas das amostras em estudo em relação às amostras de referência [75].

Os *kits* de MLPA contém um controlo interno para a avaliação da qualidade do processo. Esta avaliação fornece informações sobre a desnaturalização e quantidade de DNA e está representada pelos fragmentos D e Q, respetivamente [71], [76]. Existem,

também, fragmentos X e Y e um fragmento de referência, que é comparado com os restantes fragmentos de controlo de qualidade [75], [76].

Em Hemato-Oncologia, o MLPA é utilizado como metodologia complementar ao estudo de Síndromes de Falência Medular congénitos e na Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) B.

3.9. Sequenciação de Sanger

A Sequenciação de Sanger (Figura 17) baseia-se no princípio de replicação de DNA e fornece informações relativamente à ordem das bases (adenina, guanina, citosina, timina) numa sequência de DNA/cDNA. É utilizada na identificação e caracterização de variantes genéticas (substituições, inserções e pequenas deleções), através da comparação da sequência lida com uma sequência de referência [77].



Figura 17 – Workflow da Sequenciação de Sanger. Adaptado de [78].

A sequenciação de uma região alvo é conseguida através da incorporação na reação de didesoxirribonucleotídeos (ddNTP's) que, ao contrários dos dNTP's, são modificados de modo a não possuírem o grupo hidroxilo na posição 3'. Quando estes são adicionados à sequência, a extensão da cadeia termina [79]. Outra característica dos ddNTP's é que apresentam fluoróforos de cores diferentes para cada nucleotídeo [77].

A sequenciação de uma região de interesse requer um PCR convencional onde é amplificada a região a sequenciar. Após visualização em gel de agarose, o produto de PCR é submetido a uma purificação dos produtos com uma enzima *ExoSAP-IT* (*ThermoFisher*), de forma a eliminar todos os componentes da reação de PCR que interfiram com a sequenciação [80].

A PCR de sequenciação é uma reação unidirecional, sendo apenas utilizado um *primer*, ddNTP's, dNTP's e uma enzima [80].

Na eletroforese capilar, a detecção de fluorescência ocorre devido à excitação dos fluoróforos dos ddNTP's. Em relação aos resultados, estes são apresentados, com a ajuda de um *software* (por exemplo, *Chromas*), na forma de um eletroferograma [79], [81].

Uma primeira abordagem na análise de dados é a visualização geral das sequências quanto à sua qualidade. Posto isto, as sequências são comparadas com as respectivas sequências de referência. São utilizadas bases de dados como o *Ensembl genome browser* e NCBI, que contém as sequências de referência, e programas de alinhamento, como por exemplo o *Clustal Omega* [80].

Na presença de uma variante, a mesma pode ser visualizada no eletroferograma ou no alinhamento com a sequência de referência e a sua identificação passa pela pesquisa da posição desta na sequência de referência, nomenclatura e classificação de acordo com as *guidelines* da *American College of Medical Genetics (ACMG)* [82], [83].

É uma técnica de fácil otimização, porém, apresenta um limite de detecção de 15-20%, o que significa que, por vezes, mutações somáticas ou mosaicos podem não ser detetados. Em Hemato-Oncologia, por exemplo, se o clone de células malignas for muito pequeno ou a variante apresentar uma frequência alélica menor que 15%, a probabilidade de a detetar por Sequenciação de Sanger é baixa, optando-se por técnicas mais sensíveis.

Ainda assim, é uma técnica muito utilizada no laboratório devido ao seu custo-benefício. Exemplos da sua aplicação é a pesquisa de mutações nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*.

3.10. NGS (*Next Generation Sequencing*)

Next Generation Sequencing, também denominada Sequenciação de Segunda Geração, é uma técnica que permite a sequenciação de múltiplos fragmentos em simultâneo numa só corrida, tendo a capacidade de gerar milhões de sequências (até ~400 pb) de DNA e RNA, atingindo um alto rendimento e sensibilidade [84], [85].

Esta técnica, dependendo da capacidade do equipamento, permite sequenciar todo o genoma (*Whole Genome Sequencing*), exoma (*Whole Exome Sequencing*) ou genes alvo (*Target Sequencing*).

WGS corresponde à sequenciação de todo o genoma, o que inclui regiões codificantes e não codificantes, enquanto que o WES abrange apenas a região codificante (~23000 genes), que corresponde a 1-2% do genoma humano. Num exoma clínico, é realizada a sequenciação de aproximadamente 6000 genes associados a doenças, normalmente doenças raras [84], [86]. A abordagem por genes alvo (*Target Sequencing*) é dirigida a um conjunto de genes associados a uma patologia, frequentemente utilizada em laboratórios de diagnóstico. A utilização de painéis de genes permite aumentar a profundidade de leitura, possibilitando a deteção de variantes com frequências alélicas baixas [86], [87].

O *workflow* do NGS é constituído por 4 etapas: preparação das bibliotecas, amplificação clonal, sequenciação e análise dos dados (Figura 18).

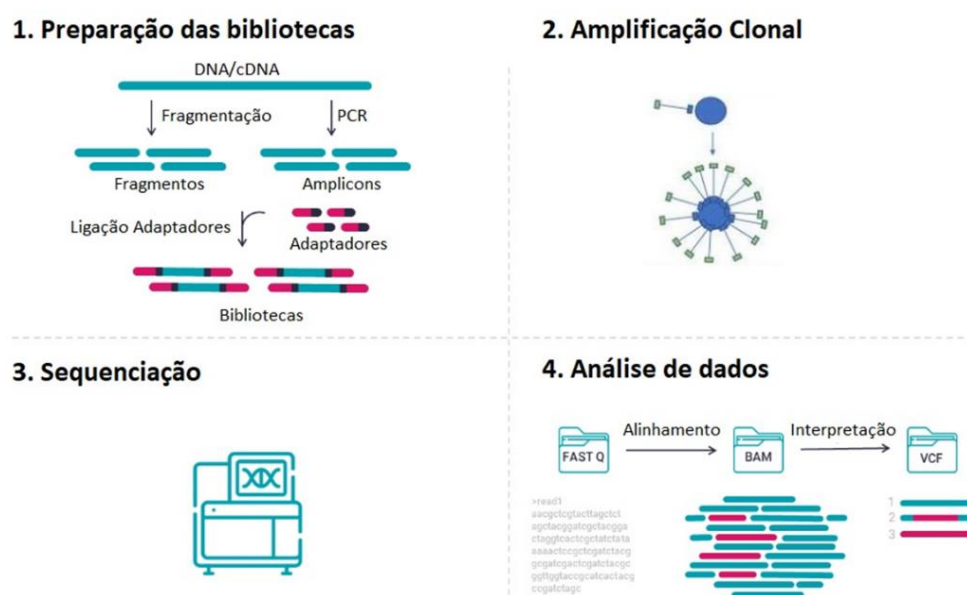


Figura 18 – Workflow do NGS. Adaptado de [88].

A principal característica do processo de NGS, e que permite a sequenciação simultânea de vários fragmentos de diferentes amostras, é a utilização de *barcodes* moleculares, que se ligam nas extremidades dos amplicons durante a preparação das bibliotecas e, ao terem sequências específicas, permitem a identificação das amostras

individualmente [87], [89]. A ligação de adaptadores é igualmente importante para a etapa de amplificação clonal.

A química de sequenciação na etapa de amplificação clonal difere de acordo com a tecnologia utilizada (Figura 19). Plataformas *Ion Torrent* (*ThermoFisher*) utilizam PCR de emulsão, em que as bibliotecas são capturadas numa gota de óleo (micela) e em cada micela ocorre a amplificação independente de uma biblioteca num micropoço. Posteriormente, as micelas são carregadas num *chip* e, no passo de sequenciação, a incorporação das bases é detetada por mudanças de pH, em que por cada nucleotídeo adicionado à cadeia é libertada uma molécula de H⁺ [85], [89].

Outra plataforma comumente utilizada é a *Illumina*. Esta apresenta uma abordagem de *bridge* PCR, em que as extremidades dos amplicons ligam-se a adaptadores fixos na superfície sólida da célula de fluxo, seguindo-se a amplificação e a formação de *clusters*. Na sequenciação, a adição de ddNTP's marcados com fluorescência faz com que estes libertem um sinal que é detetado pelo aparelho [85], [89].

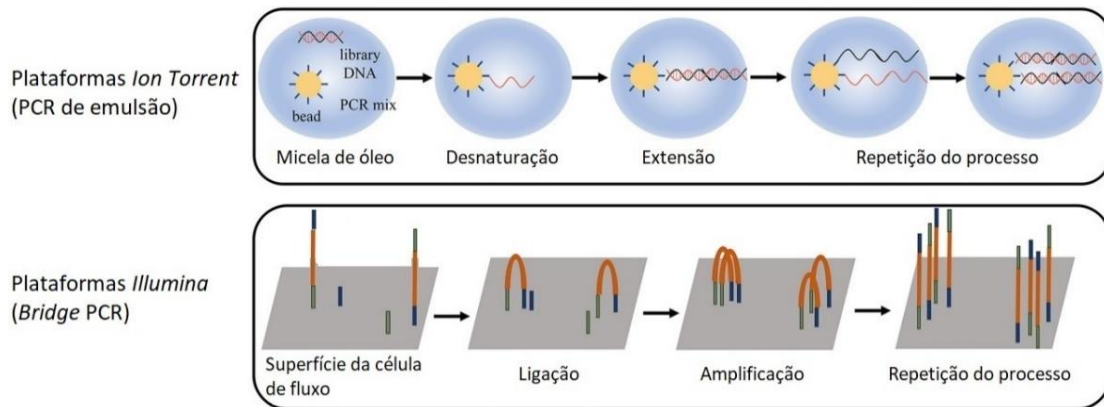


Figura 19 – Química de sequenciação nas plataformas *Ion Torrent* e *Illumina*. Adaptado de [90].

Posteriormente à sequenciação ocorre a análise bioinformática dos dados, que se divide em análise primária, análise secundária e análise terciária.

A análise primária é realizada pelo *software* do instrumento de sequenciação, que gera um ficheiro FASTQ com as sequências de leitura e os *scores* de qualidade. Já a análise secundária inclui um ficheiro BAM com os resultados do alinhamento das sequências com a respetiva sequência de referência e a *call* das variantes. Por fim, numa

última análise, é realizada a anotação e interpretação das variantes, seguindo as *guidelines* da ACMG [83], [89].

No laboratório da UFHM, os estudos moleculares por NGS são realizados por painéis de genes direcionados, utilizando a tecnologia *Ion Torrent* (*ThermoFisher*).

4. Algoritmos de estudo em Hemato-Oncologia

4.1. Neoplasias Mieloproliferativas

4.1.1. Leucemia Mielóide Crónica (LMC)

Para o estudo molecular da LMC é essencial a pesquisa de transcritos do gene *BCR::ABL1* ao diagnóstico. Sendo um gene de fusão, o estudo é realizado em cDNA após a extração de RNA e RT-PCR. Posteriormente é realizado um PCR multiplex para a amplificação dos transcritos mais frequentes – e13a2, e14a2, e1a2, juntamente com um fragmento de controlo interno (Figura 20). No laboratório são realizadas, em média, 260 pesquisas de transcritos *BCR::ABL1* por ano.

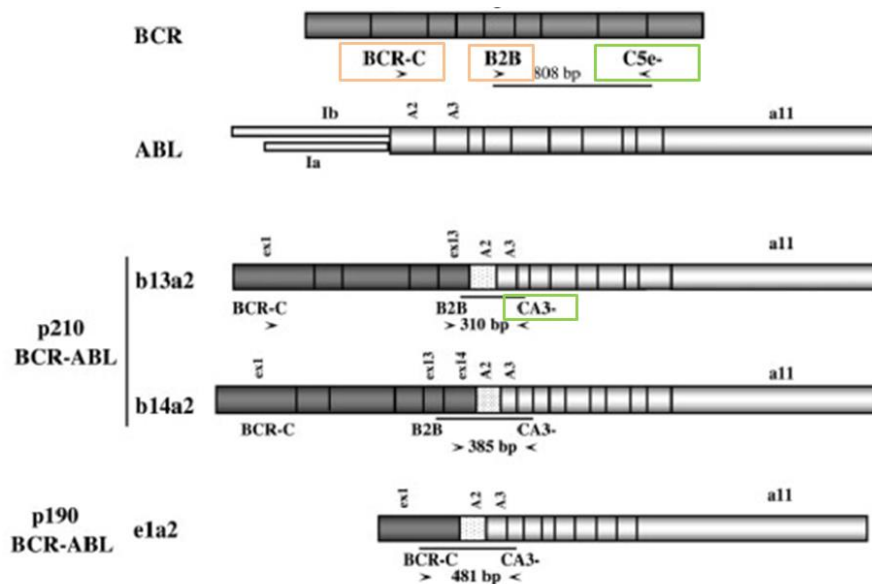


Figura 20 – Desenho da reação de PCR multiplex para pesquisa de transcritos *BCR::ABL1*. Os primers forward (laranja) e os primers reverse (verde) amplificam o gene *BCR* para a banda controlo e os transcritos *BCR::ABL1*. Adaptado de [91].

O resultado é visualizado em gel de agarose (2%), juntamente com amostras controlo, e na presença de translocação é possível identificar o transcrito pelo tamanho do fragmento (Figura 21).

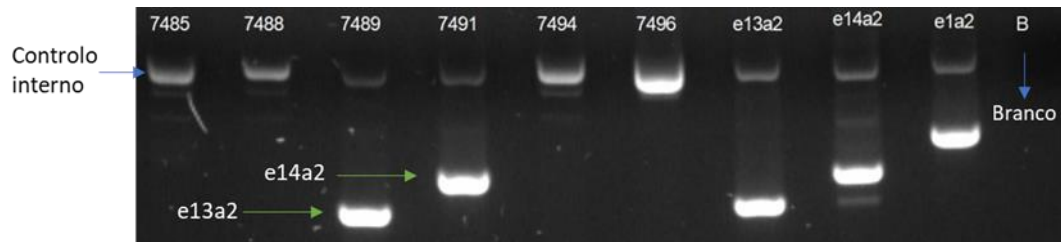


Figura 21 – Visualização do PCR multiplex para pesquisa de transcritos *BCR::ABL1*.

A identificação do tipo de transcrito é essencial para posterior monitorização do tratamento com inibidores (TKIs). A monitorização dos transcritos *BCR::ABL1* é realizada por PCR em Tempo Real Quantitativo, de acordo com as recomendações da EAC [92] e os critérios da ELN 2020 [11]. São realizadas no laboratório, em média, 850 monitorizações dos transcritos *BCR::ABL1* por ano.

Para a quantificação dos transcritos *BCR::ABL1* por PCR em Tempo Real Quantitativo são utilizadas reações diferentes consoante o tipo de transcrito. Além disso, é realizada, em paralelo, a reação para o gene controlo *ABL1* (Figura 22).

