



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



**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES NO ÉXON 09 DO GENE CALRETICULINA (*CALR*) EM  
PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE**

**ÉRYCKA ALVES DE MESQUITA**

**MANAUS – AM**

**2023**

**ÉRYCKA ALVES DE MESQUITA**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES NO ÉXON 09 DO GENE CALRETICULINA (*CALR*)  
EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Monteiro Tarragô

**MANAUS – AM**

**2023**

### Ficha Catalográfica

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

M582i Mesquita, Erycka Alves  
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES NO ÉXON 09 DO  
GENE CALRETICULINA (CALR) EM PACIENTES  
COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E  
MIELOFIBROSE / Erycka Alves Mesquita. Manaus :  
[s.n], 2023.  
105 f.: color.; 29 cm.

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

Inclui bibliografia

Orientador: Lucivana Prata de Souza Mourão

Coorientador: Andrea Monteiro Tarragô

1. Neoplasias mieloproliferativas. 2. BCR::ABL1  
negativo. 3. frameshift. 4. CALR tipo 1. 5. CALR  
tipo 2. I. Lucivana Prata de Souza Mourão (Orient.). II.  
Andrea Monteiro Tarragô (Coorient.). III. Universidade do  
Estado do Amazonas. IV. IDENTIFICAÇÃO DE

VARIANTES NO ÉXON 09 DO GENE  
CALRETICULINA (CALR) EM PACIENTES COM  
TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE



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



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO N° 012/2023

Ao trigésimo dia do mês de agosto do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google, a Defesa de Dissertação da discente **Erycka Alves de Mesquita** sob o título: **“Identificação de variantes no éxon 09 do gene Calreticulina (CALR) em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose”**, tendo como orientadora a Prof.ª Dr.ª Lucivana Prata de Souza Mourão e coorientadora a Prof.ª Dr.ª Andréa Monteiro Tarragô, segundo encaminhamento da Prof.ª Dr.ª Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof.ª Dr.ª Lucivana Prata de Souza Mourão – Presidente (UEA)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 600.963.572/15
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Membro (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 887.165.032-87
Prof.ª Dr.ª Rafaela Oliveira dos Santos – Membro (UFAM / FIOCRUZ)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 010.742.212-30

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por me conceder saúde e concluir mais sonho de vida.

Meu esposo Audemir dos Santos e minha filha Lúcia Ayla Mesquita dos Santos, vocês são minha fonte de coragem, força e determinação.

E aos meus pais, Ana Lúcia Alves de Mesquita e Manoel de Mesquita Leite, e irmãos Renata Alves de Mesquita e Yuri Mateus Alves de Mesquita por me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a Deus, que me deu a força, a sabedoria e a determinação a finalizar um grande sonho de vida, concluir minha dissertação.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu esposo Audemir dos Santos pelo companheirismo, respeito, paciência, incentivo e apoio emocional longo de todo o percurso. E a minha filha Lúcia Ayla Mesquita dos Santos sempre foi minha força e motivação e sempre buscar novos desafios e superá-los.

Meus agradecimentos aos meus pais e irmãos que me diante os conflitos de horários, cansaço e estudos, me apoiaram em cuidar de minha filha em dias de vários compromissos.

A minha amiga e orientadora, Lucivana Prata de Souza Mourão, pelas orientações, apoio e paciência ao longo de todo esse processo, nas sugestões, conversas e críticas, todas foram fundamentais para meu processo de evolução profissional e no aprimoramento deste trabalho. E principalmente sempre oferecendo uma palavra gentil e tranquilidade nos momentos de dificuldade e insegurança. Serei eternamente grata por sua amizade.

A minha coordenadora, Andrea Teixeira Tarragô pelo incentivo, profissionalismo e contribuição no desenvolvimento da dissertação, e exemplo de dedicação na área de pesquisa.

Ao Dr. George Allan Villarouco, por sua e disponibilidade em todos os conselhos e os ensinamentos de durante a minha pesquisa. Contribuindo muito com novas ideias, sugestões excepcionalmente na realização deste estudo.

Eu gostaria de aproveitar este momento para expressar minha sincera gratidão a todos os amigos da genética mais principalmente ao Jhemerson Paes e Deborah Canthé que completaram esses anos de estudo muito mais agradáveis e divertidos mesmos em dias de lutas e vitórias.

Também quero expressar minha gratidão ao colegas do meu trabalho e equipe de Neoplasias mieloproliferativas, que de forma direta ou indiretamente me apoiaram para que eu tivesse um tempo mais tranquilo para leituras, um descanso depois de longas horas de trabalho noturno ou até mais um pouco de paciência em explicações nos programas que não estava muito familiarizada. Meu muito obrigada.

Por fim, expresso minha gratidão à instituição Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de fazer parte do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e pelo suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para realização dos meus estudos de mestrado e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desta pesquisa.

**DECLARAÇÃO DE AGENCIAS FINANCIADORAS**

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

## **EPÍGRAFE**

**E no tempo certo...**

**Deus te dará o que é seu!**



## RESUMO

**Introdução:** As neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativo são alterações hematológicas de características clonais proliferativas que atingem uma ou mais linhagens do grupo mieloide e incluindo o a trombocitemia essencial e a mielofibrose. Apresentando características proliferativas na produção de células megacariocitária, leucocitárias, plaquetas e com similaridade de evolução clínica e alterações de vias de sinalizações, principalmente na via JAK-STAT. A presença das variações no gene *CALR*, modifica a formação estrutural e funcional da proteína Calreticulina, comprometendo as normalidades proliferativas celular na trombocitemia essencial e na mielofibrose. As variantes gene *CALR* estão na região do éxon 09 e são do tipo deleção de cinquenta e dois pares de bases (tipo 1) e ou inserção de cinco pares de bases (tipo 2). Modificando a composição de leitura de bases e dando origem à formação de um novo terminal-C estrutural da proteína, o que contribui para quadros distintos clínicos de trombocitemia essencial e de mielofibrose. **Objetivo:** Rastrear alterações no éxon 09 do gene *CALR* em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose. **Metodologia:** foram incluídos no estudo 69 indivíduos diagnosticados clinicamente com, trombocitemia essencial (n=61) e mielofibrose (n=8). Dados laboratoriais obtiveram-se de coletas de amostras durante o seguimento dos indivíduos. Realizou-se avaliação molecular em Reação em cadeia de Polimerase e Sequenciamento de Sanger para detecção de variantes na região éxon 09 gene *CALR*. Resultados: na éxon 09 do gene *CALR* foram identificadas as variantes rs1555760738 (tipo1) e rs765476509(tipo 2). Dos pacientes com TE (n=61), 4 apresentavam (tipo 1) e 10 com (tipo2), enquanto em MF (n=8), foram identificadas 2 variantes; uma com tipo 1 e outra tipo 2. Ao nível de distribuição, houve uma predominância de TE *CALR* tipo 2. Na análise entre os subtipos TE, os pacientes com tipo 2, apresentando maior contagem de plaquetas e discretas alterações no perfil clínico-laboratorial nos demais investigados. Aos pacientes com MF, a análise seguiu de forma descritivas, composto por um indivíduo *CALR* tipo1 (heterozigose) e um indivíduo *CALR* tipo 2 (homozigose) apresentando diferenças comportamentais laboratoriais em ambas principalmente em produção de plaquetas. **Conclusão:** Na análise entre os subtipos TE, os pacientes com tipo 2 confirmam a associação ao fenótipo de trombocitemia essencial e à elevada produção de plaquetas. Em relação aos indivíduos de MF, que inclui uma homozigose raramente relatada, a associação ao comportamento clínico-laboratorial deve ser melhor mais avaliada. Esses achados confirmam que modificações frameshift gerada por variantes no *CALR* altera a estrutura do domínio-C da proteína calreticulina, o que está envolvido em processos intermoleculares e uma ativação constitutiva na formação de megacariócitos.