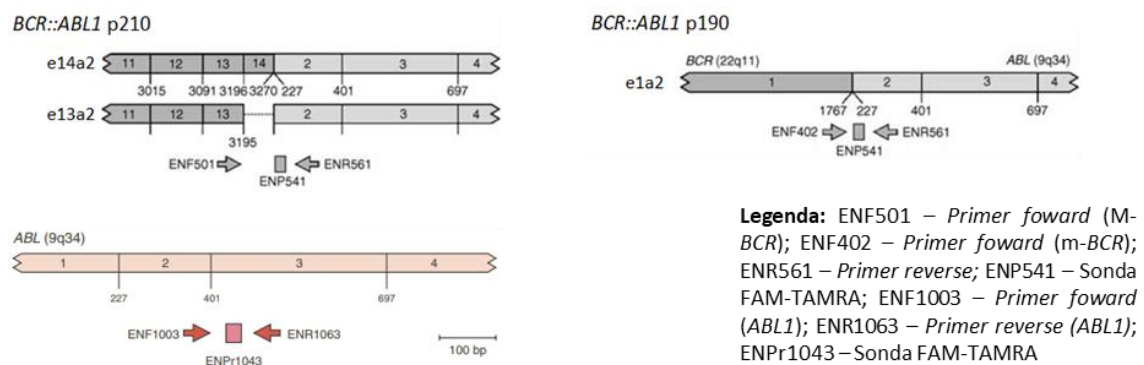


Figura 22 – Representação dos *primers* e sonda para a reação de PCR em Tempo Real Quantitativo do *BCR::ABL1*. Adaptado de [92], [93].

Sendo um PCR quantitativo é essencial a utilização de calibradores (*ipsogen Standards – QIAGEN*) para o gene *ABL1* (10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 cópias) e do transcrito *BCR::ABL1* (10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias), gerando curvas padrão com base em quantidades conhecidas.

Para cada amostra são efetuadas reações em duplicado para o *ABL1* e em triplicado para o *BCR::ABL1* (Figura 23).

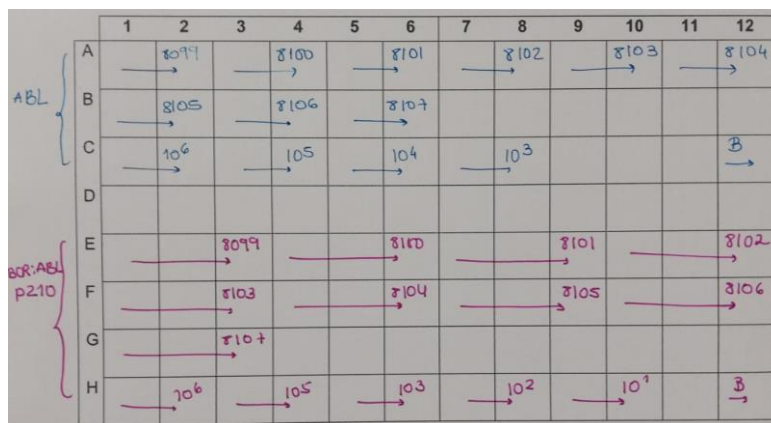


Figura 23 – Exemplo do desenho da placa para a monitorização do transcrito p210.

A partir das médias de C_t do $BCR::ABL1$ e $ABL1$ é calculada, para cada amostra, o número de cópias a partir da respetiva reta de calibração. Os resultados são dados em percentagem de acordo com:

$$N^\circ \text{ cópias } BCR::ABL1 / N^\circ \text{ cópias } ABL1 \times IS^* \times 100$$

*IS – o valor da escala internacional é específico de cada laboratório

Abaixo estão apresentados 2 casos de monitorização da doença residual mínima (Tabela VI) em que, de acordo com os critérios estabelecidos pela ELN 2020 [11], os doentes não mantiveram uma resposta molecular ótima para os *time-points* estabelecidos. Nestas situações, é efetuada a pesquisa de mutações no domínio tirosina cinase do gene $ABL1$ ($BCR::ABL1$ KD) antes da alteração do inibidor.

Tabela VI – Exemplos da monitorização da doença residual mínima na LMC.

	<i>Time-point</i>	% $BCR::ABL1$ IS	Avaliação de resposta (ELN)
Caso 1	3 Meses	7.60	Ótima
	6 Meses	1.15	Ótima/Alerta
	12 Meses	2.32	Falha
Caso 2	3 Meses	14.9	Alerta
	6 Meses	0.94	Ótima
	12 Meses	1.15	Alerta

IS – International Scale; ELN – European Leukemia Net

A pesquisa de mutações *BCR::ABL1* KD é efetuada em cDNA, sendo utilizada uma estratégia de PCR Nested (Figura 24). A primeira reação tem como objetivo amplificar o transcrito *BCR::ABL1*, com um *primer* a 5' no gene *BCR* e outro a 3' no gene *ABL1*, e a segunda reação amplifica apenas o domínio tirosina cinase do gene *ABL1*.

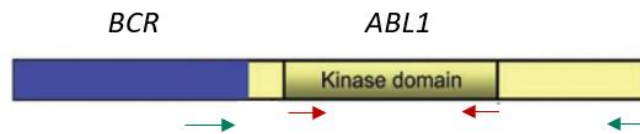


Figura 24 – Representação da localização dos *primers* utilizados no PCR Nested. Os *primers* externos (setas verdes) são colocados nos genes *BCR* e *ABL1* do gene de fusão e os *primers* internos (setas vermelhas) amplificam o domínio tirosina cinase do gene *ABL1*. Adaptado de [94].

Os produtos de PCR são visualizados em gel de agarose (2%) para posterior Sequenciação de Sanger. O produto de PCR é submetido a uma purificação com a enzima *ExoSAP-IT* (*ThermoFisher*) e são realizadas duas reações de sequenciação utilizando o *BigDye™ Terminator v1.1 Sequencing Kit* (*ThermoFisher*), de modo a cobrir todo o domínio tirosina cinase. Após a sequenciação, as sequências são analisadas no *Chromas* e alinhadas com a sequência de referência em cDNA do gene *ABL1*.

Na Figura 25 estão representados parte dos eletroferogramas dos casos 1 e 2 (Tabela VI), em que no caso 2 foi identificada a mutação *BCR::ABL1* T315I (c.944C>T, p.Thr315Ile).

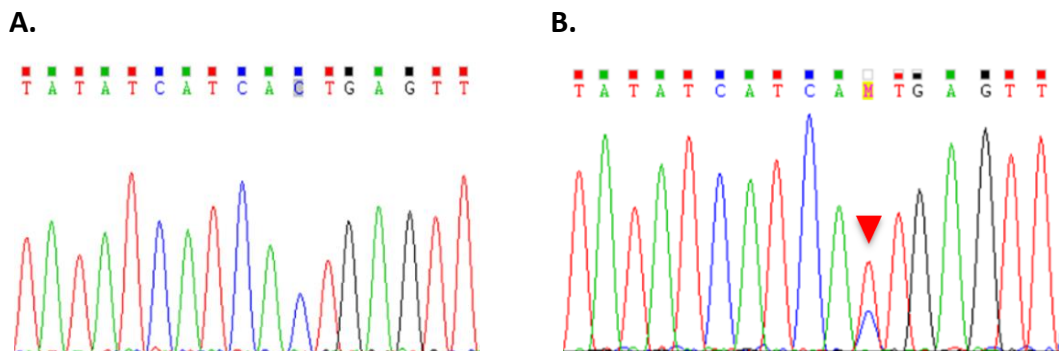


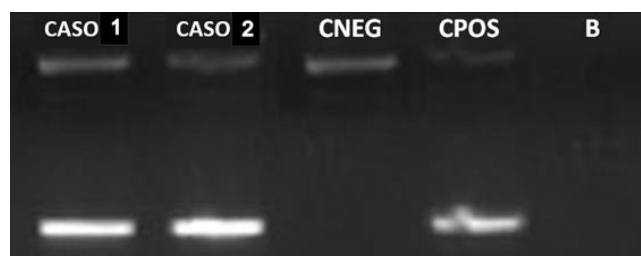
Figura 25 – Eletroferogramas da Sequenciação de Sanger para pesquisa de mutações *BCR::ABL1* KD. (A) Caso 1 sem mutação; (B) Caso 2 com a mutação *BCR::ABL1* T315I.

Estão descritas mais de 80 mutações *BCR::ABL1* que conferem diferentes graus de resistência aos inibidores (Figura 26), sendo que a mutação *BCR::ABL1* T315I, em

particular, confere resistência a todos os TKIs com a exceção do Ponatinib. Por este motivo, e sendo a mutação mais “agressiva”, é realizada, em paralelo com a Sequenciação de Sanger, uma estratégia de ASO-PCR para a detecção da mutação pontual *BCR::ABL1* T315I. Esta estratégia permite uma detecção mais precoce da mutação, uma vez que apresenta maior sensibilidade em comparação com Sequenciação de Sanger. Um exemplo desta situação é o caso 1, onde por ASO-PCR foi identificada a mutação *BCR::ABL1* T315I (Figura 27), tendo sido negativa na Sequenciação de Sanger (Figura 25A).

		IC50-fold increase (WT = 1)				
		Imatinib	Bosutinib	Dasatinib	Nilotinib	Ponatinib
P-loop	Parental	10.8	38.3	568.3	38.4	570.0
	WT	1	1	1	1	1
	M244V	0.9	0.9	2.0	1.2	3.2
	L248R	14.6	22.9	12.5	30.2	6.2
	L248V	3.5	3.5	5.1	2.8	3.4
	Q250E	6.9	4.3	4.4	4.6	6.0
	Q252H	1.4	0.8	3.1	2.6	6.1
	Y253F	3.6	1.0	1.6	3.2	3.7
	Y253H	8.7	0.6	2.6	36.8	2.6
	E255K	6.0	9.5	5.6	6.7	8.4
C-helix	E255V	17.0	5.5	3.4	10.3	12.9
	D276G	2.2	0.8	1.4	2.0	2.1
	E279K	3.6	1.0	1.6	2.0	3.0
	E292L	0.7	1.1	1.3	1.8	2.0
ATP binding region	V299L	1.5	26.1	8.7	1.3	0.6
	T315A	1.7	6.0	58.9	2.7	0.4
	T315I	17.5	45.4	75.0	39.4	3.0
	T315V	12.2	29.3	738.8	57.0	2.1
	F317L	2.6	2.4	4.5	2.2	0.7
SH2-contact	F317R	2.3	33.5	114.8	2.3	4.9
	F317V	0.4	11.5	21.3	0.5	2.3
	M343T	1.2	1.1	0.9	0.8	0.9
	M351T	1.8	0.7	0.9	0.4	1.2
	F359I	6.0	2.9	3.0	16.3	2.9
Substrate binding region	F359V	2.9	0.9	1.5	5.2	4.4
	L384M	1.3	0.5	2.2	2.3	2.2
A-loop	H396P	2.4	0.4	1.1	2.4	1.4
	H396R	3.9	0.8	1.6	3.1	5.9
	F486S	8.1	2.3	3.0	1.9	2.1
C-terminal lobe	L248R + F359I	11.7	39.3	13.7	96.2	17.7
Sensitive		≤ 2				
Moderately resistant		2.1–4				
Resistant		4.1–10				
Highly resistant		≥ 10				

Figura 26 – Atividade dos inibidores TKI contra mutações *BCR::ABL1* KD. Adaptado de [95].



Legenda:
 CNEG – controlo negativo
 CPOS – controlo positivo
 B – branco

Figura 27 – Resultados do ASO-PCR para a mutação *BCR::ABL1* T315I.

Em ambos os casos foi identificada a mutação *BCR::ABL1* T351I, pelo que foi recomendada a mudança da terapêutica para o inibidor Ponatinib.

4.1.2. Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária

O diagnóstico molecular das neoplasias mieloproliferativas Ph-negativa é realizado em DNA de sangue periférico ou medula óssea. É utilizado um algoritmo de estudo para a identificação das alterações genéticas que tem em conta a suspeita do diagnóstico e as mutações mais frequentes (Figura 28). Anualmente, são estudadas, em média, 1270 amostras para diagnóstico molecular destas neoplasias.

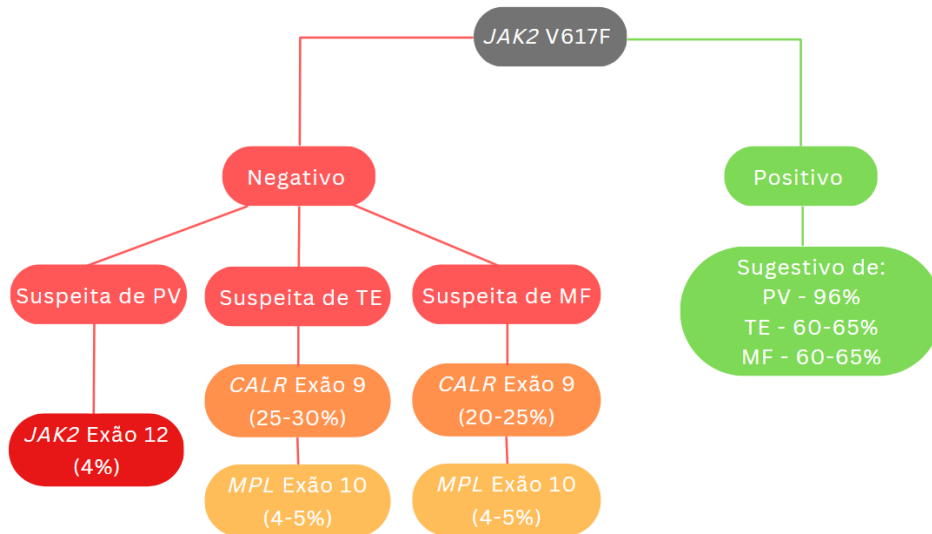


Figura 28 – Algoritmo de estudo das neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas.

A mutação *JAK2* V617F (c.1849G>T, p.Val617Phe) é a mais frequente nestas neoplasias, sendo realizada em todos os doentes por ASO-PCR multiplex. A reação está desenhada para que ambos os alelos (alelo *wild-type* e alelo com mutação) amplifiquem na mesma reação (Figura 29).

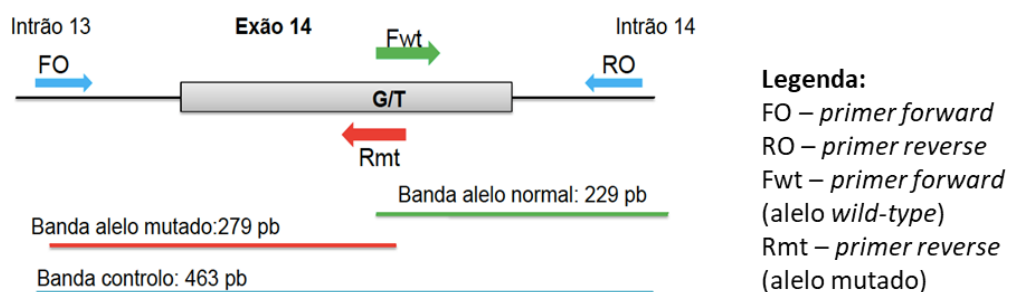


Figura 29 – Desenho da reação ASO-PCR multiplex para a mutação *JAK2* V617F.

Os resultados são visualizados em eletroforese em gel de agarose (2%). Amostras positivas para a mutação *JAK2* V617F têm duas bandas, a de menor tamanho corresponde ao alelo *wild-type* e a mais pesada ao alelo com a mutação (Figura 30). A banda de controlo interno da reação deve estar presente em todas as amostras. É utilizado um controlo positivo (com frequência alélica de 1%) e negativo para a mutação *JAK2* V617F.

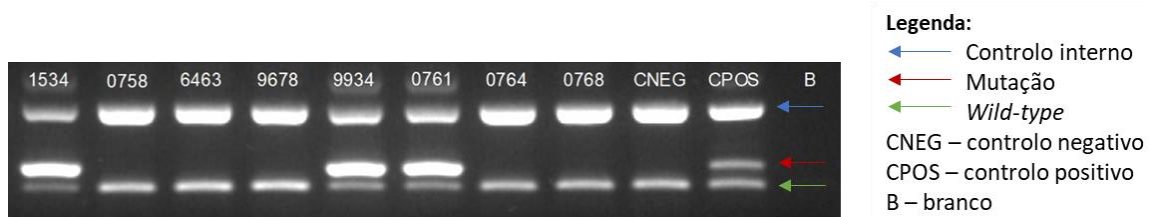


Figura 30 – ASO-PCR multiplex para pesquisa da mutação *JAK2* V617F.

O resultado é dado como não detetado ou positivo. Nos casos em que na região da banda do alelo mutado parece existir uma amplificação de baixa intensidade, recorre-se ao PCR em Tempo Real para a confirmação do resultado. Em alguns doentes com mutação *JAK2* V617F é monitorizada a frequência alélica por PCR em Tempo Real.

Para a quantificação da mutação *JAK2* V617F são realizadas duas reações em separado: uma para o alelo *wild-type* e outra para o alelo mutado. Os constituintes das reações encontram-se na Tabela VII e para cada amostra e controlos (positivo e negativo) são efetuadas reações em duplicado (Figura 31).

Tabela VII – Constituintes das reações.

Constituintes
Master Mix
H ₂ O
Primer forward
Primer reverse (wt ou mut)
Sonda FAM-TAMRA
Amostra de DNA

wt – *wild-type*; mut – mutado

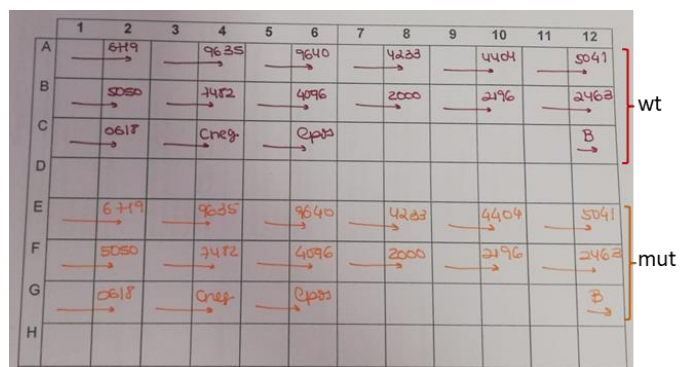


Figura 31 – Exemplo do desenho da placa para a quantificação da mutação *JAK2* V617F.

A quantificação é baseada no método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os resultados são dados em percentagem de acordo com:

N° cópias alelo mutado / (N° cópias alelo *wild-type* + N° cópias alelo mutado) X 100

Resultados com um valor superior a 1% são dados como positivos, o que é sugestivo de uma neoplasia mieloproliferativa. No entanto, é necessária a correlação com outros dados clínico-laboratoriais para o diagnóstico diferencial de PV, TE ou MF.

Nas amostras em que não foi detetada a mutação *JAK2* V617F, e de acordo com a informação clínica, são pesquisadas mutações no *JAK2* (Exão 12), *CALR* (Exão 9) e *MPL* (Exão 10) conforme o algoritmo de estudo da Figura 28. A estratégia utilizada no laboratório para a pesquisa destas mutações é a Sequenciação de Sanger, uma vez que as mutações podem ocorrer em diferentes posições e, na sua maioria, são do tipo inserções e deleções, à exceção do *MPL* (Figura 32). Uma vez que se trata de mutações somáticas clonais, é essencial ter uma sequência limpa de *background*. Excepcionalmente, poderão ocorrer mutações de baixa frequência alélica que não são detetadas por Sequenciação de Sanger e são posteriormente identificadas por NGS.

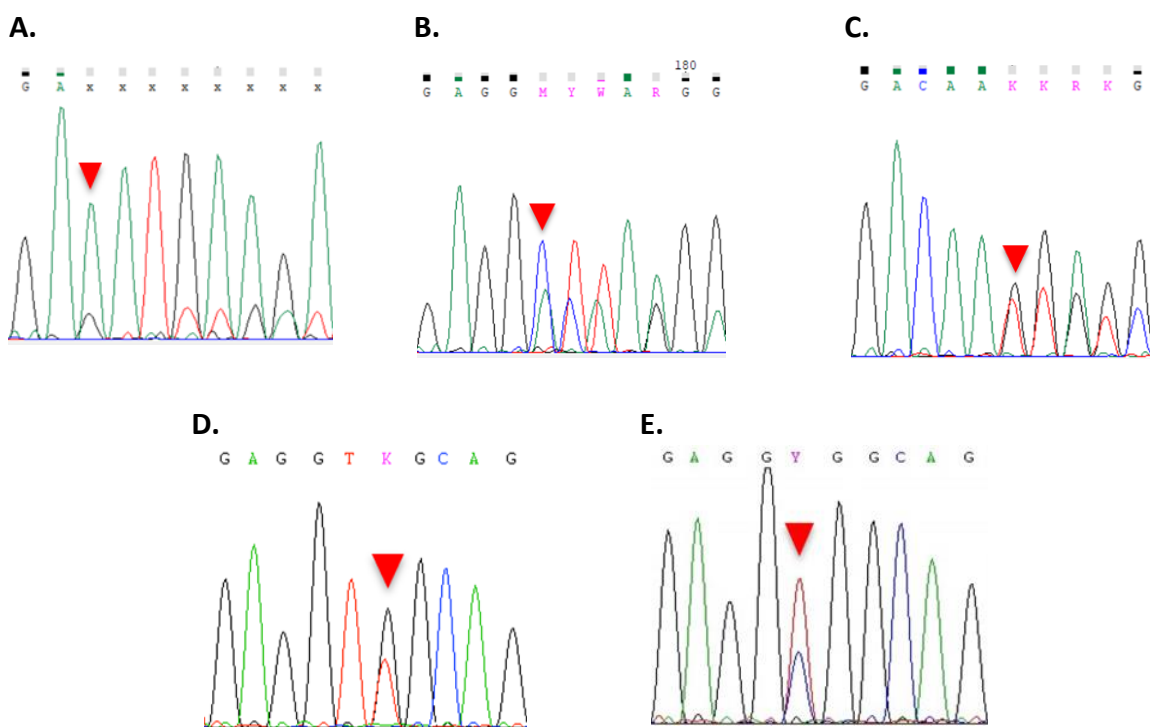


Figura 32 – Exemplos de mutações no *JAK2* (Exão 12), *CALR* (Exão 9) e *MPL* (Exão 10).

(A) NM_004972.4(*JAK2*):c.1624_1629del, p.Asn542_Glu543del;

(B) NM_004343.4(*CALR*):c.1099_1150del, p.Leu367Thrfs*46 – mutação *CALR* Tipo 1;

(C) NM_004343.4(*CALR*):c.1154_1155insTTGTC, p.Lys385Asnfs*47 – mutação *CALR* Tipo 2;

(D) NM_005373.3(*MPL*):c.1544G>T, p.Trp515Leu;

(E) NM_005373.3(*MPL*):c.1543T>C, p.Trp515Arg.

As mutações no gene *CALR*, em neoplasias mieloproliferativas, têm a particularidade de alterar o domínio C-terminal da proteína mutante, tornando-o mais longo. Consoante a proteína mutante mantém determinados domínios, as mutações são classificadas em mutações *CALR* Tipo 1, Tipo 2 ou Outro tipo (Figura 33).

Mutation	aa change	Protein	
Type 5	E364G-L367fs*46	AAEKQMKDKDEGQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	Type 1-like mutations (stretch II and III deleted)
Type 37	E364fs*55	AAEKQMKDKDEDKRRRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 6	Q365fs*50	AAEKQMKDKDEEHRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 1	L367fs*46	AAEKQMKDKDEEQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 3	L367fs*48	AAEKQMKDKDEEQRRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 13	L367fs*52	AAEKQMKDKDEEQRRRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 38	K368fs*45	AAEKQMKDKDEEQRLRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 16	K368fs*51	AAEKQMKDKDEEQRLRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 4	K368fs*51	AAEKQMKDKDEEQRLRRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 18	E369fs*44	AAEKQMKDKDEEQRLKRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 8	E369fs*50	AAEKQMKDKDEEQRLKRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 17	E369fs*50	AAEKQMKDKDEEQRLKRRQWTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 15	K368fs*51	AAEKQMKDKDEEQRLRRRETRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 39	E371fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEERTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 57	E372fs*48	AAEKQMKDKDEEQRLKEEQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 54	D373fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEERTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 42	D373fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEERTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 21	D373fs*50	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEAQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 20	D373fs*51	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEEGQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 22	K374fs*55	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQAKRRRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 55	K375fs*55	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQAKRRRRQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 40	E371D+K375fs*49	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 28	E378fs*45	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 9	E381fs*49	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEERQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 51	E383fs*48	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 32	K385fs*46	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 2	K385fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 10	K385fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 33	E386fs*46	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 34	E385fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 35	K385fs*47	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
Type 36	E386fs*46	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	
	Wildtype sequence	AAEKQMKDKDEEQRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA-	

I II III
Negatively charged amino acid stretches

Figura 33 – Tipo de mutações no gene *CALR*. Retirado de [96].

Perante uma mutação no gene *CALR*, e com recurso ao *software Mutalyzer*, para além de confirmar a nomenclatura, é determinada a sequência aminoacídica, de modo a classificar o tipo de mutação. Na Figura 34 estão representados exemplos de mutações *CALR* com a respetiva proteína mutante.

<p>NM_004343.4(NP_004334.1):p.(Leu367Thrfs*46)</p> <p>AFFECTED PROTEIN PREDICTED SEQUENCE</p> <pre>MLLSVPLLLGLLGLAVAEPVYFKEQFLDGDGWTSRWIESKHKSDFGKFLVSSGKFGYDEEKDKGLQTSQDARFYALSASFEPFSNGQTL VVQFTVKHEQNIIDCGGGVYKLPNSLDQTDHMGDSEYNIMFGPDICGGPKKVVHIFNYKGNVLIINKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTY EVKIDNSQVESGSLDDWDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPDTSKPEDWDKPEHIPDPDAKPEDWDEEMDGEWEPPIQNPYK ENKPRQIDNPYKGTWIHPEIDNPEYSPDPSIYAYDNFVGLGLDLWQVSGTIFDNFLITNDEAYAEFGNETWGVTKAAEKQMKDKDEE QRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA*</pre>
<p>NM_004343.4(NP_004334.1):p.(Lys385Asnfs*47)</p> <p>AFFECTED PROTEIN PREDICTED SEQUENCE</p> <pre>MLLSVPLLLGLLGLAVAEPVYFKEQFLDGDGWTSRWIESKHKSDFGKFLVSSGKFGYDEEKDKGLQTSQDARFYALSASFEPFSNGQTL VVQFTVKHEQNIIDCGGGVYKLPNSLDQTDHMGDSEYNIMFGPDICGGPKKVVHIFNYKGNVLIINKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTY EVKIDNSQVESGSLDDWDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPDTSKPEDWDKPEHIPDPDAKPEDWDEEMDGEWEPPIQNPYK ENKPRQIDNPYKGTWIHPEIDNPEYSPDPSIYAYDNFVGLGLDLWQVSGTIFDNFLITNDEAYAEFGNETWGVTKAAEKQMKDKDEE QRLKEEEDQKRRKEEEDQRTRRRMRRTKMRMRMRRTTRKMRKMSPARPRTSCREACLGWTEA*</pre>

Figura 34 – Exemplos de mutações *CALR* Tipo 1 e Tipo 2.

Em doentes com Mielofibrose Primária, a caracterização molecular vai além da identificação da mutação *driver* (*JAK2*, *CALR*, *MPL*), uma vez que mutações adicionais nos genes *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1* e *TP53* são integradas em *scores* moleculares com impacto prognóstico e decisão terapêutica. A avaliação destas mutações é efetuada por NGS com o Painel Mielóide.

4.2. LMA – Pesquisa de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* (ITD e TKD)

No laboratório, o diagnóstico molecular de uma LMA inicia-se com a pesquisa de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* em DNA.

As mutações no gene *NPM1* são inserções de 4 pares de bases, sendo a mais frequente a inserção TCTG (Tipo A), seguida da inserção CATG (Tipo B) e da inserção CCTG (Tipo D) (Figura 35). O conhecimento do tipo de inserção é fundamental para definir a reação de PCR em Tempo Real Quantitativo para posterior avaliação da doença residual mínima.

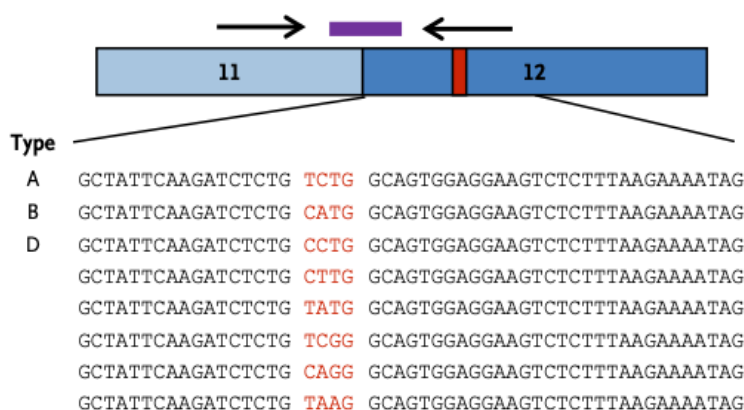


Figura 35 – Exemplos de inserções identificadas no gene *NPM1*. Adaptado de [97].

As mutações no gene *FLT3* podem ser duplicações internas em *tandem* (*FLT3*-ITD), mais frequentes, ou mutações pontuais no domínio tirosina cinase (*FLT3*-TKD). Estas mutações constituem um alvo terapêutico com inibidores *FLT3*. Adicionalmente, a mutação *FLT3*-ITD é também considerada para a estratificação de risco da ELN AML 2022 [25].

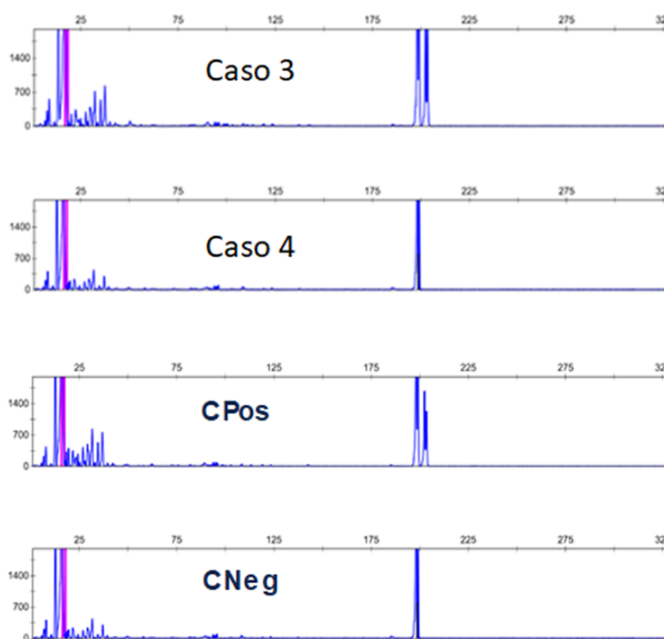
A pesquisa de mutações no gene *NPM1* e *FLT3*-ITD é realizada por PCR/Análise de fragmentos e o *screening* de mutações *FLT3*-TKD por HRM. Os resultados do *FLT3*

(ITD e TKD) deverão estar disponíveis até 48-72h após o diagnóstico, uma vez que é critério para introdução de inibidores FLT3 ao esquema de quimioterapia.