**Palavras-chave:** neoplasias mieloproliferativas, *BCR::ABL1* negativo, frameshift, *CALR* tipo 1, *CALR* tipo 2.

## ABSTRACT

**Introduction:** *BCR::ABL1* negative myeloproliferative neoplasms are hematological changes with clonal proliferative characteristics that affect one or more lineages of the myeloid group, including essential thrombocythemia and myelofibrosis. Showing proliferative characteristics in the production of megakaryocytes, leukocytes, platelets and with similar clinical evolution and changes in signaling pathways, mainly in the JAK-STAT pathway. The presence of variations in the *CALR* gene modifies the structural and functional formation of the Calreticulin protein, compromising cell proliferative normalities in essential thrombocythemia and myelofibrosis. *CALR* gene variants are in the region of exon 09 and are of the fifty-two base pair deletion (type 1) and or five base pair insertion (type 2) type. Modifying the base reading composition and giving rise to the formation of a new structural C-terminus of the protein, which contributes to distinct clinical pictures of essential thrombocythemia and myelofibrosis. **Objective:** To track changes in exon 09 of the *CALR* gene in patients with essential thrombocythemia and myelofibrosis. **Methodology:** 69 individuals clinically diagnosed with essential thrombocythemia (n=61) and myelofibrosis (n=8) were included in the study. Laboratory data were obtained from sample collections during the individuals' follow-up. Molecular evaluation was performed using Polymerase Chain Reaction and Sanger Sequencing to detect variants in the exon 09 region of the *CALR* gene. Results: in exon 09 of the *CALR* gene, the variants rs1555760738 (type 1) and rs765476509 (type 2) were identified. Of the patients with TE (n=61), 4 had it (type 1) and 10 had it (type2), while in MF (n=8), 2 variants were identified; one with type 1 and another with type 2. At the distribution level, there was a predominance of TE *CALR* type 2. In the analysis between TE subtypes, patients with type 2, presenting higher platelet counts and discreet changes in the clinical-laboratory profile in the other investigated. For patients with MF, the analysis was descriptive, consisting of a *CALR* type 1 individual (heterozygous) and a *CALR* type 2 individual (homozygous) presenting laboratory behavioral differences in both, mainly in platelet production. **Conclusion:** In the analysis between TE subtypes, patients with type 2 confirmed the association with the essential thrombocythemia phenotype and the high production of platelets. Regarding individuals with MF, which includes a rarely reported homozygosity, the association with clinical-laboratory behavior should be further evaluated. These findings confirm that frameshift modifications generated by *CALR* variants alter the structure of the C-domain of the calreticulin protein, which is involved in intermolecular processes and a constitutive activation in megakaryocyte formation.

**Keywords:** myeloproliferative neoplasms, *BCR::ABL1* negative, frameshift, *CALR* type 1, *CALR* type 2

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Hematopoiese.	21
<b>Figura 2</b>	Representação do processo proliferativo neoplásico.	22
<b>Figura 3</b>	Classificação das neoplasias mieloproliferativas – Organização Mundial de Saúde- 2022.	23
<b>Figura 4</b>	Esquema do processo de megacariocitopoiese.	25
<b>Figura 5</b>	Mecanismo geral da sinalização da via JAK-STAT.	31
<b>Figura 6</b>	Localização e estrutura do gene <i>CALR</i> .	32
<b>Figura 7</b>	Representação dos domínios da calreticulina.	33
<b>Figura 8</b>	Funções da calreticulina e seus efeitos.	34
<b>Figura 9</b>	Estrutura da proteína <i>CALR</i> selvagem e <i>CALR</i> com variantes.	36
<b>Figura 10</b>	Sequência de <i>CALR</i> selvagem e variantes tipo 1 e tipo 2.	37
<b>Figura 11</b>	Visualização da proteína estrutural 3D.	37
<b>Figura 12</b>	Comparação de estrutura de <i>CALR</i> sem mutação e <i>CALR</i> mutada.	39
<b>Figura 13</b>	Interação <i>CALR</i> com receptor de trombopoetina.	40
<b>Figura 14</b>	Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão	47
<b>Figura 15</b>	Fluxograma de atividades do projeto.	48
<b>Figura 16</b>	Desenho dos <i>primers</i> para as regiões de interesse.	50
<b>Figura 17</b>	Eletroferograma com presença das variantes <i>CALR</i>	112
<b>Figura 18</b>	Eletroferograma com presença das variantes <i>CALR rs1049481</i>	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Presença de variantes do gene <i>CALR</i> na trombocitemia essencial	26
<b>Tabela 2</b>	Presença de variantes do gene <i>CALR</i> na mielofibrose	28
<b>Tabela 3</b>	Descrição das alterações estruturais do domínio-C da proteína calreticulina	36
<b>Tabela 4</b>	Variantes no éxon 9 do gene <i>CALR</i>	38
<b>Tabela 5</b>	Aspectos clínicos de variantes tipo 1 e tipo 2 no gene <i>CALR</i>	41
<b>Tabela 6</b>	Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR	52
<b>Tabela 7</b>	Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de sequenciamento	53

**CAPÍTULO I:** *Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Perfil de Variantes no éxon 09 do Gene Calreticulina (CALR) em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose do Estado do Amazonas, Brasil.*

<b>Tabela 1.</b>	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do éxon 09 do gene <i>CALR</i>	61
<b>Tabela 2.</b>	Características epidemiológicas e clínica dos pacientes com TE e MF	63
<b>Tabela 3.</b>	Características laboratoriais de pacientes TE e MF.	65
<b>Tabela 4.</b>	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do éxon 09 do gene <i>CALR</i>	69
<b>Tabela 5.</b>	Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com TE	71
<b>Tabela 6.</b>	Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com MF	72

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Critérios de diagnóstico Organização Mundial de Saúde -2022 para trombocitemia essencial emielofibrose	29
---	----

**CAPÍTULO I:** *Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Perfil de Variantes no éxon 09 do Gene Calreticulina (CALR) em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose do Estado do Amazonas, Brasil.*

<b>Quadro 1.</b> Identificação de variantes no éxon 9 do gene <i>CALR</i> em pacientes com TE e MF.....	68
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

% – Porcentagem  
 % GC – Percentual guanina–citosina A – Adenina  
 AV– Acidente vascular isquêmico  
 BCR::*ABL1* – Rearranjo gênico BCR–ABL1  
 c. – DNA codificante  
 CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética  
 CARL – Gene da calreticulina  
 CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média  
 CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde  
 c-MPL – Receptor de trombopoietina CTH– Células-tronco hematoiética DAU – Dissomia uniparental adquirida DL – Desequilíbrio de ligação  
 DHL – Lactato desidrogenase  
 DHL: Lactato Deidrogenase  
 DNA – Ácido desoxirribonucleico dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados  
 EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid) EPO– Eritropoietina  
 F – Fenilalanina  
 FHEMOAM – Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas FCFB – Fator básico de crescimento de fibroblastos  
 G – Guanina  
 g. – Sequência de referência genômica linear  
 GCP – Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas  
 G–CSFR –Receptor de fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês Granulocyte colony stimulating factor receptor)  
 H – Harpin  
 H2Odd – água destilada dupla  
 Hb– Hemoglobina  
 HCM – Hemoglobina corpuscular média  
 HD – Heterodímero  
 HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee*  
 Ht – Hematócrito  
 IC – Intervalo de confiança  
 ID – Identificador kDa – Quilodalton  
 LIF – Fator inibitório da leucemia LMC – Leucemia mieloide crônica LMA – Leucemia mieloide aguda  
 MAPK – Proteína quinase ativada por mitogênio (do inglês Mitogen activated protein kinases)  
 MF – Mielofibrose  
 MFP – Mielofibrose primária  
 MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio mM – milimolar  
 NaCl – Cloreto de sódio  
 NC – Genoma completo (do inglês Complete genome)  
 NCBI – National Center for Biotechnology Information  
 NMP – Neoplasias mieloproliferativas crônicas  
 OMS – Organização Mundial de Saúde

P13K – Fosfatidilinositol-3<sup>o</sup>-quinase (do inglês Phosphatidylinositol-3-kinase)  
Pb – Pares de base  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas PTPs – Proteína tirosina fosfatase  
PEG – Polietilenoglicol  
Ph – Cromossomo Filadélfia  
PIAS – quinase e os Inibidores de proteína de STATs ativados Ph – Cromossomo Philadelphia  
PT – Tempo de protrombina  
PV – Policitemia vera  
RBC – Contagem de eritrócitos  
rcf – Força centrífuga relativa  
Ref. Seq. – Sequência de referência  
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro  
SD – Selfdímero  
SOCS – Supressoras de sinalização de citocinas  
SMD – Síndrome mielodisplásica  
STAT – Complexo receptor do transdutor de sinal dos fatores de transcrição e ativador da transcrição  
T – Timina  
TGF-  $\beta$  – Fator transformador beta  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TE – Trombocitemia Essencial  
TF – Fatores de transcrição  
Tm – Temperatura de anelamento  
TPO: Trombopoetina  
U - Unidade  
VCM – Volume corpuscular médio  
WBC – Contagem de leucócitos  
 $\mu$ L – microlitro  
 $\mu$ M – micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
2.1. Hematopoiese.....	20
2.2 Neoplasias mieloproliferativas.....	22
2.3 Trombocitemia essencial.....	24
2.4 Mielofibrose.....	26
2.5 Critérios de diagnóstico de trombocitemia essencial e mielofibrose.....	28
2.6 Via de sinalização JAK-STAT.....	30
2.7 Gene <i>CALR</i> .....	31
2.8 Proteína calreticulina.....	32
2.9 Variantes no gene <i>CALR</i> .....	35
2.10 Classificação clínica das variantes <i>CALR</i> .....	40
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
4.1. Objetivo geral.....	44
4.2. Objetivo específico.....	44
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
5.1. Tipo e área de estudo.....	45
5.2. População de estudo.....	45
5.3. Recrutamento dos pacientes.....	46
5.4. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão.....	46
5.5. Aspectos éticos.....	47
5.6. Fluxograma de trabalho.....	47
5.7. Coleta de dados do prontuário.....	48
5.8. Coleta de sangue e armazenamento.....	48
5.9. Extração de DNA.....	49
5.10. Análise molecular.....	49
5.10.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores.....	49
5.10.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	51
5.10.3. Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG).....	52
5.10.4 Sequenciamento.....	53