LMA-CASO 3 e LMA-CASO 4: Pesquisa de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* (*FLT3*-ITD e *FLT3*-TKD)

Quando dão entrada no laboratório amostras com diagnóstico de LMA, é imediatamente extraído o DNA e realiza-se, em simultâneo, a pesquisa de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3*-ITD por PCR/Análise de fragmentos, com o *primer forward* marcado com fluorescência. A eletroforese capilar é realizada no *ABI 3130 Genetic Analyzer* ou no *SeqStudio Genetic Analyzer* na presença de marcador de peso molecular (*GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard – ThermoFisher*) e formamida e os resultados analisados no *GeneMapper* (Figura 36).

A.



	Pico	Tamanho (pb)
Caso 3	1	199,8
	2	203,9
Caso 4	1	199,7
CPOS	1	200
	2	204
CNEG	1	199

B.

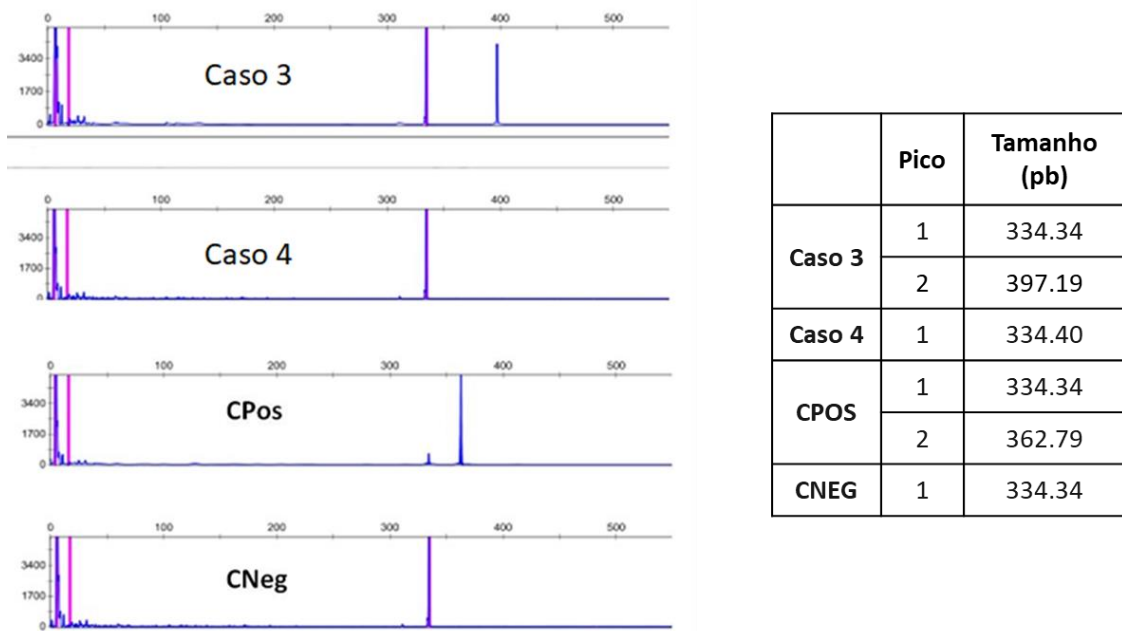


Figura 36 – Resultados da análise de fragmentos para pesquisa de mutações no gene *NPM1* (A) e *FLT3*-ITD (B) nos casos 3 e 4, em conjunto com dois controles (CPos – controle positivo; CNeg – controle negativo).

Os resultados da análise de fragmentos permitiram identificar no caso 3 uma inserção de 4 pares de bases no *NPM1* (Figura 36A) e a pesquisa de mutações *FLT3*-ITD revelou uma inserção de 63 pares de bases (Figura 36B). O caso 4 foi negativo para as mutações *NPM1* e *FLT3*-ITD.

Posteriormente, no caso 3, a mutação *NPM1* foi caracterizada por Sequenciação de Sanger de modo a determinar o tipo de inserção para a avaliação da doença residual mínima por PCR em Tempo Real Quantitativo. Neste caso foi identificada a mutação *NPM1* c.863_864insCCTG, p.Trp288fs, denominada mutação do Tipo D (Figura 37).

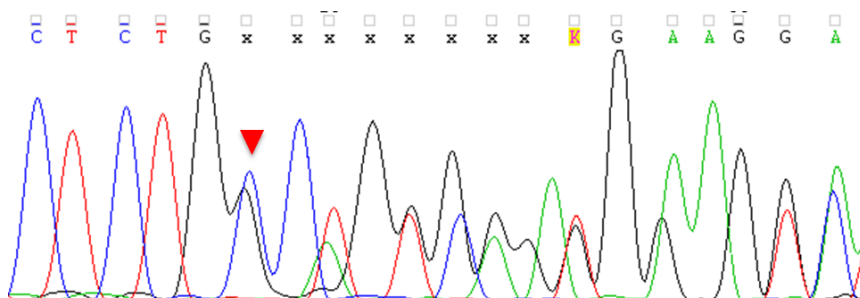


Figura 37 – Eletroferograma da Sequenciação de Sanger do caso 3. Foi identificada a mutação NM_002520.7(*NPM1*):c.863_864insCCTG, p.Trp288fs, denominada mutação do Tipo D.

Paralelamente é também realizado o *screening* de mutações *FLT3*-TKD por HRM, em que são incluídos 3 controlos negativos e 1 controlo positivo (Figura 38).

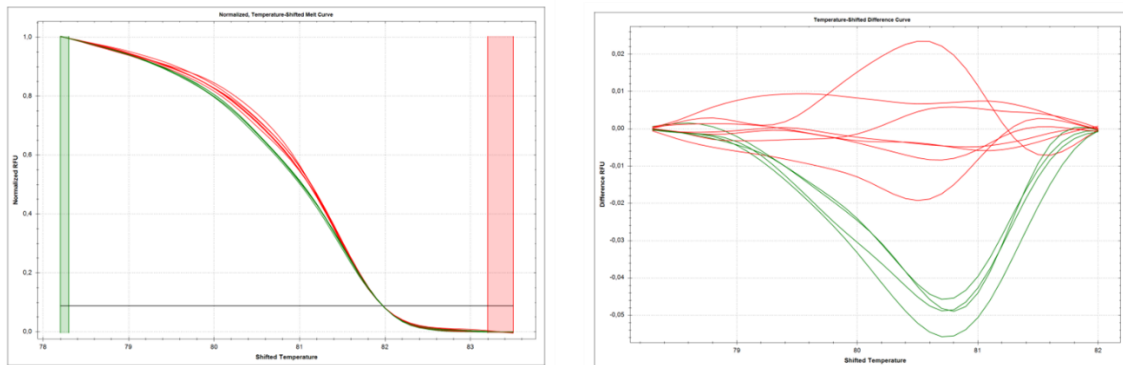


Figura 38 – Resultados do *screening* de mutações no domínio tirosina cinase do gene *FLT3*. As curvas vermelhas correspondem aos controlos negativos e na curva verde está o controlo positivo. A amostra do caso 3 tem um perfil de *melting* sobreponível aos controlos negativos, enquanto que a amostra do caso 4 tem um perfil diferente e sobreponível ao controlo positivo.

Através da comparação do perfil de *melting* observou-se que, no caso 4, o perfil de *melting* é diferente dos controlos negativos, o que é indicativo da presença de uma mutação *FLT3*-TKD. O resultado do HRM foi negativo para *FLT3*-TKD no caso 3.

No caso 4, a mutação *FLT3*-TKD foi caracterizada por Sequenciação de Sanger, que revelou a presença da mutação pontual *FLT3* c.2503G>T, p.Asp835Tyr (Figura 39).

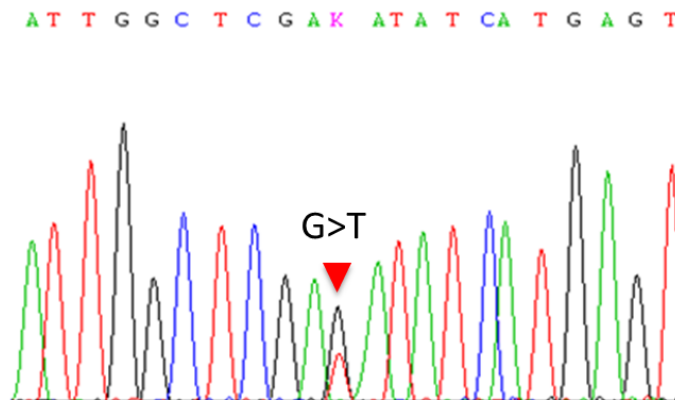


Figura 39 – Eletroferograma da Sequenciação de Sanger do caso 4. Foi identificada a mutação pontual NM_004119.3(*FLT3*): c.2503G>T, p.Asp835Tyr.

Resultados LMA-CASO 3: *NPM1* positivo e *FLT3*-ITD positivo

No caso 3, a identificação da mutação *NPM1* permitiu a classificação da LMA de acordo com os critérios da WHO 2022 [3], em LMA com mutação *NPM1* (Tipo D). A presença de mutação *FLT3*-ITD confere um alvo terapêutico para inibidor FLT3 e estratifica este doente em risco intermédio de acordo com a ELN AML 2022 [25]. Nas LMAs-*NPM1* está recomendada a monitorização da doença residual mínima por PCR em Tempo Real Quantitativo.

Resultados LMA-CASO 4: *NPM1* negativo e *FLT3*-TKD positivo

O caso 4 foi negativo para as mutações *NPM1* e *FLT3*-ITD, tendo sido identificada, por HRM, uma mutação *FLT3*-TKD que constitui um alvo terapêutico para inibidores FLT3, posteriormente caracterizada por Sequenciação de Sanger (*FLT3* c.2503G>T, p.Asp835Tyr).

Para a classificação da LMA do caso 4 foi necessária a pesquisa de translocações/rearranjos por cariótipo, FISH e/ou biologia molecular e de mutações por painel de NGS Mielóide.

Em ambos os casos, é necessário o estudo por painel de NGS Mielóide para complementar o estudo genético recomendado na estratificação de risco da ELN AML 2022 [25].

4.3. Aplicações MLPA

No laboratório, o MLPA é utilizado como metodologia complementar ao estudo de Síndromes de Falência Medular congénitos e na Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) B da criança para estratificação de risco. A aplicação do MLPA na LLA-B ou noutras leucemias requer uma infiltração por células leucémicas >35%.

São utilizadas as Probemix *SALSA MLPA Probemix P437 Familiar MDS-AML* e *SALSA MLPA Probemix P335 ALL-IKZF1*, comercializadas pela *MRC Holland* e os procedimentos realizados de acordo com as instruções do fornecedor. Adicionalmente às amostras em estudo são incluídas 3 amostras controlo.

Os resultados do MLPA são analisados no *Coffalyser* (Figura 40). Em relação ao eletroferograma, a presença de uma CNV é visualizada por diferenças na altura dos picos

e, no caso da normalização dos rácios, o valor destes poderá revelar CNVs em heterozigotia ou homozigotia.

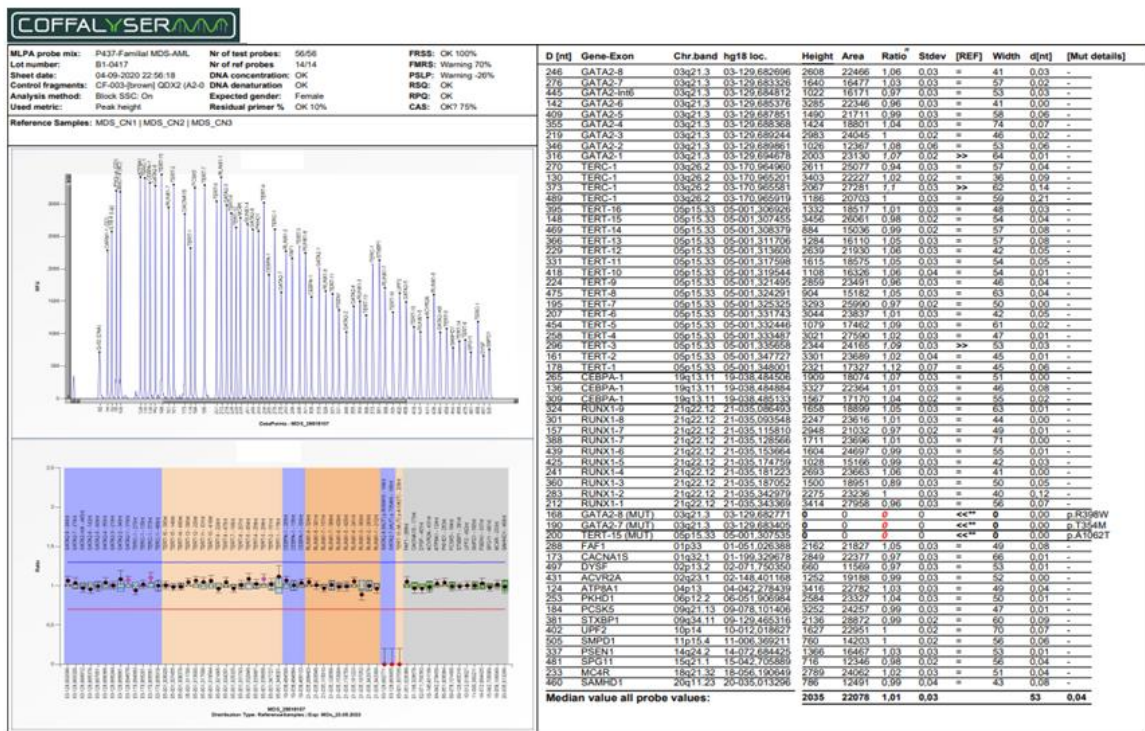


Figura 40 – Exemplo da representação dos resultados do MLPA para o SALSA MLPA Probemix P437 Familiar MDS-AML no Coffalyser.

Anualmente, em média, são estudadas 30 amostras para o SALSA MLPA Probemix P437 Familiar MDS-AML e 10 amostras do SALSA MLPA Probemix P335 ALL-IKZF1.

4.4. Aplicações NGS

A abordagem por painel de genes de NGS permite, num só estudo, uma caracterização genética mais completa e menos morosa quando comparada com uma abordagem sequencial gene a gene.

A UFHM utiliza a química AmpliSeq e dispõe de um equipamento de NGS ION S5 (ThermoFisher). No sector de Hemato-Oncologia são utilizados 2 painéis de genes customizados – Painel Mielóide e Painel de Síndromes de Falência Medular (Tabela VIII) e 2 painéis comerciais para o gene TP53 e para o estudo da hipermutação somática da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV).

Para a visualização e anotação de variantes são utilizados os softwares IGV e IonReporter (ThermoFisher). São, também, consultadas bases de dados como o

Varsome, ClinVar, COSMIC e gnomAD para pesquisa de informação adicional, sendo a classificação de variantes realizada de acordo com os critérios da ACMG [83].

O elevado número de variantes genéticas identificadas por NGS levou à necessidade de estabelecer recomendações para a interpretação e a forma como as variantes são reportadas. As *guidelines* da American College of Medical Genetics (ACMG) estabelecem 5 níveis de patogenicidade de acordo com a probabilidade de uma variante estar associada à doença: benigna, provavelmente benigna, significado incerto (VUS), provavelmente patogénica e patogénica. Variantes benignas e provavelmente benignas não são reportadas [83].

Tabela VIII – Genes dos painéis customizados de Hemato-Oncologia.

Painel	Genes
Mielóide	<i>ASXL1 (ex.12), BCOR (full), BRAF (ex.15), CALR (ex.9), CBL (ex. 8,9,12), CEBPA (full), CSF3R (ex. 14-17), CUX (full), ETNK1 (ex.3), ETV6 (full), EZH2 (full), FLT3 (ex. 14,16,21), GATA1 (full), GATA2 (full), IDH1 (ex. 4), IDH2 (ex.4), JAK1 (full), JAK2 (full), JAK3 (full), KDM6A (full), KIT (ex. 8,10,11,13,17), KMT2A (full), KRAS (ex. 2-3), MPL (full), NPM1 (ex.1), NRAS (ex. 2-3), PDGFRA (ex. 12-21), PHF6 (full), PTEN (ex. 5-8), PTPN11 (ex. 3, 13), RAD2 (full), RUNX1 (full), SETBP1 (ex. 4), SF3B1 (full), SH2B3 (full), SMC3 (full), SRSF2 (full), STAG2 (full), TET2 (full), THPO (full), TP53 (full), U2AF1 (full), WT1 (ex. 7,9), ZRSR2 (full)</i>
Síndromes de Falência Medular	<i>ACD, AK2, ANKRD26 5UTR, AP3B1, ATG2B, CD40LG, CEBPA, CECR1 (ADA2), CSF3R, CTC1, CTLA4, CXCR2, CXCR4, DDX41, DKC1, DNAJC21 (HSP40), EFL1, ELANE, ERCC6L2, ETV6, G6PC3, GATA1, GATA2 (+intrao 5), GFI1, GSKIP, HAX1, HLTf (SMARCA3), HOXA11, IKZF1, JAGN1, KLF1, LAMTOR2, LIG4, LYST, MECOM (EVI1), MPL, MYSM1, NAF1, NF1, NHP2, NOP10, OBF1 (STN1), PARN, POT1, RAB27A, RAC2, RBBP6, RBM8A (+UTR+ Intrao1), RMRP (+UTR), RPA1, RPL11, RPL15, RPL17, RPL18, RPL19, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35, RPL35A, RPL5, RPL9, RPS10, RPS14, RPS17, RPS19, RPS20, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29, RPS7, RPS8, RRAS, RTEL1, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SBDS, SLC37A4, SMARCA2, SMARCD2, SRP54, SRP72, STK4, TAZ, TCIRG1, TERC(+UTR), TERT(+UTR), THPO, TINF2, TP53, TPP1, TSR2, USB1 (C16orf57), VPS13B, VPS45, WAS, WIPF1, WRAP53 (TCAB1)</i>

O Painel Mielóide é utilizado desde 2015 para caracterização de alterações genéticas somáticas em Neoplasias Mieloproliferativas, SMD, LMC atípica, Leucemia Mielomonocítica e LMA. O uso do painel tem como objetivo a classificação, estratificação de risco e identificação de alvos terapêuticos. A análise dos resultados tem em consideração a cobertura média vertical, que deverá ser >2000x, uniformidade >95% e um *cut-off* de 5% para reportar as mutações. Anualmente, são realizados, em média, 270 painéis.

O painel de Síndromes de Falência Medular foi desenhado em 2019 de modo a melhorar a abordagem ao estudo destas patologias caracterizadas por insuficiência medular congénita/síndromes de predisposição e distingui-las das formas adquiridas. A análise dos resultados tem em consideração a cobertura média vertical, que deverá ser >500x, uniformidade >95%, cobertura média horizontal 20x >99%. Em média são estudados 96 painéis/ano.

Tanto o Painel Mielóide como o Painel de Síndromes de Falência Medular incluem genes onde estão descritas variantes germinativas e somáticas, nomeadamente nos genes *RUNX1*, *ETV6*, *GATA2*, *CEBPA* e *TP53*. Nestas situações, sempre que é identificada uma variante com uma VAF (*Variant Allele Frequency*) entre 40-60% é necessária a confirmação da variante em amostra de linha não-hematopoiética, sendo solicitado amostra de raiz de cabelo ou *swab*.

Durante o estágio tive oportunidade de acompanhar todo o processo de execução de NGS até à análise e integração dos resultados, tendo sido introduzido um novo painel de NGS para genes de fusão – RNA *Oncomine Myeloid Research Assay*, que inclui 29 genes-*driver* essencialmente de linhagem mielóide (Figura 41) [98]. Tive a oportunidade de acompanhar casos em que foi necessária a confirmação em linha não-hematopoiética ou a realização de estudos familiares.

Genes-<i>driver</i> de fusão	<i>ABL1, ALK, BCL2, BRAF, CCND1, CREBBP, EGFR, ETV6, FGFR1, FGFR2, FUS, HMGA2, JAK2, KMT2A, (MLL), MECOM, MET, MLLT10, MLLT3, MYBL1, MYH11, NTRK3, NUP214, PDGFRA, PDGFRB, RARA, RBM15, RUNX1, TCF3, TFE3</i>
---	---

Figura 41 – Genes-*driver* de fusão do painel de NGS de RNA.

4.4.1. Painel de RNA-Seq para genes de fusão (*Oncomine Myeloid Research Assay*)

O painel é composto, apenas, por 1 *pool* de *primers*, tendo a vantagem de utilizar o mesmo *workflow* de NGS dos painéis de DNA, permitindo a sua combinação com os restantes painéis.

Num primeiro ensaio foram estudadas 13 amostras de cDNA, das quais 5 amostras tinham translocações recorrentes conhecidas: *BCR::ABL1* p190,

RUNX1::RUNX1T1, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *KMT2A::MLLT3*, que foram identificadas corretamente juntamente com os seus pontos de quebra (Tabela IX), tal como representado no exemplo da Figura 42 para o gene de fusão *BCR::ABL1*, identificando os locais de quebra b1a2 (e1a2).

Tabela IX – Representação das translocações conhecidas vs. Painel RNA *Oncomine Myeloid Research Assay*.

Translocações conhecidas	Painel
<i>t(9;22) BCR::ABL p190</i>	<i>BCR(1)::ABL1(2)</i>
<i>t(8;21) RUNX1::RUNX1T1</i>	<i>RUNX1(3)::RUNX1T1(3)</i>
<i>inv(16) CBFB::MYH11</i>	<i>CBFB::MYH11.C5M33</i>
<i>t(15;17) PML::RARA (bcr3)</i>	<i>PML(3)::RARA(3)</i>
<i>t(9;11) KMT2A::MLLT3</i>	<i>KMT2A::MLLT3.K9M6</i> <i>KMT2A::MLLT3.K10M6</i>

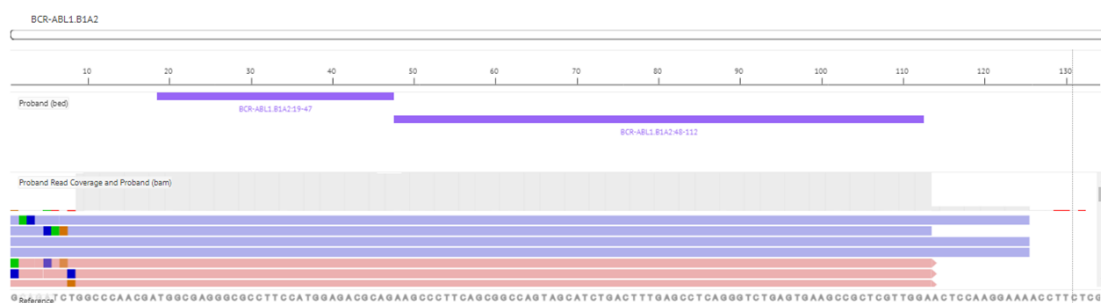


Figura 42 – Representação do alinhamento do gene de fusão *BCR::ABL1* no IGV do software *IonReporter*.

Nas restantes amostras estudadas sem alteração conhecida, numa LMA que não apresentava alterações genéticas recorrentes foi identificado o gene de fusão *ETV6::MECOM* (Figura 43). Neste caso, a identificação desta translocação permitiu a classificação da LMA em LMA com rearranjo *MECOM* e a correta estratificação de risco desfavorável de acordo com ELN AML 2022 [25].

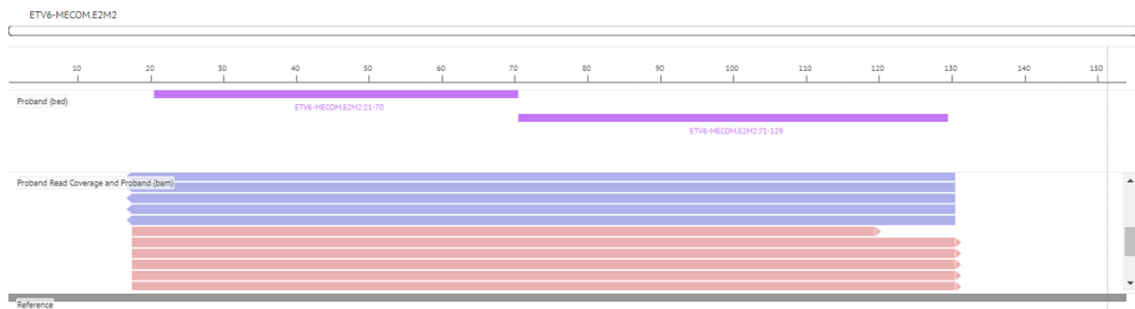


Figura 43 – Representação do alinhamento do gene de fusão *ETV6::MECOM* no IGV do *software IonReporter*.

A aplicação de uma estratégia RNA-Seq por NGS para genes de fusão é um método complementar para a identificação de translocações e rearranjos, em particular dos menos frequentes ou não identificáveis por citogenética convencional. Relativamente ao FISH tem a vantagem de, num só estudo, incluir vários genes e identificar o parceiro, podendo, nestes casos, ser desenhada uma estratégia para avaliação da doença residual mínima.

4.5. Estudos em linhagem não-hematopoiética/Estudos Familiares

Por vezes, ao efetuar o estudo genético por NGS ou Sequenciação de Sanger, são identificadas variantes em genes onde podem ocorrer mutações somáticas ou germinativas. Nestas situações, perante uma VAF de 40-60% por NGS ou uma “heterozigotia” equilibrada no eletroferograma, é necessário realizar o estudo genético dessa variante numa amostra de DNA de tecido não-hematopoiético. O facto da variante ser somática ou germinativa tem influência no diagnóstico, caracterização e acompanhamento/aconselhamento da doença.

No estágio, tive oportunidade de acompanhar o estudo de casos onde foi necessária a confirmação de variantes em linha não-hematopoiética, tendo sido utilizadas amostras de raiz de cabelo ou *swab*.

CASO 5 – 35 anos, masculino, diagnóstico de LMA, história familiar de doença hematológica

O estudo do Pannel Mielóide para caracterização da LMA identificou três variantes no gene *RUNX1* (NM_001754.5):

- c.608C>G, p.Pro203Arg, VAF 78%;
- c.328A>C, p.Lys110Gln, VAF 54%;
- c.610C>T, p.Arg204Ter, VAF 9%.

O *RUNX1* é um fator de transcrição crítico na regulação da hematopoiese e estão descritas variantes patogênicas da linha germinativa associadas a trombocitopenia e síndrome predisposição para neoplasia mielóide [99], sendo também frequentemente adquiridas/somáticas no contexto de uma neoplasia hematológica.

Neste doente, e no contexto de uma LMA, pela frequência alélica das variantes *RUNX1* (c.608C>G, p.Pro203Arg e c.328A>C, p.Lys110Gln) não é possível determinar se são adquiridas ou germinativas, tendo sido solicitada uma amostra de *swab* para confirmação da natureza das variantes. No caso da variante *RUNX1* c.610C>T, p.Arg204Ter, pela frequência alélica de 9% podemos assumir que é somática.

Foi estudada uma amostra de *swab* para determinar a natureza das variantes *RUNX1* (c.608C>G, p.Pro203Arg e c.328A>C, p.Lys110Gln) por PCR e Sequenciação de Sanger. No laboratório estava disponível a reação para o estudo da variante *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg, tendo sido necessário desenhar *primers* e otimizar a reação para o estudo da variante *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln.

O desenho dos *primers* foi realizado com recurso aos *softwares* *Primer3Plus* e *Primer-BLAST*, tendo sido escolhidos os *primers* representados na Figura 44.

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCTGTTTGCAGGGTCCTAA	20	59.23	50.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTCTCCACCCACCTCT	18	59.88	66.67	2.00	0.00


```

>NC_000021.9 Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p14 Primary Assembly
product length = 338
Features associated with this product:
  runt-related transcription factor 1 isoform x6
  runt-related transcription factor 1 isoform x6
Forward primer 1      AGCTGTTTGCAGGGTCCTAA  20
Template       34887150  ..... 34887131

Reverse primer 1      GTCTCCACCCACCTCT  18
Template       34886813  ..... 34886830

```

Figura 44 – *Primers* para a pesquisa da variante *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln.

Para a otimização do PCR foi realizado um gradiente de temperaturas – 56°C, 58°C e 60°C, de modo a definir as condições ótimas de amplificação. Através da visualização dos resultados em gel de agarose (2%), verificou-se que as temperaturas de 58°C e 60°C amplificavam um único fragmento com o tamanho desejado, tendo sido escolhida a temperatura de 60°C.

Foi então realizada a extração de DNA da amostra de *swab* com o *kit QIAamp® DNA Investigator (QIAGEN)* e realizados os PCRs e Sequenciação de Sanger para as variantes *RUNX1* (c.608C>G, p.Pro203Arg e c.328A>C, p.Lys110Gln).

Os resultados da Sequenciação de Sanger permitiram identificar a variante *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg na amostra de *swab*, não tendo sido detetada a variante *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln (Figura 45).