5.11 Categorização das variantes e análise de novas variantes identificadas .....	53
5.12 Análise estatística.....	54
5.13 Riscos e benefícios .....	54
5.14 Cronograma de atividades .....	55
5.15 Equipe de pesquisa.....	56
5.15 Financiamento e Infraestrutura.....	57
<b>6. RESULTADO E DISCURSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<i>Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Perfil de Variantes no éxon 09 do Gene Calreticulina (CALR) em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose do Estado do Amazonas, Brasil.....</i>	<i>58</i>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
9.1 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	86
9.2 Parecer consubstanciado do projeto Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas.....	90
9.3 Instrumento de coleta de dados.....	95
9.4 Protocolo de extração de DNA .....	96
9.5 Protocolo – Reação em cadeia da polimerase: éxon 09 gene <i>CALR</i> .....	98
9.5.1 Produtos obtidos das Reações em Cadeia da Polimerase – Eletroforese.....	99
9.6 Protocolo: Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG).....	102
9.7 Preparação do mastex mix para sequenciamento .....	103
9.8 Purificação do sequenciamento (Método EDTA/Etanol).....	104
9.9 Preparação de amostras pré-leitura no sequenciador .....	104
9.10 Variantes identificadas por sequenciamento de Sanger.....	105

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais com características proliferativas e contínuas, que acometem uma ou mais linhagem mieloide (1). Apresentam alterações clínicas e celulares de aumento de células eritrocitárias, megacariocíticas, plaquetas e formação de fibrose medular (2,3).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2022 reclassificou as doenças mieloproliferativas com base em novos critérios de descobertas que englobavam avaliações clínicas e genéticas (2). As NMPs são divididas em dois grupos: *BCR::ABL-1* positivo, cuja característica é a presença da translocação do cromossomo 9 e do cromossomo 22 para formação do gene híbrido *BCR/ABL1*, presente na leucemia mieloide crônica (LMC); e *BCR::ABL1* negativo, que não apresentam o gene híbrido *BCR/ABL-1* (2,4).

Das neoplasias mieloproliferativas crônicas *BCR::ABL1* negativo, destacam-se a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose (MF) por compartilharem características comuns, que incluem distúrbios neoplásicos das células-tronco hematopoiéticas, aumento não regulado dos eritrócitos, leucócitos ou plaquetas e tendência para formação de fibrose medular, hematopoiese extramedular ou evolução para leucemia aguda (5). A presença das variações gênicas neste grupo favorece modificações funcionais nas proteínas, que promovem alterações na produção e na maturação celular e com ativação contínua de via de sinalização (6).

As informações epidemiológicas descritas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) destacam a incidência de policitemia vera de 0,84 -1000.000 por habitantes/ano com pessoas de idade média de 60 anos (2,7). Na TE são de 0,2-2,3 para 1000.000 por habitantes/ano, principalmente mulheres entre 50 e 60 anos (2), enquanto a incidência de MF é de 0,5- 1,5 para 1000.000, atingindo um grupo de terceira idade e ambos os sexos (2)(8). No Brasil não há registros oficiais dados Epidemiológicos sobre essas doenças, de forma que grande parte das informações coletadas são estudos realizados por trabalhos desenvolvidos por instituições de pesquisa.

Nos casos da *BCR::ABL1* negativo, as variações somáticas são as que impulsionam o desenvolvimento de diferentes fenótipos. Em 2013, dois estudos verificaram variação gênica em uma única região codificante no éxon 09 do gene calreticulina (*CALR*) em pessoas com TE e MF; e não se identificaram outras variantes no mesmo éxon (4,9,10). Localizado

no cromossomo 19 (19p13.13), o gene *CALR* é responsável por codificar a calreticulina, uma proteína chaperona do retículo endoplasmático que auxilia no armazenamento de cálcio e sinalização, na manutenção homeostática celular, na imunidade celular, na regulação da expressão gênica, na autoimunidade e em diversos processos fisiológicos vitais (11,12).

A proteína calreticulina é formada por três domínios estruturais e funcionais: domínio-N com a ligação de um grupo amino; domínio-P; e domínio-C contendo uma sequência de aminoácidos KDEL (lisina, aspartato, glutamato e leucina). As variações no gene *CALR* alteram a formação da estrutura da proteína, a partir da retirada da sequência de aminoácidos KDEL e gerando um novo terminal-C (12). Embora a proteína calreticulina não seja uma molécula da via de sinalização JAK-STAT, em casos de modificação estrutural, a interação com o receptor de trombopoetina (MPL) por meio do novo terminal-C, promove a ativação na via JAK-STAT independentemente de ligações de citocinas ou de fatores de crescimento, contribuindo assim para a patogênese de TE e MF (13).

Atualmente estão descritas mais de 150 variações gênicas diferentes no gene *CALR*. Dentre essas variações, as principais identificadas são deleção de 52 pares de bases (del52), denominada tipo 1, e inserções de cinco pares de bases (ins5), denominada tipo 2 (14,15). As variações do gene *CALR* tipo 1 e tipo 2 contribuem para o desenvolvimento de diferentes características fenotípicas, isso ocorre devido à alteração na estrutura da proteína, que é influenciada pela nova composição de aminoácidos de cargas básicas e ou neutras no novo terminal-C (14,16).

Uma análise mais minuciosa dessas patologias permitirá compreender se existe uma correlação de variantes do gene *CALR*, e um possível contribuição para o surgimento da TE e MF (13,14,17).

Este projeto visa à identificação das variantes e à determinação de sua frequência no éxon 09 do gene calreticulina (*CALR*) em pacientes com TE e MF, além de suas possíveis influência ao surgimento da patogênese da doença em pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM). Este estudo permitirá trazer novos direcionamentos de abordagem ao diagnóstico e ao prognóstico de TE e MF assim como adicionar novas informações sobre variantes do gene *CALR*.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

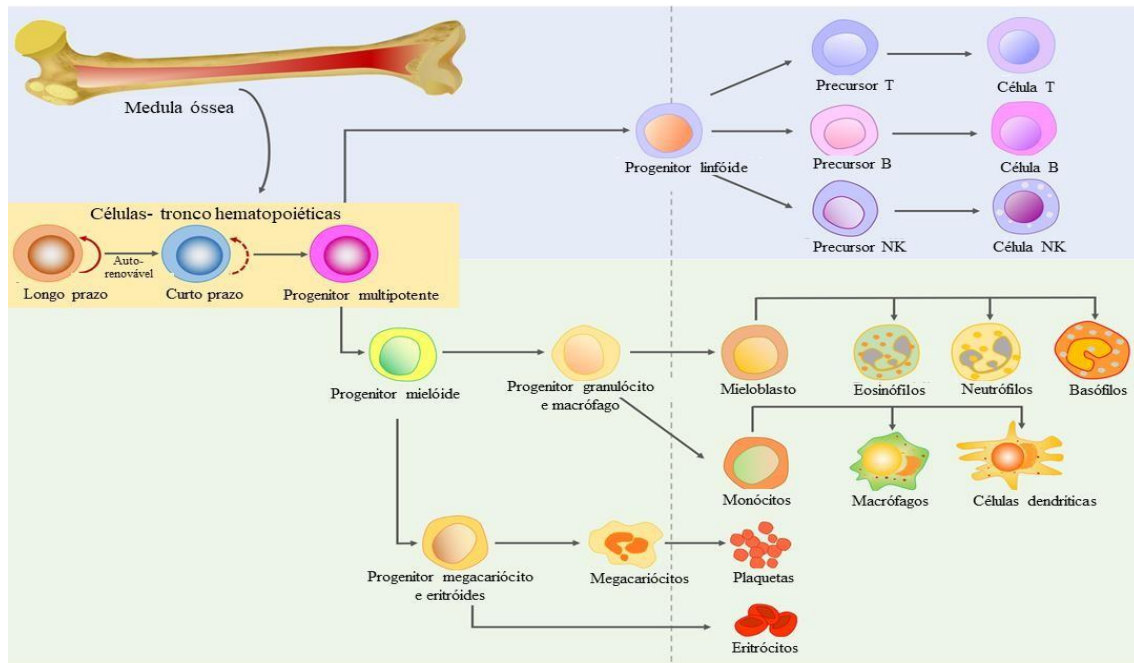
### **2.1. Hematopoiese**

A hematopoiese é processos envolvidos na produção de células sanguíneas a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTH) ou precursoras, assim como suas subsequentes diferenciações, multiplicação e maturação do desenvolvimento celular (18).

O processo hematopoiético inicia-se nas primeiras semanas do período embrionário no saco vitelino, seguindo em órgão específico como baço e fígado – período conhecido como hepatoesplênico; em seguida, passa a ser realizado na região esponjosa interna do osso – conhecido como período medular –, após o nascimento e durante toda a fase adulta (18,19). As CTH são as únicas células dentro do sistema hematopoiético que possuem um potencial de multipotência, com a capacidade de diferenciar-se em todos os tipos de células sanguíneas funcionais, enquanto a autorrenovação permite a capacidade das CTH darem origem a filhas idênticas sem uma diferenciação celular (20) (Figura 1).