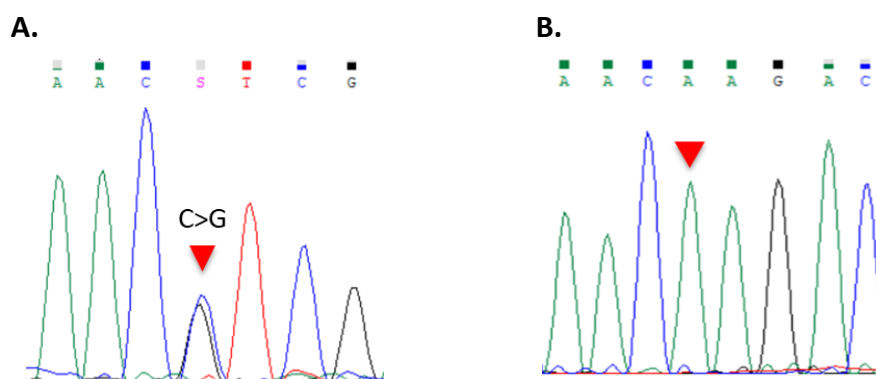


Figura 45 – Eletroferogramas da amostra de *swab* para pesquisa das variantes *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg (A) e *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln (B).

Os resultados obtidos permitiram demonstrar que a variante *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg ocorre na linha germinativa e a variante *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln é adquirida. O facto da variante *RUNX1* c.608C>G, p.Pro203Arg ser detetada numa frequência alélica de 78% é sugestivo de perda de heterozigotia do alelo normal, cujo mecanismos mais frequentes são a deleção do alelo normal ou unidissomia parental do cromossoma 21 [100].

Em resumo, trata-se de um doente com um síndrome de predisposição para neoplasia mielóide com mutação germinativa *RUNX1* c.328A>C, p.Lys110Gln que progrediu para LMA, tendo adquirido duas novas mutações no gene *RUNX1* (c.608C>G, p.Pro203Arg e c.610C>T, p.Arg204Ter).

CASO 6 – 7 meses, masculino, microcefalia e pancitopenia, sem história familiar de doença hematológica. Suspeita de Síndrome de Falência Medular congénito

Foi realizado o painel NGS de Síndromes de Falência Medular que identificou duas variantes no gene *RTEL1* (NM_032957.5):

- c.298A>G, p.Ile100Val, VAF 48%, ocorre num local moderadamente conservado, não está descrita em bases de dados populacionais (gnomAD=0) e as ferramentas *in silico* não predizem um impacto funcional na proteína, pelo que a variante é classificada de VUS

- c.1918G>A, p.Gly640Ser, VAF 50%, ocorre num local altamente conservado, tem um gnomAD=0.000807%, não descrita em bases de dados de patologias, os estudos *in silico* são concordantes no impacto funcional deletério desta variante, pelo que a variante é classificada de VUS

O gene *RTEL1* está envolvido na reparação, replicação e transcrição do DNA e manutenção do comprimento dos telómeros. Variantes patogénicas no *RTEL1* estão associadas a um rápido encurtamento dos telómeros e descritas associadas a Disqueratose Congénita [101] de hereditariedade maioritariamente autossómica recessiva com manifestações clínicas variáveis.

Tendo sido identificadas duas variantes de significado incerto no gene *RTEL1*, foi sugerido o estudo familiar para determinar a hereditariedade destas variantes, sendo solicitadas amostras de sangue periférico dos pais.

Para o estudo familiar foi necessário o desenho de *primers* com o auxílio do *Primer3Plus* e *Primer-BLAST* e otimização das reações (Figura 46).

A.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GTAACCCTTGCTCCGAACTC	20	58.28	55.00
Reverse primer	CAACCATCCCCACAGGAG	18	56.93	61.11
Products on target templates				
>NC_000020.11 Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p14 Primary Assembly				
product length = 273				
Features associated with this product:				
regulator of telomere elongation helicase 1 isoform 3				
regulator of telomere elongation helicase 1 isoform 2				
Forward primer	1	GTAACCCTTGCTCCGAACTC	20	
Template	63661271	63661290	
Reverse primer	1	CAACCATCCCCACAGGAG	18	
Template	63661543	63661526	

B.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCTCAGCCTCACCAACTTTC	20	59.12	55.00
Reverse primer	ATAAGCACCCACCAGGGAAC	20	59.67	55.00
>NC_000020.11 Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p14 Primary Assembly				
product length = 164				
Features associated with this product:				
regulator of telomere elongation helicase 1 isoform 3				
regulator of telomere elongation helicase 1 isoform 2				
Forward primer	1	GCTCAGCCTCACCAACTTTC	20	
Template	63689028	63689047	
Reverse primer	1	ATAAGCACCCACCAGGGAAC	20	
Template	63689191	63689172	

Figura 46 – *Primers* selecionados para o estudo familiar. (A) *Primers* para a variante *RTEL1* c.298A>G, p.Ile100Val (B) *Primers* para a variante *RTEL1* c.1918G>A, p.Gly640Ser

Para a otimização dos PCRs foi realizado um gradiente de temperaturas – 56°C, 58°C e 60°C, de modo a definir as condições ótimas de amplificação. Através da visualização dos resultados em gel de agarose (2%), verificou-se que as três temperaturas amplificavam um único fragmento com o tamanho desejado, tendo sido escolhida a temperatura de 60°C.

Foi extraído DNA das amostras dos pais e efetuou-se o PCR e Sequenciação de Sanger (Figura 47).

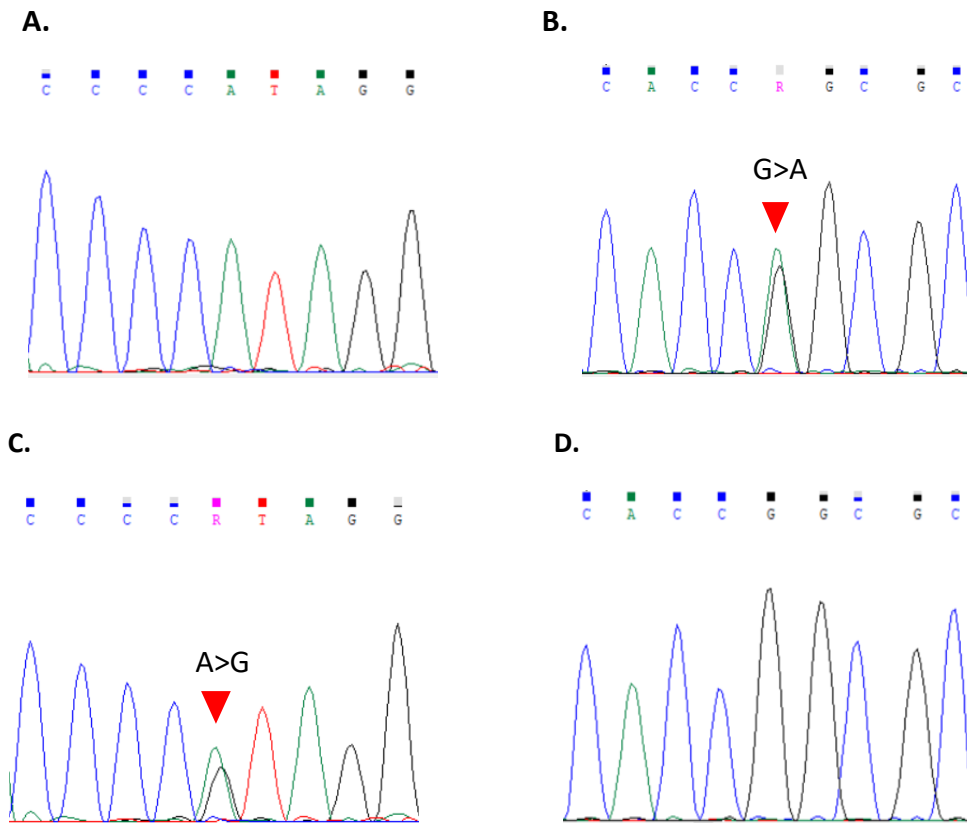


Figura 47 – Eletroferogramas das amostras dos pais.

- (A) Amostra da mãe para pesquisa da variante *RTEL1* c.298A>G, p.Ile100Val;
- (B) Amostra da mãe para pesquisa da variante *RTEL1* c.1918G>A, p.Gly640Ser;
- (C) Amostra do pai para pesquisa da variante *RTEL1* c.298A>G, p.Ile100Val;
- (D) Amostra do pai para pesquisa da variante *RTEL1* c.1918G>A, p.Gly640Ser.

A análise dos resultados revelou que a variante *RTEL1* c.1918G>A, p.Gly640Ser foi herdada da mãe e a variante *RTEL1* c.298A>G, p.Ile100Val foi herdada do pai, o que permite determinar que o propósito apresenta uma heterozigotia composta no gene *RTEL1* (Figura 48).

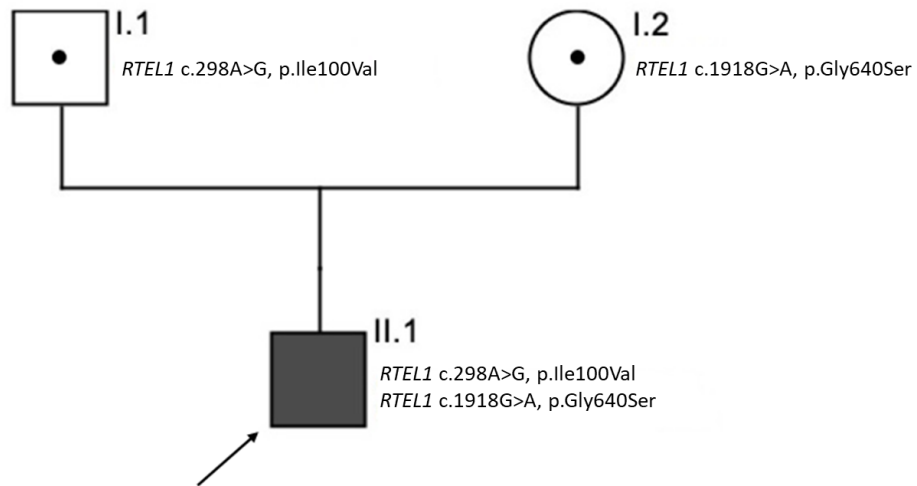


Figura 48 – Heredograma do estudo familiar descrito.

O estudo genético é sugestivo de Disqueratose Congénita, tendo sido sugerido o estudo complementar do comprimento dos telómeros.

5. Estudo dos Telómeros

Os telómeros correspondem a complexos de DNA repetitivo (repetições curtas de DNA em *tandem*) e proteínas. Encontram-se nas extremidades dos cromossomas e desempenham um papel importante na manutenção da integridade do genoma ao protegerem os cromossomas da degradação e perda de informação genética [102], [103]. Com o avanço da idade, células diploides normais perdem telómeros a cada ciclo celular, levando ao encurtamento dos mesmos.

As telomeropatias envolvem um conjunto de doenças raras causadas por alterações em genes envolvidos na manutenção dos telómeros e no sistema de resposta a danos no DNA, sendo a mais frequente a Disqueratose Congénita e as formas mais severas incluem o Síndrome de *Hoyeraal-Hreidarsson* e Síndrome de *Revesz*. Variantes identificadas nestas patologias estão normalmente associadas à diminuição da atividade da telomerase, o que leva ao encurtamento precoce dos telómeros [104], [105].

A avaliação do comprimento dos telómeros por *flow*-FISH (*gold-standard*) ou por biologia molecular é utilizada como técnica complementar à investigação destas patologias, no entanto, dada a dificuldade de standardização e a necessidade de controlos ajustados à idade, não está implementada em Portugal, sendo poucos os centros na Europa que aceitam amostras no contexto de diagnóstico.

No laboratório, durante o estágio, tive oportunidade de testar um *kit* comercial para a avaliação do comprimento dos telómeros (AHTLQ – *Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit*) baseado em PCR em Tempo Real [106], [107].

O *kit* é constituído por *primers* desenhados para amplificar as sequências dos telómeros e *primers* de referência que amplificam uma região de cópia única (SCR) no cromossoma 17 para a normalização dos resultados. Contém, também, uma *master mix* com um corante intercalante (*SYBR Green*) e uma amostra de DNA genómico com o comprimento dos telómeros conhecido ($1,23 \pm 0,09$ Mb por célula diplóide), que é utilizada como referência para calcular o comprimento dos telómeros das amostras alvo.

Uma vez que o comprimento dos telómeros varia com a idade (diminui), foram selecionadas 44 amostras controlos de diferentes faixas etárias (desde os 7 meses a 75 anos).

Foram testadas amostras de doentes com telomeropatia confirmada. Para cada amostra foram realizadas duas reações de PCR quantitativo: para a amplificação do SCR e para a amplificação dos telómeros. A avaliação dos resultados foi feita pelo método comparativo $\Delta\Delta C_t$.

O comprimento total dos telómeros da amostra por célula diplóide foi calculado multiplicando o valor do comprimento dos telómeros da amostra de referência por $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Como existem 92 extremidades cromossómicas numa célula diplóide, o comprimento médio dos telómeros em cada extremidade é dividido por 92.

Para cada amostra foi determinado o comprimento dos telómeros (kb/92). As amostras controlo foram agrupadas por faixas etárias e calculado o percentil de tamanho dos telómeros para servir de referências às amostras em estudo.

No gráfico abaixo estão representados os resultados das amostras controlo, os percentis e os resultados dos doentes com telomeropatias conhecida (Figura 49), onde se pode observar que os doentes com telomeropatias conhecida apresentavam-se abaixo do percentil 1 ajustado à idade.

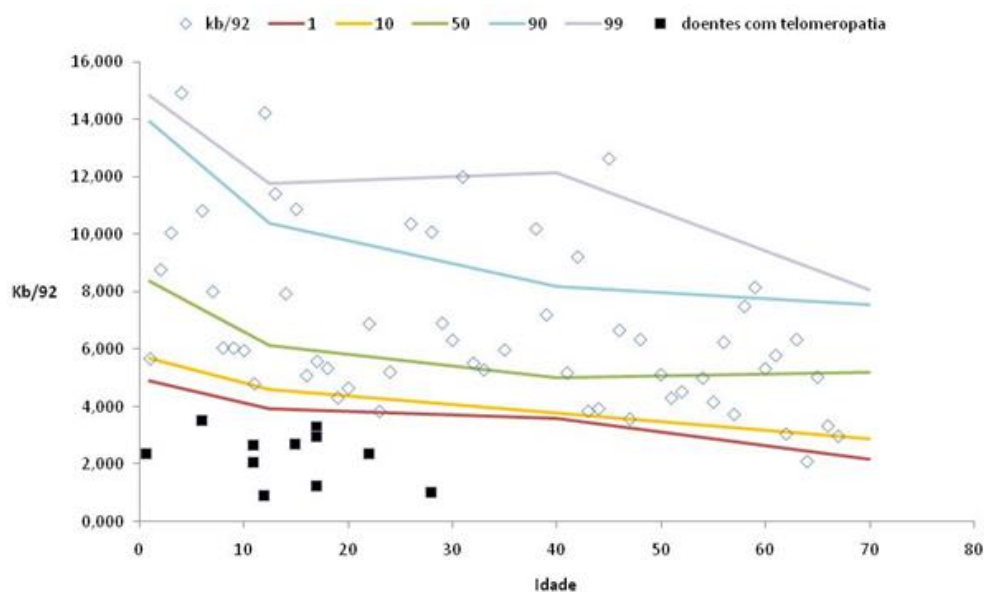


Figura 49 – Representação dos resultados obtidos para a avaliação do comprimento dos telómeros. As linhas representam os diferentes percentis.

Ainda que sejam resultados muito preliminares, com necessidade de aumentar o tamanho da amostra controlo, existe uma concordância entre os resultados obtidos e o fenótipo dos doentes. Reconhecendo que esta metodologia está pouco estandardizada, a sua implementação no laboratório poderá trazer informação adicional, em particular nos doentes em que são identificadas variantes de significado incerto associadas a telomeropatias.

6. Competências adquiridas no estágio

Ao longo do estágio desenvolvi competências nas técnicas mencionadas neste relatório, realizando-as de forma autônoma.

Executei as técnicas de extração de DNA e RNA de forma manual (extração em coluna) e automatizada (*QIAasympphony*) a partir de sangue periférico, medula óssea, raiz de cabelo e populações celulares isoladas por gradiente de densidade. Compreendi que, por vezes, é necessário o ajuste do protocolo à celularidade e especificidade da amostra, bem como do estudo genético a realizar (DNA vs. RNA).

Adquiri conhecimentos na execução de diferentes PCRs (convencional, multiplex, ASO-PCR, nested, análise de fragmentos) e das suas aplicações atendendo às características de cada estudo molecular. Tive, também oportunidade de aprender estratégias de otimização de PCRs. Das metodologias que executei, o PCR em Tempo Real Quantitativo foi a técnica mais desafiante devido à necessidade da reprodutibilidade de resultados no limite de sensibilidade da técnica.

Realizei, também, todo o processo de Sequenciação de Sanger, HRM e MLPA, bem como a análise e interpretação de resultados com recurso a diferentes *softwares* e bases de dados.

Tive oportunidade de acompanhar o *workflow* de execução de painéis de NGS e da análise e integração dos resultados.

Tendo em conta que no laboratório de Hemato-Oncologia são estudados vários tipos de amostras com diferentes especificidades, bem como executadas diferentes técnicas de biologia molecular, este estágio permitiu-me desenvolver competências a nível técnico e a reconhecer a importância da interação clínico-laboratorial para um melhor diagnóstico e seguimento destas patologias.

7. Participação em reuniões/atividades multidisciplinares

Durante o período de estágio participei na discussão dos resultados da equipa de Hemato-Oncologia e nas reuniões do laboratório da UFHM para discussão de resultados de controlos de qualidade de classificação de variantes germinativas e somáticas (*GENQA*).

Participei no trabalho “Validação de um painel de Next Generation Sequencing (NGS) de genes de fusão de linhagem mielóide – experiência de um centro” que foi selecionado para comunicação oral na 31ª Sabatina de Hematologia.

Tive oportunidade de acompanhar a realização de ensaios-teste no equipamento de PCR Digital (*QuantStudio Absolute Q Digital PCR System – ThermoFisher*) para a quantificação da mutação *MYD88 L265P*, *c-KIT D816V*, *JAK2 V617F* e *BCR::ABL p210*.

Acompanhei a integração de uma aluna de mestrado no laboratório na execução das técnicas de extração de DNA, PCR/Análise de Fragmentos e Sequenciação de Sanger.

Participei ainda nas seguintes reuniões/cursos (certificados em anexo):

- “Perspetivas em Hematologia”, organizada pelo Centro Hospitalar Universitário do Porto de 23 a 25 de fevereiro no Porto;
- Curso teórico-prático de Biologia Molecular em Hematologia, organizado pela UFHM de 10 a 12 de maio com a duração de 21h;
- 31ª Sabatina de Hematologia do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, que decorreu na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra no dia 13 de maio com a duração de 6h;
- Formação sobre PCR Digital, organizada pela *ThermoFisher* no dia 12 abril no laboratório da UFHM (sem certificado).

Conclusão

O estágio na UFHM permitiu consolidar e colocar em prática todos os conhecimentos teóricos adquiridos no primeiro ano do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, bem como contactar com a rotina de um laboratório clínico.

Além disso, toda a experiência deste estágio demonstrou como é de extrema importância o conhecimento de todas as etapas do ciclo laboratorial, desde a chegada de amostras até ao envio do relatório, assim como o controlo de qualidade interno e externo, que garante a obtenção de resultados mais precisos, confiáveis e a comunicação destes atempadamente. Demonstrou, também, como é fundamental a organização de uma equipa de técnicos dentro de um laboratório.

Em relação à área de Hemato-Oncologia, este estágio revelou que técnicas de biologia molecular são uma mais-valia no diagnóstico, classificação, estratificação de risco, adequação terapêutica e monitorização da doença, possibilitando a caracterização do espectro mutacional das neoplasias hematológicas.

Em suma, o estágio foi um processo de aprendizagem a nível pessoal e profissional e, no final, considero ter cumprido com os objetivos aos quais me propus com a cooperação e sob supervisão dos técnicos que fazem parte deste laboratório.

Bibliografia

- [1] M. F. Colby-Graham and C. Chordas, “The Childhood Leukemias”, *J Pediatr Nurs*, vol. 18, no. 2, pp. 87–95, 2003, doi: 10.1053/jpdn.2003.9.
- [2] “Medula Óssea e Hematopoiese - APCL.” <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/medula-ossea-e-hematopoiese> (accessed Jun. 12, 2023).
- [3] J. D. Khoury et al., “The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms”, *Leukemia*, vol. 36, no. 7. Springer Nature, pp. 1703–1719, Jul. 01, 2022. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1.
- [4] D. Wujcik, “Molecular Biology of Leukemia”, *Semin Oncol Nurs*, vol. 19, no. 2, pp. 83–89, 2003, doi: 10.1016/S0749-2081(03)00004-4.
- [5] J. B. Whitfield, “Genetics and Molecular Biology in Laboratory Medicine, 1963 - 2013”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 1. pp. 113–117, Jan. 2013. doi: 10.1515/cclm-2012-0478.
- [6] J. L. Spivak, “Myeloproliferative Neoplasms”, *New England Journal of Medicine*, vol. 376, no. 22, pp. 2168–2181, Jun. 2017, doi: 10.1056/NEJMra1406186.
- [7] F. T. Bosman, World Health Organization., and International Agency for Research on Cancer., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer, 2017.
- [8] N. A. Azad, Z. A. Shah, A. A. Pandith, R. Rasool, and S. Jeelani, “Real-time quantitative PCR: A reliable molecular diagnostic and follow-up tool for ‘minimal residual disease’ assessment in chronic myeloid leukemia” *Biosci Rep*, vol. 38, no. 5, Oct. 2018, doi: 10.1042/BSR20180974.
- [9] P. B. Jolynn Sessions, “Chronic Myeloid Leukemia in 2007”, 2007.
- [10] R. Arora and R. D. Press, “Measurement of BCR-ABL1 transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices”, *Leukemia and Lymphoma*, vol. 58, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 8–16, Jan. 02, 2017. doi: 10.1080/10428194.2016.1190974.
- [11] A. Hochhaus et al., “European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia”, *Leukemia*, vol. 34, no. 4. Springer Nature, pp. 966–984, Apr. 01, 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0776-2.
- [12] E. Vuelta, I. García-Tuñón, P. Hernández-Carabias, L. Méndez, and M. Sánchez-Martín, “Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy”, *Biology*, vol. 10, no. 2. MDPI AG, pp. 1–16, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/biology10020118.

- [13] L. Rejali et al., "Characterizing of Four Common BCR-ABL Kinase Domain Mutations (T315I, Y253H, M351T and E255K) in Iranian Chronic Myelogenous Leukemia Patients with Imatinib Resistance", *Int J Cancer Manag*, vol. 8, no. 3, May 2015, doi: 10.17795/ijcp2334.
- [14] I. B. Otazua, I. Zalcborgab, D. G. Tabaka, J. Dobbin', and H. N. Seuanezad, "Detection of BCR-ABL Transcripts by Multiplex and Nested PCR in Different Haematological Disorders", 2000.
- [15] S. Soverini et al., "BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet", *Blood*, vol. 118, no. 5. American Society of Hematology, pp. 1208–1215, Aug. 04, 2011. doi: 10.1182/blood-2010-12-326405.
- [16] M. Ünlü, Y. Kırız, F. N. Kacı, M. A. Özcan, and Y. Baran, "Multidrug resistance in chronic myeloid leukemia", *Turkish Journal of Biology*, vol. 38, no. 6. Scientific and Technical Research Council of Turkey, pp. 806–816, 2014. doi: 10.3906/biy-1405-21.
- [17] S. N. Constantinescu, W. Vainchenker, G. Levy, and N. Papadopoulos, "Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms", *HemaSphere*, vol. 5, no. 6. Wolters Kluwer Health, p. E578, Jun. 01, 2021. doi: 10.1097/HS9.0000000000000578.
- [18] J. Staerk and S. N. Constantinescu, "The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective", *JAKSTAT*, vol. 1, no. 3, pp. 184–190, Jul. 2012, doi: 10.4161/jkst.22071.
- [19] J. Fucikova, R. Spisek, G. Kroemer, and L. Galluzzi, "Calreticulin and cancer", *Cell Research*, vol. 31, no. 1. Springer Nature, pp. 5–16, Jan. 01, 2021. doi: 10.1038/s41422-020-0383-9.
- [20] D. W. Dodington, H. R. Desai, and M. Woo, "JAK/STAT – Emerging Players in Metabolism", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 29, no. 1. Elsevier Inc., pp. 55–65, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.001.
- [21] J. Prada-Arismendy, J. C. Arroyave, and S. Röthlisberger, "Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia", *Blood Reviews*, vol. 31, no. 1. Churchill Livingstone, pp. 63–76, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.blre.2016.08.005.
- [22] J. E. Rubnitz, B. Gibson, and F. O. Smith, "Acute Myeloid Leukemia", *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 24, no. 1. pp. 35–63, Feb. 2010. doi: 10.1016/j.hoc.2009.11.008.
- [23] X. Yang and J. Wang, "Precision therapy for acute myeloid leukemia", *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 11, no. 1. BioMed Central Ltd., 2018. doi: 10.1186/s13045-017-0543-7.

- [24] L. F. Newell and R. J. Cook, "Advances in acute myeloid leukemia", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 375. NLM (Medline), p. n2026, Oct. 06, 2021. doi: 10.1136/bmj.n2026.
- [25] H. Döhner et al., "Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN", *Blood*, vol. 140, no. 12, pp. 1345–1377, Sep. 2022, doi: 10.1182/BLOOD.2022016867.
- [26] L. Griffiths and D. Chacon-Cortes, "Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives", *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, p. 1, May 2014, doi: 10.2147/bsam.s46573.
- [27] L. Koshy, "Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays", vol. 44, 2016, doi: 10.1007/s11033-016-4085-9/Published.
- [28] S. C. Tan and B. C. Yiap, "DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2009. 2009. doi: 10.1155/2009/574398.
- [29] H. Nasiri, M. Forouzandeh, M. J. Rasaei, and F. Rahbarizadeh, "Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent", *J Clin Lab Anal*, vol. 19, no. 6, pp. 229–232, 2005, doi: 10.1002/jcla.20083.
- [30] K. Mommaerts, I. Sanchez, F. Betsou, and W. Mathieson, "Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions", *Anal Biochem*, vol. 479, pp. 51–53, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.ab.2015.03.027.
- [31] Z. Zakaria et al., "An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood", *Genetics and Molecular Research*, vol. 12, no. 1, pp. 302–311, Feb. 2013, doi: 10.4238/2013.February.4.4.
- [32] ThermoFisher Scientific, "Basic Principles of RT-qPCR", Accessed: Jan. 31, 2023. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
- [33] Y. Mo, R. Wan, and Q. Zhang, "Application of Reverse Transcription-PCR and Real-Time PCR in Nanotoxicity Research", 2012, pp. 99–112. doi: 10.1007/978-1-62703-002-1_7.
- [34] J. R. Murray and M. S. Rajeevan, "Evaluation of DNA extraction from granulocytes discarded in the separation medium after isolation of peripheral blood mononuclear cells and plasma from whole blood", *BMC Res Notes*, vol. 6, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1756-0500-6-440.

- [35] “Automated nucleic acid extraction and purification.” <https://www.integrabiosciences.com/japan/en/stories/automated-nucleic-acid-purification-assist-plus-pipetting-robot> (accessed Jan. 23, 2023).
- [36] “DNA extraction technologies.” <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/plasmid/introduction/dna-extraction-technologies> (accessed Jan. 22, 2023).
- [37] QIAGEN, “QIAGEN Purification Technologies.” <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/plasmid-resource-center/qiagen-purification-technologies> (accessed Jan. 22, 2023).
- [38] “Kit de Extração Magnética.”
- [39] P. Desjardins and D. Conklin, “NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids”, *Journal of Visualized Experiments*, no. 45, 2010, doi: 10.3791/2565.
- [40] C.-H. Shen, “Detection and Analysis of Nucleic Acids”, *Diagnostic Molecular Biology*, pp. 167–185, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9.
- [41] ThermoFisher, “Easy choices for RNA and DNA quantification Nucleic acid quantification.”
- [42] ThermoFisher, “RNA/DNA Quantification”, Accessed: Jan. 31, 2023. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>
- [43] H. A. Erlich, “Polymerase Chain Reaction”, 1989.
- [44] J. Guo, D. Starr, and H. Guo, “Classification and review of free PCR primer design software”, *Bioinformatics*, vol. 36, no. 22–23, pp. 5263–5268, Dec. 2020, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa910.
- [45] RANDALL K. SAIK, “Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase”, 1987.
- [46] M. R. Green and J. Sambrook, “Polymerase chain reaction”, *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2019, no. 6, pp. 436–456, Jun. 2019, doi: 10.1101/pdb.top095109.
- [47] “Advantages and disadvantages of PCR technology – faCellitate.” <https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr-technology/> (accessed Jun. 04, 2023).
- [48] L. Y. Chuang, Y. H. Cheng, and C. H. Yang, “Specific primer design for the polymerase chain reaction”, *Biotechnology Letters*, vol. 35, no. 10. pp. 1541–1549, Oct. 2013. doi: 10.1007/s10529-013-1249-8.
- [49] A. Yuryev, “PCR Primer Design Using Statistical Modeling.” [Online]. Available: <http://www.autoprimer.com>

- [50] E. Van Pelt-Verkuil, A. Van Belkum, and J. P. Hays, "Principles and technical aspects of PCR amplification." Springer Netherlands, 2008. doi: 10.1007/978-1-4020-6241-4.
- [51] ThermoFisher, "Multiplex PCR with Platinum SuperFi II DNA Polymerase", 2019.
- [52] B. Kim et al., "The added values of multiplex reverse transcriptase-PCR followed by mutation screening in the initial evaluation of acute leukemia", *Int J Lab Hematol*, vol. 38, no. 4, pp. 444–453, Aug. 2016, doi: 10.1111/ijlh.12521.
- [53] QIAGEN, "Multiplex PCR Handbook", 2010. [Online]. Available: www.qiagen.com
- [54] L. Ugozzoli and R. B. Wallace, "Allele-Specific Polymerase Chain Reaction", 1991.
- [55] M. R. Green and J. Sambrook, "Nested polymerase chain reaction (PCR)", *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2019, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.1101/pdb.prot095182.
- [56] P. Wittmeier and S. Hummel, "Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR", *Biotechniques*, vol. 72, no. 4, pp. 155–158, Apr. 2022, doi: 10.2144/btn-2021-0094.
- [57] "Resolution and Recovery of large DNA fragments", 2000.
- [58] V. Van Der Velden, A. Hochhaus, G. Cazzaniga, T. Szczepanski, J. Gabert, and J. Van Dongen, "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects", 2003, doi: 10.1038/sj.fleu.2402922.
- [59] B. Kaltenboeck and C. Wang, "Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics", *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 40. pp. 219–259, 2005. doi: 10.1016/S0065-2423(05)40006-2.
- [60] C. J. Smith and A. M. Osborn, "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR) - Based approaches in microbial ecology", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 67, no. 1. pp. 6–20, Jan. 2009. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- [61] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, "Real Time Quantitative PCR", 1996.
- [62] M. R. Green and J. Sambrook, "Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data", *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2018, no. 10, pp. 769–777, Oct. 2018, doi: 10.1101/pdb.top095000.
- [63] Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific, "Real-time PCR handbook."
- [64] F. Schüler and G. Dölken, "Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR", *Clinica Chimica Acta*, vol. 363, no. 1–2. pp. 147–156, Jan. 2006. doi: 10.1016/j.cccn.2005.05.045.