A presença das CTH e de células progenitoras na região da medula óssea (MO) é essencial para regeneração do sistema hematopoiético em pacientes com doenças genéticas, imunológicas/ou hematológicas. É a medula óssea o local de formação das células-tronco hematopoiéticas e de várias células progenitoras hematopoiéticas, bem como a regulação de funções biológicas importantes como a autorrenovação, a migração, a proliferação e a capacidade de multilinhagem (20). Durante a hematopoiese, ocorrem as divisões das principais linhagens celulares de progenitores comuns – mieloide e linfóide.

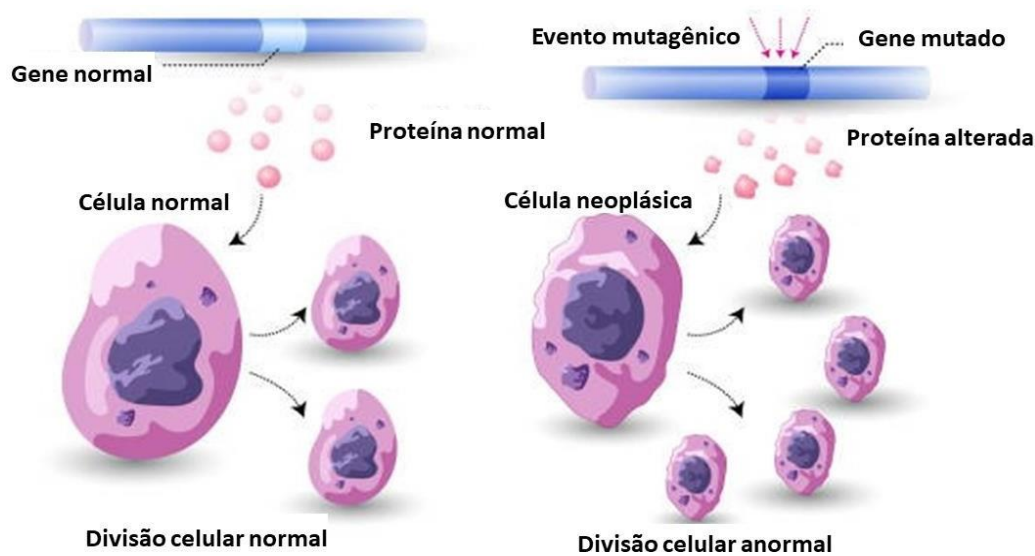
A unidade progenitora mieloide passa a ser responsável pela produção das células de linhagem granulocítica, linhagem eritrocitária (precursores de hemácias) e linhagem megacariocítica (precursores de plaquetas); e o progenitor linfóide é responsável pela produção de linhagem linfocitária (21).



**Figura 1:** Modelo do sistema hierárquico de autorrenovação e diferenciação. Progenitores multipotentes das células de grupo: linhagem mielóide e linhagem linfóide. **Fonte:** Zhang, 2019 (20) Adaptado.

As variações genéticas comprometem a formação e a maturação hematopoiéticas normais e favorecem o aparecimento de alterações patológicas como neoplasias, leucemias, mielodisplasias, podendo chegar ao estágio de comprometimento total da função da medula óssea (4).

Um dos principais fatores para o desencadeamento de mieloproliferação celular é a presença de variações em genes que afetam a produção de diferentes componentes do sistema biológico (Figura 2). As variantes gênicas são classificadas como substituição de bases, inserções e deleções ou translocação de bases nucleotídicas – podendo contribuir para a impacto clínica das neoplasias mieloproliferativas (4).



**Figura 2:** Processo proliferativo **Fonte:** Idarin, 2022 (22) Adaptado.

## 2.2 Neoplasias mieloproliferativas

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um grupo de doenças que apresenta, proliferação monoclonal, heterogênicamente e contínua das células-tronco-hematopoiéticas. Caracterizada por um aumento na produção independente de estímulos fisiológicos, pode afetar uma ou várias linhagens mielóides, incluindo as células granulocíticas, eritróides e megacariocíticas (1).

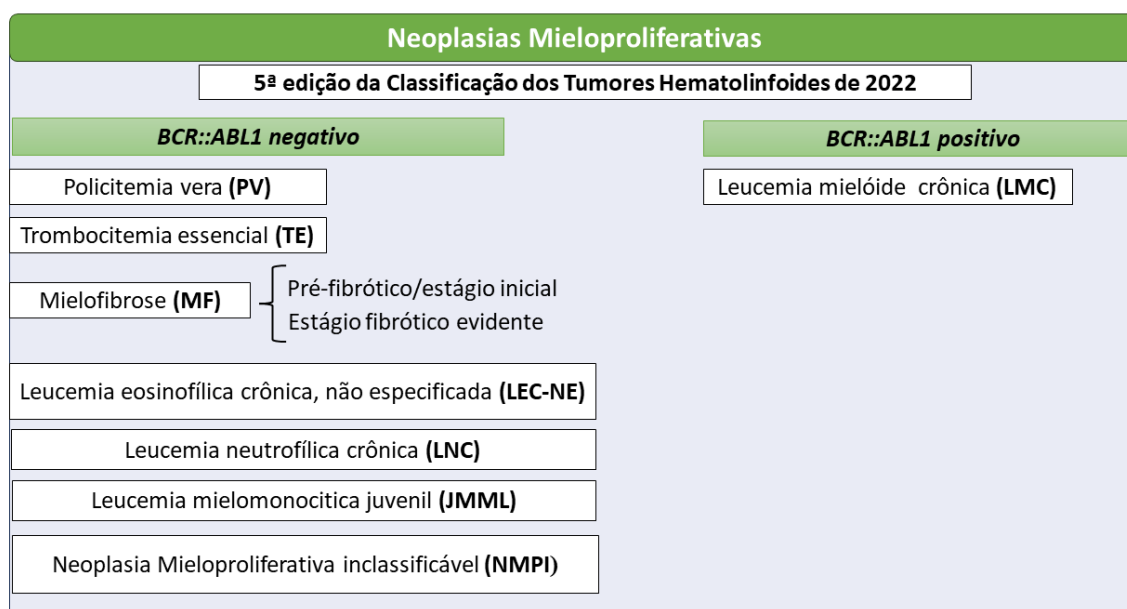
Inicialmente, as NMPs se manifestam com quadro clínico de hiperplasia medular, com progressiva maturação das células hematopoiéticas e o aumento no quantitativo de granulócitos, de eritrócitos e/ou de plaquetas no sangue periférico. A maior incidência está entre a quinta e a sétima década de vida, embora possa ocorrer alguns subtipos em crianças. A taxa de incidência anual de todos os subtipos é de seis casos para 100.000 habitantes (2,3,7).

Em 1951, William Dameshek descreveu essa possível similaridade entre um grupo de doenças com características proliferativas de células hematopoiéticas e sugeriu que essas enfermidades fossem agrupadas em uma mesma categoria de distúrbios mieloproliferativos. Propôs ainda que essas alterações mieloproliferativas compartilhavam “um estímulo até então desconhecido” (4,23). A partir desse fato, surgiram pesquisas de bases genéticas de patogênese que permitiriam reclassificar as doenças mieloproliferativas (4).

A última edição de 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS), introduziu

novos critérios para classificar as neoplasias mieloproliferativas, com base à novos avanços médicos descritos no “WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues” (2,3). Estes novos parâmetros envolvem a incorporação de dados laboratoriais, marcadores genéticos e informações clínicas, resultando em uma nova reestruturação de classificação destas doenças (2,3).

As NMPs estão classificadas em dois grupos, com a presença ou com a ausência do cromossomo Philadelphia (*BCR/ABL*). No grupo das *BCR/ABL* positivo, a leucemia mielóide crônica – LMC (*BCR::ABL1* positivo), apresentam a formação do cromossomo Philadelphia a partir da translocação recíproca envolvendo o gene *c-abl* no cromossomo 9; e o gene *bcr* no cromossomo 22 (2,3,24). E as *BCR::ABL1* negativo, que incluem as demais neoplasias mieloproliferativas como leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), leucemia eosinofílica crônica (LEC-NE), neoplasias mieloproliferativas não classificáveis (NMPI), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF) (2,25,26) (Figura 3).



**Figura 3:** A nova proposta de Classificação das Neoplasias Mieloproliferativas – OMS 2022 . **Fonte:** Swerdlow S. *et al.*, Berti et al. (2,3). Adaptado.

Observou-se que, das *BCR::ABL1* negativo, a PV, TE e a MF compartilhavam um estreitamento de relações de eventos transicionais de evolução, de uma doença para outra durante seu curso de evolução (19).

Essas três doenças *BCR::ABL1* negativo apresentam características em comum: uma associação de eventos clonais de origem tronco-hematopoiética que atingem linhagens distintas, causados pelas presenças de variações em gene que alteram vias de sinalizações para proliferação celular normal(4,27). Dentre as NMPs as *BCR::ABL1* negativo, destaca-se para o presente estudo a TE e a MF.

### 2.3 Trombocitemia essencial

A trombocitemia essencial (TE) é uma doença clonal, que afeta a produção das células da linhagem mieloide, apresentando aspectos proliferativos que acometem a linhagem megacariocítica, levando ao aumento de plaquetas circulantes e a uma hiperplasia medular óssea de megacariócitos (19,28).

Em 1934, foi descrita como uma síndrome clínica distinta por Emil Epstein e Alfred Godel, tendo sido renomeada em 1951 e classificada como neoplasia mieloproliferativa *BCR::ABL1* negativo. Foi classificada segundo bases delineadas por William Dameshek, de observações em pacientes que apresentavam grande quantidade de plaquetas juntamente com uma hiperplasia de megacariócitos, sem eritrocitose ou leucoeritroblastose (28).

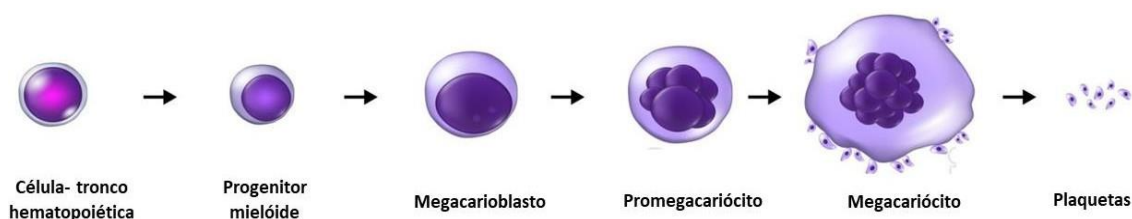
A trombopoese é o processo de formação das plaquetas a partir das células maduras dos megacariócitos para a circulação (29) (Figura 4). Na qual o principal estimulador no processo de proliferação é a presença do hormônio chamado trombopoetina, juntamente com a ligação do receptor trombopoetina na superfície celular.

A trombopoetina (TPO) é o hormônio estimulante glicoproteico, produzido no fígado e nos rins, sendo responsável pela regulação de produção dos megacariócitos na medula óssea e pela sua fragmentação em plaquetas. Tendo a plaqueta uma média de vida de dez dias (30,31). Além disso a molécula TPO contém similaridades estruturais a da eritropoetina (EPOR), fator estimulante de colônias granulocitárias (G-CSF), fator inibitório da leucemia (LIF) e interleucinas (IL 3, IL6 e IL11) que favorecem estímulos de proliferação e de maturação dos megacariócitos (30).

Codificado pelo gene *MPL*, localizado no cromossomo 1 na posição 1p34.2, o receptor de trombopoetina (c-MPL) está envolvido na via de sinalização Janus quinase-transdutora de sinais ativadores de transcrição (JAK-STAT), desempenhando um papel importante na renovação hematopoiética das células progenitoras CD34+, na diferenciação



megacariocítica e na formação de plaquetas (13,31).



**Figura 4:** Esquema do processo de megacariocitopoese. **Fonte:** Idarin 2022 (22). Adaptado.

As informações epidemiológicas segundo a OMS, foi observada uma incidência anual de pacientes diagnosticados na região da Europa e nos Estados Unidos de 0,2-2,3 casos por 100.000 habitantes (2). Estudos epidemiológicos realizados na população da Coreia com neoplasia mieloproliferativa revelaram uma alta incidência em casos de TE de 2,4 casos para 100.000 habitantes por ano (13), enquanto nos Estados Unidos e na Europa foi de 0,6 a 2,5 para 100.000 pessoas por ano (32). Dados epidemiológicos divergem conforme as diferenças entre gênero, idade e etnia para cada local estudado (33). No Brasil, não há registros oficiais para TE até o momento. (33).

Segundo a OMS, os portadores de TE apresentam uma idade mediana que varia entre 50 e 60 anos, com prevalência no sexo feminino, com uma segunda incidência por volta dos 30 anos de idade (2,3). A maioria dos pacientes são assintomáticos até seu diagnóstico, mas podem apresentar eventos clínicos como trombose, acidente vascular isquêmico (AV), hemorragias em superfícies de mucosas ou vaso- isquemia e presença de esplenomegalia e hepatomegalia (33).

Os parâmetros laboratoriais apresentados para TE são um aumento da contagem de plaquetas, com valores superiores a  $450 \times 10^9 \text{ /L}$ , presença de megacariócitos grandes e maduros na medula (2,3,25,34). Sua evolução tardia para LMA (leucemia mieloide aguda) e MF secundária é possível, porém rara (35).

Um estudo internacional, revelou a taxa de sobrevivência de 10 anos e evolução de TE para MF ou LMA ocorre em cerca de 0,8% a 12,3% e 0,7% a 5,8%, respectivamente (35–37). Com base nas possíveis complicações clínicas, a TE é passível de controle sendo classificada como uma doença mieloproliferativa clonal benigna (32).

Recentemente, avanços científicos têm enriquecido a compreensão da TE, envolvendo a sinalização e desencadeando a mieloproliferação por ativação constitutiva de

complexos formados por fatores de crescimento e seus receptores (6,38).

Estudos genéticos foram realizados em pacientes com TE com o objetivo de identificar sua possível origem. A detecção de variantes no gene *JAK2* (*JAK2V617F*) foi inicialmente observada, e estudos complementares revelaram variações no gene *MPL* e no gene *CALR* (calreticulina) (28,39).

Observaram-se frequências distintas para cada gene. A taxa de pacientes com TE que carregam a variante *JAK2V617F* é de 50% a 60%; para o gene *CALR*, 30%; e, para casos de *MPL*, 3%. No entanto 12% dos casos trombocitemia essencial são de triplo-negativo (2) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição de variantes presente na trombocitemia essencial

Condutor de sinalização	Localização	Frequência	Consequência
<i>JAK2(JAK2V617F)</i>	9p24	50-60% TE	Aumento dos eritrócitos, plaquetas e produção de granulócitos
<i>CALR</i>	19p13	20-25 % TE	Aumento na produção de plaquetas
<i>MPL</i>	1p34	2%-3% TE	Aumento na produção de plaquetas

**Fonte:** Swerdlow S. *et al.*, (2). Adaptado.

A consequência da presença das variantes sobre a divisão celular e sua identificação molecular ainda estão obscuras. Diante desse fato, investigações sobre as variações gênicas são de extrema importância para complementar um diagnóstico genético juntamente com outros critérios clínicos para a compressão da evolução e progressão da TE em relação a outras neoplasias mieloproliferativas.

#### 2.4. Mielofibrose

A mielofibrose (MF) é uma doença clonal da transformação neoplásica da célula-tronco-hematopoiética, acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular, com uma fibrose colagênica, osteosclerose e angiogênese (1).

O cirurgião alemão Gustav Heuck, em 1870, foi o primeiro a descrever a MF ou

metaplasia mieloide agnogênica como uma doença hematológica maligna crônica (40). Em 1940, a denominação de metaplasia mieloide agnogênica foi usada pela primeira vez; no ano de 2001, a OMS utilizou o termo mielofibrose idiopática crônica e mielofibrose com metaplasia mieloide; e, em 2006, o Internacional Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment chegou à aceitação da nomenclatura exclusiva de MF (41).

Na MF, formação da fibrose óssea surge de alterações celulares no ambiente medular, resultante de fibroblastos anormalmente estimulados e pelos múltiplos fatores de crescimento de citocinas, que são estes: TGF- $\beta$  (fator transformador beta), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), calmodulina, EGF (fator de crescimento epidérmico), interleucina-1 e FCF $\beta$  (fator básico de crescimento de fibroblastos) que por sua vez estimulam a proliferação não clonal de fibroblastos e resultam em fibrose medular (30,42–44).

A MF afeta ambos os sexos de forma igualitária, e o aparecimento da patologia ocorre na faixa etária de 60 a 70 anos, com incidência anual de 0,5 a 1,5 de casos para 100.000 habitantes (25). As características clínicas primárias são mais lentas, com progressão no decorrer do tempo, o que inclui anemia, eventos trombóticos, plaquetopenia e hematopoiese extramedular. Os sintomas secundários ou sintomas constitucionais incluem fraqueza, cansaço, palpitação, dispneia, tonturas, dor, desconforto abdominal, perda de peso, sudorese e sangramentos (2,3).

No quadro hematológico, ocorre a proliferação clonal das linhagens megacariocíticas, produzindo células de características atípicas em tamanho, com alteração do núcleo/citoplasma, casos de leucopenia e leucocitose; na morfologia das hemácias, observa-se poiquilocitose, dacriócitos além de eritroblasto e variação na quantidade de plaquetas e macroplaquetas (1,31).

Dentre as manifestações mais comuns à MF está a hepatoesplenomegalia, que resulta em uma hematopoiese extramedular. Esta atividade ocorre predominantemente no baço, produzindo uma hiperplasia na região da polpa vermelha do órgão. Em alguns casos, a progressão pode ser fatal, manifestando-se por anemia profunda, hemorragias frequentes e infecções na fase final (31).