- [65] C. F. Taylor, "Mutation scanning using high-resolution melting", *Biochem Soc Trans*, vol. 37, no. 2, pp. 433–437, 2009, doi: 10.1042/BST0370433.
- [66] R. H. A. M. Vossen, "Genotyping DNA Variants with High-Resolution Melting Analysis", in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2017, pp. 17–28. doi: 10.1007/978-1-4939-6442-0_2.
- [67] M. Erali, K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer, "High resolution melting applications for clinical laboratory medicine", *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 85, no. 1, pp. 50–58, Aug. 2008. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.012.
- [68] M. Erali and C. T. Wittwer, "High Resolution Melting Analysis for Gene Scanning", *Methods*, vol. 50, no. 4, pp. 250–261, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.013.
- [69] ThermoFisher Scientific, "DNA fragment analysis by capillary electrophoresis."
- [70] V. Reyes-Núñez, E. Galo-Hooker, B. Pérez-Romano, R. E. Duque, A. Ruiz-Arguelles, and J. Garcés-Eisele, "Simultaneous Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay and Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis in Patients with AcuteLeukemia", *Cytometry B Clin Cytom*, vol. 94, no. 1, pp. 172–181, Jan. 2018, doi: 10.1002/cyto.b.21523.
- [71] L. Stuppia, I. Antonucci, G. Palka, and V. Gatta, "Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 3245–3276, Mar. 2012. doi: 10.3390/ijms13033245.
- [72] J. Ma et al., "Multiplex ligation-dependent probe amplification identifies copy number changes in normal and undetectable karyotype MDS patients", 2021, doi: 10.1007/s00277-021-04550-8/Published.
- [73] S. De Boer and S. J. White, "Genotyping Multiallelic Copy Number Variation with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)", in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2017, pp. 147–153. doi: 10.1007/978-1-4939-6442-0_9.
- [74] "MLPA Technique - MRC Holland."
<https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique> (accessed Apr. 24, 2023).
- [75] MRC Holland, "MLPA[®] General Protocol", 2022. [Online]. Available: www.mrcholland.com, www.mlpa.com
- [76] A. P. Berbegall, E. Villamón, S. Navarro, and R. Noguera, "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)", in *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 215–224. doi: 10.1007/978-3-642-17890-0_33.

- [77] H. Ruparel, M. E. Ulz, S. Kim, and J. Ju, "Digital detection of genetic mutations using SPC-sequencing", *Genome Res*, vol. 14, no. 2, pp. 296–300, Feb. 2004, doi: 10.1101/gr.1344104.
- [78] ThermoFisher Scientific, "How to Conduct Sanger Sequencing", Accessed: Apr. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/capillary-electrophoresis-information/how-conduct-fragment-analysis0.html>
- [79] P. L. Curci and G. Sonnante, "How a small double-stranded trick can mislead sanger sequencing", *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 26, no. 3, pp. 80–82, Sep. 2015, doi: 10.7171/jbt.15-2603-004.
- [80] B. M. Crossley et al., "Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 32, no. 6, pp. 767–775, Nov. 2020, doi: 10.1177/1040638720905833.
- [81] M. L. Metzker, "Emerging technologies in DNA sequencing", *Genome Research*, vol. 15, no. 12, pp. 1767–1776, Dec. 2005. doi: 10.1101/gr.3770505.
- [82] K. Sun, Y. P. Yuen, H. Wang, and H. Sun, "Online Diagnosis System: A webserver for analysis of Sanger sequencing-based genetic testing data", *Methods*, vol. 69, no. 3, pp. 230–236, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.ymeth.2014.07.002.
- [83] S. Richards et al., "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology", *Genetics in Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 405–424, May 2015, doi: 10.1038/gim.2015.30.
- [84] M. Ilyas, "Next-Generation Sequencing in Diagnostic Pathology", *Pathobiology*, vol. 84, no. 6. S. Karger AG, pp. 292–305, Feb. 01, 2018. doi: 10.1159/000480089.
- [85] Y. Zhong, F. Xu, J. Wu, J. Schubert, and M. M. Li, "Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine", *Ann Lab Med*, vol. 41, no. 1, pp. 25–43, Jan. 2020, doi: 10.3343/alm.2021.41.1.25.
- [86] S. M. Caspar, N. Dubacher, A. M. Kopps, J. Meienberg, C. Henggeler, and G. Matyas, "Clinical sequencing: From raw data to diagnosis with lifetime value", *Clinical Genetics*, vol. 93, no. 3. Blackwell Publishing Ltd, pp. 508–519, Mar. 01, 2018. doi: 10.1111/cge.13190.
- [87] S. Yohe and B. Thyagarajan, "Review of Clinical Next-Generation Sequencing", *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, vol. 141, no. 11. College of American Pathologists, pp. 1544–1557, Nov. 01, 2017. doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
- [88] "How to Tackle Large-Scale NGS Data Processing with Software and Platform Solutions." <https://biosistemika.com/blog/ngs-data-processing-with-software-and-platform-solutions/> (accessed Jun. 04, 2023).

- [89] T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, and A. Dinh, "Next-generation sequencing technologies: An overview", *Hum Immunol*, vol. 82, no. 11, pp. 801–811, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.
- [90] M. Hong et al., "RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research", *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 13, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2020. doi: 10.1186/s13045-020-01005-x.
- [91] L. Foroni et al., "Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia", *Am J Hematol*, vol. 84, no. 8, pp. 517–522, Aug. 2009, doi: 10.1002/ajh.21457.
- [92] J. Gabert et al., "Standardization and quality control studies of 'real time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program", *Leukemia*, vol. 17, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 2318–2357, 2003. doi: 10.1038/sj.leu.2403135.
- [93] E. Beillard et al., "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - A Europe against cancer program", *Leukemia*, vol. 17, no. 12, pp. 2474–2486, 2003, doi: 10.1038/sj.leu.2403136.
- [94] S. Srivastava and S. Dutt, "Imatinib mesylate resistance and mutations: An Indian experience", *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, vol. 34, no. 3, pp. 213–220, 2013, doi: 10.4103/0971-5851.123748.
- [95] S. Redaelli et al., "Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors", *American Journal of Hematology*, vol. 87, no. 11. Nov. 2012. doi: 10.1002/ajh.23338.
- [96] D. Pietra et al., "Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms", *Leukemia*, vol. 30, no. 2, pp. 431–438, Feb. 2016, doi: 10.1038/leu.2015.277.
- [97] A. Ivey et al., "Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML", *New England Journal of Medicine*, vol. 374, no. 5, pp. 422–433, Feb. 2016, doi: 10.1056/nejmoa1507471.
- [98] ThermoFisher Scientific, "Oncomine Myeloid Research Assay", 2017.
- [99] Y. Hayashi, Y. Harada, and H. Harada, "Myeloid neoplasms and clonal hematopoiesis from the RUNX1 perspective", *Leukemia*, vol. 36, no. 5, pp. 1203–1214, May 2022, doi: 10.1038/S41375-022-01548-7.
- [100] A. L. Brown et al., "RUNX1-mutated families show phenotype heterogeneity and a somatic mutation profile unique to germline predisposed AML", *Blood Adv*, vol. 4, no. 6, pp. 1131–1144, Mar. 2020, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000901.

- [101] M. A. Hassani, J. Murid, and J. Yan, "Regulator of telomere elongation helicase 1 gene and its association with malignancy", *Cancer Reports*, vol. 6, no. 1. John Wiley and Sons Inc, Jan. 01, 2023. doi: 10.1002/cnr2.1735.
- [102] J. Lin, D. L. Smith, K. Esteves, and S. Drury, "Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 99. Elsevier Ltd, pp. 271–278, Jan. 01, 2019. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.005.
- [103] T. H. Brü Mmendorf, J. P. Maciejewski, J. Mak, N. S. Young, and P. M. Lansdorp, "Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia", 2001. [Online]. Available: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/97/4/895/1671497/h8040100895.pdf>
- [104] G. Kaur, P. Mishra, P. Tripathi, S. Tyagi, H. Pati, and M. Manapara, "Telomeropathies - A Genetic Conglomerate", 2021.
- [105] R. G. Armando, D. L. Mengual Gomez, J. Maggio, M. C. Sanmartin, and D. E. Gomez, "Telomeropathies: Etiology, diagnosis, treatment and follow-up. Ethical and legal considerations", *Clinical Genetics*, vol. 96, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 3–16, Jul. 01, 2019. doi: 10.1111/cge.13526.
- [106] ScienCell Research Laboratories, "Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit."
- [107] ScienCell Research Laboratories, "Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit".

Anexos

Anexo I – Certificado de participação nas “Perspetivas em Hematologia”



CERTIFICADO

Mariana Santos

Participou nas
PERSPECTIVAS EM HEMATOLOGIA
que decorreram no Porto Palácio Hotel,
nos dias 23, 24 e 25 de fevereiro de 2023.

Fernanda Trigo
Fernanda Trigo

Patrocínio Institucional

SERVIÇO HEMATOLOGIA CLÍNICA



SÃO JOÃO



Anexo II – Certificado de participação no curso teórico-prático de Biologia Molecular



31 Sabatina 13 MAIO 2023 de Hematologia

Auditório da Sub-unidade III da Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra

CERTIFICADO DE APROVEITAMENTO

Certifica-se que

Mariana Santos

Frequentou com aproveitamento o Curso teórico-prático de **Biologia molecular em Hematologia, Metodologias e abordagem clínico-laboratorial**, que decorreu nos dias 10, 11 e 12 de maio de 2023 na Casa Acreditar e na Unidade Funcional de Hematologia Molecular (UFHM) Hospital Pediátrico de Coimbra, com a duração de 21 horas.

Profª Doutora Teresa Fidalgo
Coordenadora do Curso

ORGANIZAÇÃO

A FORUM
HEMATOLÓGICO

PATROCÍNIO CIENTÍFICO

CHUC
CENTRO DE HEMATOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

13 MAIO 2023
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Anexo III – Certificado de participação na 31ª Sabatina de Hematologia



31ª Sabatina 13 MAIO 2023 de Hematologia

Auditório da Sub-unidade III da Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra

CERTIFICADO

Certifica-se que

Mariana Santos

Participou na **31.ª Sabatina de Hematologia** que decorreu no dia 13 de maio de 2023 no auditório da sub-unidade III na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com a duração de 6 horas.

Profª Doutora Catarina Geraldès
Comissão Organizadora

Profª Doutora Teresa Fidalgo
Comissão Organizadora

ORGANIZAÇÃO



PATROCÍNIO CIENTÍFICO



Anexo IV – Resumo submetido para a 31ª Sabatina de Hematologia

Abstract Nº 22 Validação de um painel de Next Generation Sequencing (NGS) de genes de fusão de linhagem mielóide – experiência de um centro

Mariana Santos(1); Ana Teresa Simões(1); Ana Catarina Oliveira(1); Teresa Fidalgo(1); Margarida Coucelo(1)
(1) Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Introdução: A tecnologia de Next Generation Sequencing (NGS) veio revolucionar o estudo genético das neoplasias hematológicas na rotina laboratorial. A abordagem por painel de genes de DNA veio permitir num só estudo a caracterização do espectro mutacional e mais recentemente a abordagem por painel de RNA a identificação de translocações menos frequentes, por vezes, crípticas e não identificáveis por citogenética convencional.

Objectivo: Avaliar um painel de NGS para 29 genes de fusão de linhagem mielóide num laboratório de diagnóstico molecular.

Métodos: Foram estudadas 13 amostras por painel NGS de RNA que inclui 29 genes-driver de fusão (OncoPrint Myeloid Research Assay, ThermoFisher). Destas, 5 tinham translocações recorrentes conhecidas: *BCR::ABL1* p190, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*; *PML::RARA*; *KMT2A-MLLT3*; 7 Leucemia Mielóide Aguda (LMA) com estudo genético completo e sem alterações moleculares classificadoras de doença e 1 com Eosinofilia Persistente. A análise dos dados foi realizada no software IonReporter (ThermoFisher).

Resultados: O estudo por painel de fusões identificou correctamente as 5 amostras com translocações recorrentes conhecidas e permitiu identificar os seus pontos de quebra. Numa LMA sem alterações genéticas recorrentes foi identificado o gene de fusão *ETV6::MECOM* que resulta da translocação t(3;12)(q26;p13). Nas restantes 7 o estudo por painel de fusões de NGS foi negativo.

Discussão: Nas 5 amostras testadas o painel de genes de fusão identificou as alterações genéticas recorrentes conhecidas *BCR::ABL1* p190, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*; *PML::RARA*; *KMT2A-MLLT3*. A identificação do gene de fusão *ETV6::MECOM* numa LMA sem alterações recorrentes, permitiu a re-classificação em "LMA com rearranjo MECOM" de acordo a classificação WHO 2022 e no grupo de prognóstico adverso de acordo com a classificação da ELN AML 2022.

Conclusão: A utilização do painel de fusões de linhagem mielóide na rotina laboratorial permite num só estudo a identificação de genes de fusão menos frequentes, contribuindo para uma melhor classificação das neoplasias hematológicas de acordo com as recomendações da WHO 2022, bem como na estratificação de risco ELN AML 2022.

Anexo V – Certificado da seleção do resumo para a 31ª Sabatina de Hematologia



31 Sabatina **13 MAIO 2023**
de Hematologia

Auditório da Sub-unidade III da Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra

CERTIFICADO

O trabalho com o título

Validação de um painel de Next Generation Sequencing (NGS) de genes de fusão de linhagem mielóide – experiência de um centro

elaborado por

Mariana Santos; Ana Teresa Simões; Ana Catarina Oliveira; Teresa Fidalgo; Margarida Coucelo

Foi selecionado para apresentação em sala plenária durante a **31.ª Sabatina de Hematologia** que decorreu no dia 13 de maio de 2023 no auditório da sub-unidade III na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com a duração de 6 horas.

Catarina Geraldès *Teresa Fidalgo*

Profª Doutora Catarina Geraldès **Profª Doutora Teresa Fidalgo**
Comissão Organizadora Comissão Organizadora

ORGANIZAÇÃO **FORUM** EMATOLÓGICO

PATROCÍNIO CIENTÍFICO **CHUC** HOSPITAL DE CLÍNICA E UNIDADE DE SAÚDE DE COIMBRA

125 ANOS 1909 **UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