Por apresentar uma proliferação de células mieloides e megacariócitos na medula óssea, a clínica da MF é dividida em duas etapas de evolução: fase pré-fibrótica, que apresenta características de hiperproliferação celular na medula óssea e evolui uma

quantidade mínima de fibrose reticulínica ou colagênica (1–3); e fase fibrótica evidente, em que ocorre a substituição total do tecido hematopoiético por um tecido rico em fibras de reticulínicas (1,45). As características clínicas da MF são diversificadas dependendo do seu grau e da sua evolução (25,46).

A MF é uma doença geneticamente complexa, de proliferação anormal, devido à ativação constitutiva de vias de sinalização provocada por rearranjos genéticos que interferem na funcionalidade de proteínas e nas atividades sinalizadoras (44). No processo patológico, a variante no gene *JAK2* (*JAK2V617F*) está presente em 50-60% dos pacientes afetados pela doença; 30% estão associados com gene *CALR*; 8%, com a variante do gene *MPL*; e cerca de 12% são casos descritos como triplo- negativo em mielofibrose (2,3) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Distribuição de variantes presente na mielofibrose

Condutor de sinalização	Localização	Frequência
<i>JAK2</i> ( <i>JAK2V617F</i> )	9p24	50-60% MF
<i>CALR</i>	19p13	30% MF
<i>MPL</i>	1p34	8% MF

**Fonte:** Swerdlow S. *et al.*, (2). Adaptado.

As informações coletadas de relevância clínica, genética e laboratorial têm sido constantemente atualizadas e incluídas na classificação da OMS, o que permite um direcionamento na identificação e na padronização de tratamentos para os casos de TE e MF trazendo um aumento na confiabilidade e na reprodutibilidade dos diagnósticos (2,3).

## 2.5 Critérios de diagnósticos da trombocitemia essencial e mielofibrose

A OMS em sua nova edição de 2022, estabeleceu padrões de critérios avaliativos para o diagnóstico da TE e MF, a partir de novas informações médicas, critérios moleculares e características morfológicas da doença. Os critérios avaliativos são divididos em maiores e menores (2,3) (Quadro 1).

<b>Critérios da OMS 2022 para trombocitemia essencial</b>	
<b>Critérios maiores</b>	<b>Critérios menores</b>
1. Plaquetas > 450 x 10 <sup>9</sup> /L 2. Biópsia de MO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número e do tamanho dos megacariócitos com hiperlobularidade nuclear. Sem aumento significativo ou desvio à esquerda na granulopoese neutrofílica ou na eritropoese e raríssimo aumento pequeno na fibra reticulínica (de grau 1). 3. Ausência dos critérios da OMS para LMC <i>BCR-ABL+</i> , PV, MF, SMD ou outras neoplasias mieloides. 4. Presença das mutações <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>	1. Presença de um marcador clonal ou ausência de evidência para trombocitose reativa.
<b>Critérios da OMS 2022 para mielofibrose pré-fibrótica</b>	
<b>Critérios maiores</b>	<b>Critérios menores</b>
1. Proliferação e atípica atividade megacariocítica, sem fibrose reticulínica, acompanhada do aumento da celularidade da MO para a idade; proliferação granulocítica; e frequente diminuição da eritropoese. 2. Ausência dos critérios para LMC ( <i>BCR-ABL1+</i> ), PV, TE, síndrome mielodisplásica ou outras neoplasias mieloides. 3. Presença das mutações no gene <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ou ausência dessas mutações; presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa.	1. Anemia não atribuída a uma condição de comorbidade. 2. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$ . 3. Esplenomegalia palpável. 4. LDH elevada (desidrogenase láctica).
<b>Critérios da OMS 2022 para mielofibrose evidente</b>	
<b>Critérios maiores</b>	<b>Critérios menores</b>
1. Proliferação e atípica megacariocítica, acompanhada de fibrose reticulínica e/ou de fibrose colagênica de graus 2 ou 3. 2. Ausência dos critérios para LMC ( <i>BCR-ABL1+</i> ), PV, TE, de síndrome mielodisplásica ou de outras neoplasias mieloides. 3. Presença das mutações no gene <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> ou ausência dessas mutações; presença de outro marcador clonal ou ausência de fibrose reativa.	Presença de pelo menos um dos seguintes critérios, confirmados em duas determinações consecutivas: 1. Anemia não atribuída a uma condição de comorbidade. 2. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$ . 3. Esplenomegalia palpável. 4. LDH elevada (desidrogenase láctica). 5. Leucoeritroblastose.

**Fonte:** Swerdlow S. *et al.*, Berti et al. (2,3). Adaptado.

A inclusão de estudos genéticos como uma das formas de abordagem para diagnóstico da TE e MF pela OMS ampliou o poder de observação dessas variações gênicas, que estimulam e promovem alterações estruturais e funcionais, gerando complicações durante o processo proliferativo celular, principalmente em uma via em comum, conhecida como

JAK-STAT (13,47).

## 2.6 Via de sinalização JAK-STAT

Responsável pela transmissão de uma multiplicidade de sinais do exterior da célula para o núcleo, a via de sinalização JAK-STAT permite um mecanismo mais direto na regulação de processos da homeostasia, da hematopoiese, da apoptose e da imunidade celular (48,49).

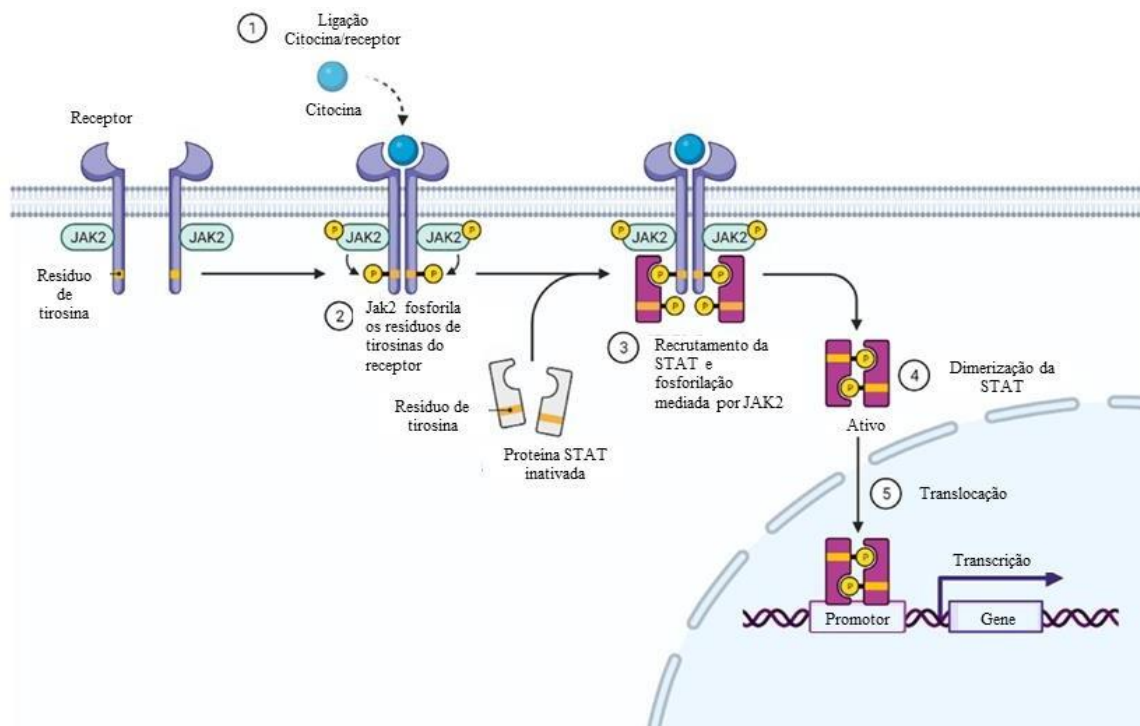
A via sinalização JAK-STAT está dentre as vias mais simples e conservadas, com a presença de duas proteínas principais: as JAKs e as proteínas STATs, que atuam diretamente na região intracelular nas ligações de citocinas (50). Algumas das principais citocinas e fatores estimulantes presentes e ativos nas doenças proliferativas hematológicas são a EPOR, TPO, G-CSF, prolactina e interferon. E, em casos de ausência ou de variação genética em alguns desses componentes atuantes na via JAK-STAT, compromete-se o equilíbrio e a sua funcionalidade normal, favorecendo o surgimento de doenças e/ou a expressão de mediadores críticos (47).

A ativação de JAK-STAT inicia-se pela conexão de citocinas ou de fatores estimulantes de crescimento com receptores da transmembrana celular (48) (Figura 5). A ligação resulta na dimerização do receptor e na ativação subsequente da tirosina quinase (JAK), que está associada ao receptor (50). Essas JAKs ativadas então fosforilam resíduos de tirosina na cauda do receptor, promovendo a criação de locais de ancoragem para o transdutor de sinais e fatores da transcrição (STAT)(47,50,51) . Assim ocorre a fosforilação das STATs pelas JAKs, e são dimerizadas as STATs, que deixam o receptor seguindo o caminho ao núcleo, ligando a sequência regulatória específica para ativar a transcrição de gene (47).

A regulação da via JAK-STAT também é mediada por reguladores negativos como a proteína tirosina fosfatase (PTPs), que retira os grupos fosfatos das JAKs e STATs; as proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS), que se ligam diretamente e inativam a quinase; e os inibidores de proteína de STATs ativadas (PIAS), que se ligam a dímeros STATs fosforilados, o que impede o reconhecimento de DNA (47,51)

Existem outras vias de sinalização que podem desencadear atividades oncogênicas como a fosfatidilinositol 3'-quinase PI3K/Akt/Mtor e a via receptora tirosina quinase RTK /Ras/MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), que promovem ainda mais a

proliferação, a sobrevivência e a diferenciação, além da resposta imune e inflamatória (48,51,52)

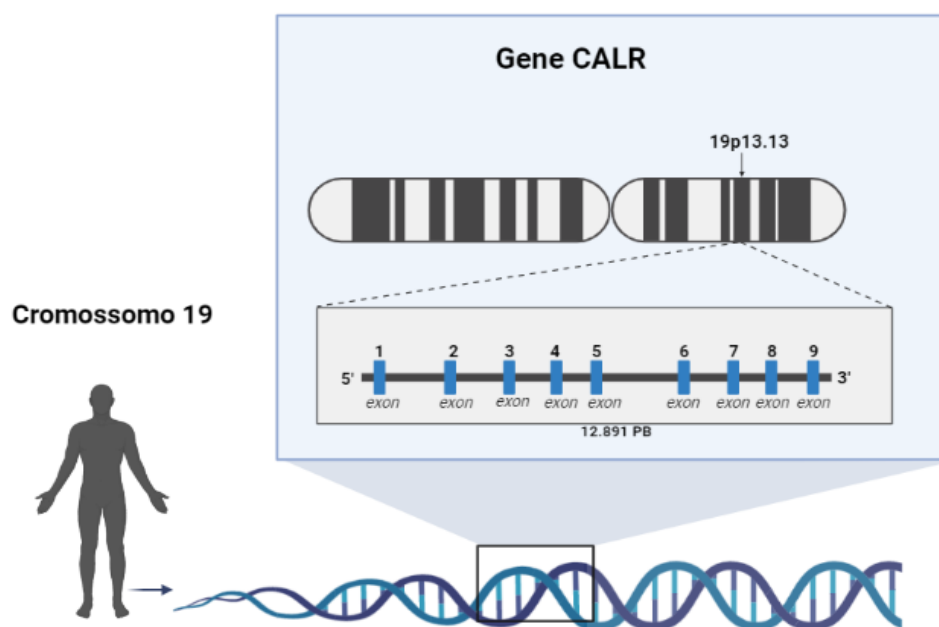


**Figura 5:** Representação do mecanismo geral da sinalização da via JAK-STAT. As citocinas ligam-se a receptores, que são constitutivamente ligados a JAKs, que, ativadas, geram uma mudança conformacional no receptor, que permite a autofosforilação das duas Jaks ligadas. Estas, por sua vez, fosforilam para gerar sítios de ligação para proteínas STAT. As JAKs também fosforilam as proteínas STAT, que se dissociam do receptor e formam dímeros que se translocam ao núcleo, onde regulam a expressão gênica. **Fonte:** M. Bader *et al.*, 2022 (52) e Torres DG *et al.*, 2022 (7). Adaptado.

O processo do surgimento de eventos neoplásicos clonais envolvendo a TE e MF ainda está em fase de descrição sobre o mecanismo proliferativo. Estudos direcionados para bases genéticas e moleculares revelaram a participação da proteína chaperona calreticulina codificada pelo gene *CALR*.

## 2.7 Gene *CALR*

O gene da calreticulina ou gene *CALR* (HGNC:1455; Refseq:LRG\_828: NCBI: NG\_029662.1) contém 12.981 pares de bases (pb), localiza-se no cromossomo 19 (19p13.13) e possui nove éxons e oito íntrons (53) (Figura 4).



**Figura 6:** Localização e estrutura do gene *CALR*. **Fonte:** Autoria própria.

O gene *CALR* é responsável por codificar a proteína multifuncional calreticulina (*CALR*) presente no lúmen do retículo endoplasmático (RE), podendo ser encontrado em células eucarióticas (exceto hemácias, que não possuem retículo endoplasmático) e nas regiões da membrana celular (54,55).

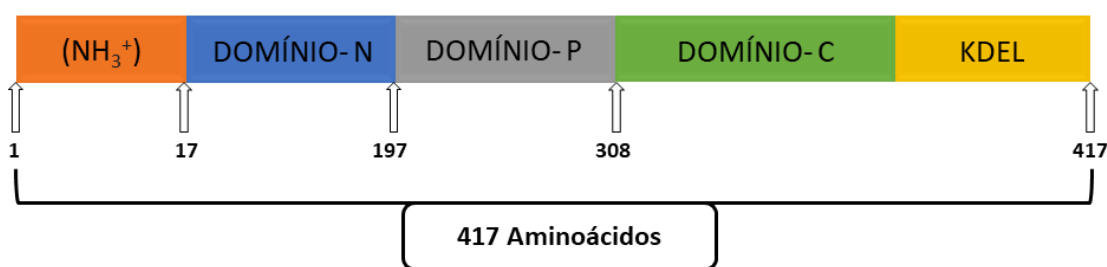
## 2.8 Proteína calreticulina

A calreticulina foi descoberta em 1974 por Thomas Ostwald e David MacLennan durante uma investigação de proteínas que se ligavam ao cálcio no retículo sarcoplasmático em células musculares. E, durante algum tempo, trabalhos e experimentos com outras sequências conhecidas de diferentes organismos foram desenvolvidas para identificar a verdadeira identidade da proteína de forma que concluíram que ela apresentava grande importância na fisiologia celular (53). O nome “calreticulina” foi dado devido à capacidade de ligação aos íons de cálcio e à particularidade de sua localização no retículo sarcoplasmático/endoplasmático (56).

A proteína calreticulina contém um peso molecular de 46 kDa e é composta por 417 aminoácidos. Sua estrutura é dividida em três domínios estruturais e funcionais: domínio N; domínio P; domínio C; e nas extremidades há um grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) e um sinal de retenção (ER) (11,56) (Figura 7).



## Proteína Calreticulina



**Figura 7:** A representação dos domínios da calreticulina. **Fonte:** Andrea P.*et al.*, 2018(53). Adaptado.

A região denominada domínio-N apresenta uma atividade chaperona envolvida no dobramento correto de proteínas e na ligação estrutural ao grupo amino (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). O local contém sequência de aminoácidos altamente conservada que permite o dobramento globular de forma estável e regiões funcionais de ligação com peptídeos, carboidratos, um local de ligação para zinco (Zn<sup>2+</sup>) e um local de ligação para dissulfeto (11,54).

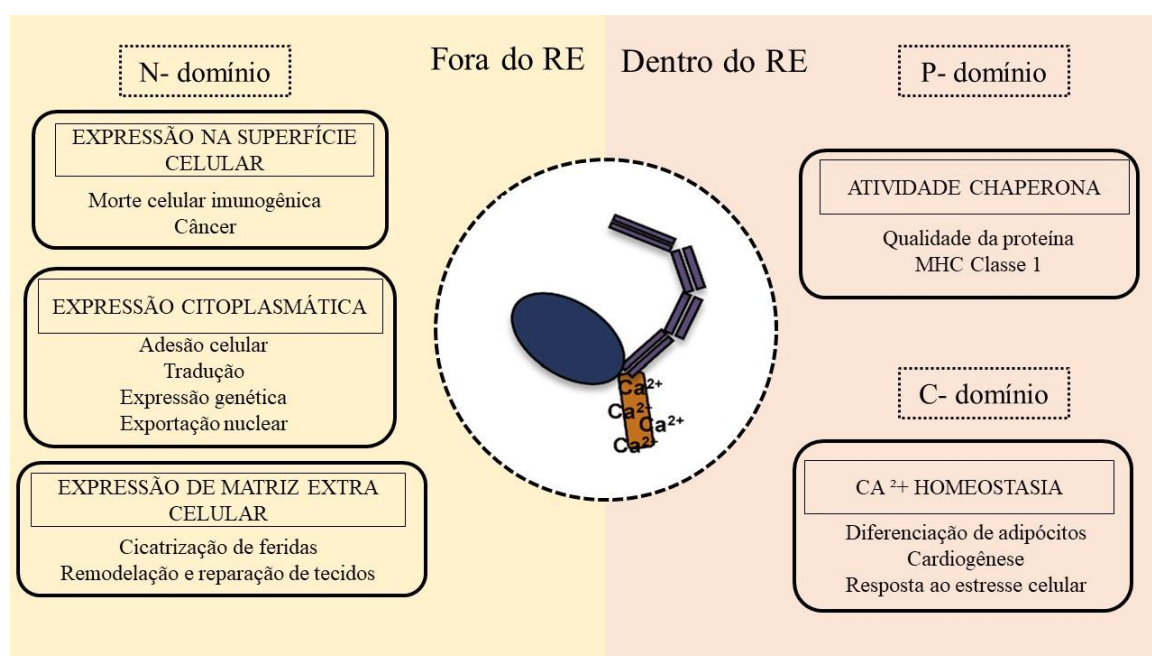
O domínio-P ou domínio intermediário é responsável pela função chaperona, formando um grande braço estendido e interage com outras chaperona dentro do lume do RE, apresentando uma grande quantidade de aminoácidos do tipo prolina (57). Esta região contém áreas de ligação de alta afinidade por cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e baixa capacidade para cálcio (Ca<sup>2+</sup>), apresentando repetições de sequências de aminoácidos e estruturas lecitina-like, responsáveis pela função de enovelamento proteico (11,54). Importante destacar que o domínio N e P são responsáveis pela função chaperona (57).

Responsável pela atividade de tamponamento, o domínio-C contém múltiplas regiões de ligação de alta capacidade e baixa afinidade com cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e está envolvido na homeostase celular desse íon. Sua estrutura tem formato de alfa hélice e presença de aminoácidos ácidos (cargas negativas) (58). Junto ao domínio-C, temos o sinal de retenção (ER) com uma sequência de peptídeos composta de lisina (K), aspartato (D), glutamato (E) e leucina (L), a qual serve como um sinal de retenção para o Ca<sup>2+</sup> no RE (12,54).

A função exercida pela proteína CALR em processos celulares depende de sua localização. Na região intracelular, atua como proteína de ligação ao cálcio dentro do retículo endoplasmático, no dobramento das proteínas recém-sintetizadas para que exerçam suas funções intracelulares corretamente e na regulação da transcrição dentro do núcleo da célula (59). Juntamente com outras chaperonas e fatores de dobramento para a

montagem do complexo de histocompatibilidade da classe 1 (MHC1) e retém complexos montados incompletos (11). Na homeostase, a calreticulina atua na regulação e armazenamento na ligação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pelos domínios-P e -C; e na neutralização osmótica em níveis altos de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e uréia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ). Contribui também no desenvolvimento do coração, na diferenciação celular e adipócitos (53,58)

Na região extracelular, a proteína CALR pode ser encontrada na área do citosol citoplasmático e na superfície celular (54,55), envolvida na regulação de adesão celular por presença de sequência de sinais do domínio estrutural, em processo de tradução, expressão gênica e nuclear (54). Na superfície da célula a proteína CALR contribui tanto para a apresentação de antígeno, quanto para a ativação do complemento, remoção das células apoptóticas, imunogenicidade da morte de células cancerosas e cicatrização de feridas (11) (Figura 8).



**Figura 8:** Um resumo das funções da calreticulina e seus efeitos na saúde e nos sistemas relacionados a doenças. **Fonte:** Wang W-A *et al.*, 2012. (58). Adaptado.

Com a presença de diferentes fenótipos de doenças e com a ausência de variantes de gene *JAK2* (*JAK2V617F*) e de gene *MPL* em neoplasias mieloproliferativas *BCR::ABL1* negativo, propôs-se que variações em gene *CALR* contribuam para o surgimento de alterações na via de sinalização JAK-STAT e para a formação da patogênese da TE e MF (59–61).

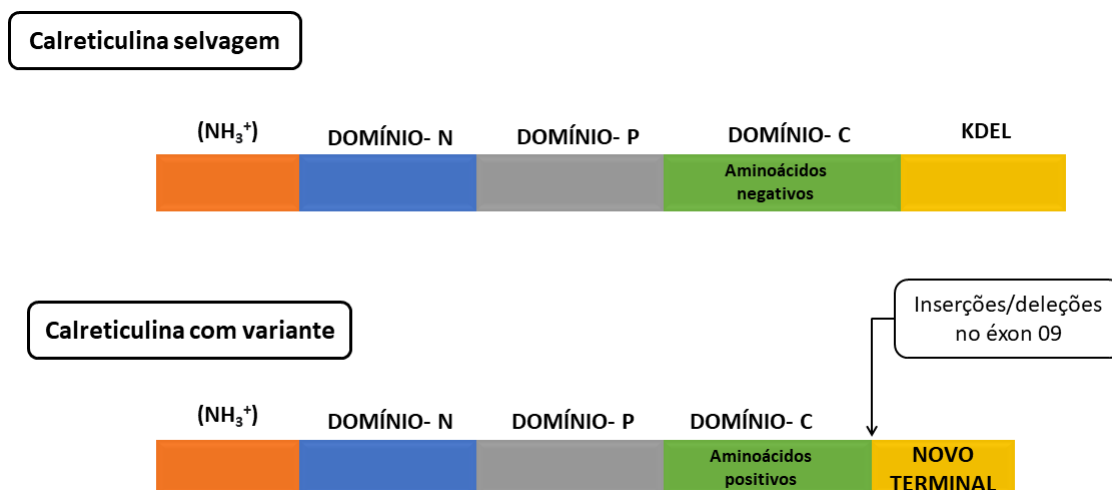
## 2.9 Variantes no gene *CALR*

Em 2013, duas equipes de pesquisas distintas, liderado por Nangalia J. et al e Klampf et al, realizaram uma análise genômica de exoma completo por rastreio. E constataram que os pacientes com TE e MF, que não apresentavam variantes em genes *JAK2* e *MPL*, expressavam variantes no gene *CALR*.

Essas variantes consistiam em mutações somáticas, dos tipos deleção de bases e inserção de bases nitrogenadas na região do éxon 09 do gene, provavelmente envolvidas no surgimento dessa neoplasia (9,10).

As variações genéticas identificadas do gene *CALR* no éxon 09 estão especificamente associadas à TE e MF (10). E têm um efeito comum de um *frameshift* (alteram a sequência de leitura) de 11 pb, representado por inserção e/ou por deleção, o que afeta a matriz de leitura dos aminoácidos para a formação de um novo terminal-C (16). Consequentemente, a formação inicial da proteína calreticulina apresentará modificações, trazendo uma atividade anormal nas ligações de cálcio, gerada por mudança de quadro estrutural e funcional do domínio-C, e ativação constitutiva da via JAK -STAT ao interagir ao receptor MPL conferindo autonomia no crescimento celular das células progenitoras e precursoras megacariocíticas e granulocíticas (10,53,59,62).

A proteína *CALR* selvagem é composto por aminoácidos ácidos (cargas negativas). No surgimento de variantes no gene *CALR*, a proteína construída terá um novo domínio-C, aminoácidos básicos (cargas positivas) polipeptídios ricos em metionina e arginina, e a retirada da sequência KDEL (lisina-ácido aspártico-ácido glutâmico-leucina) resultará na perda da função original proteica, além da retenção da calreticulina no retículo endoplasmático devido ao novo terminal- C (13,53,63,64) (Figura 9) (Tabela 3).



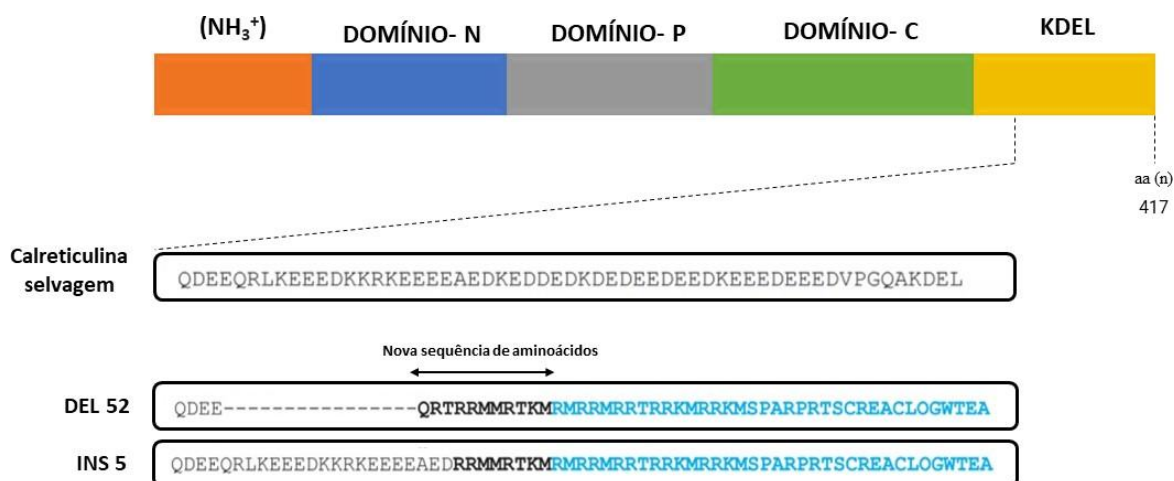
**Figura 9:** Comparação estrutural de CALR selvagem e CALR com variantes. As setas nas pontas demonstram o limite da sequência de aminoácidos de CALR afetados (com alteração no quadro de leitura) para os CALR não afetados. **Fonte:** Grinfeld J. *et al.*, 2022 (63).

**Tabela 3:** Descrição das alterações estruturais do domínio-C da proteína calreticulina.

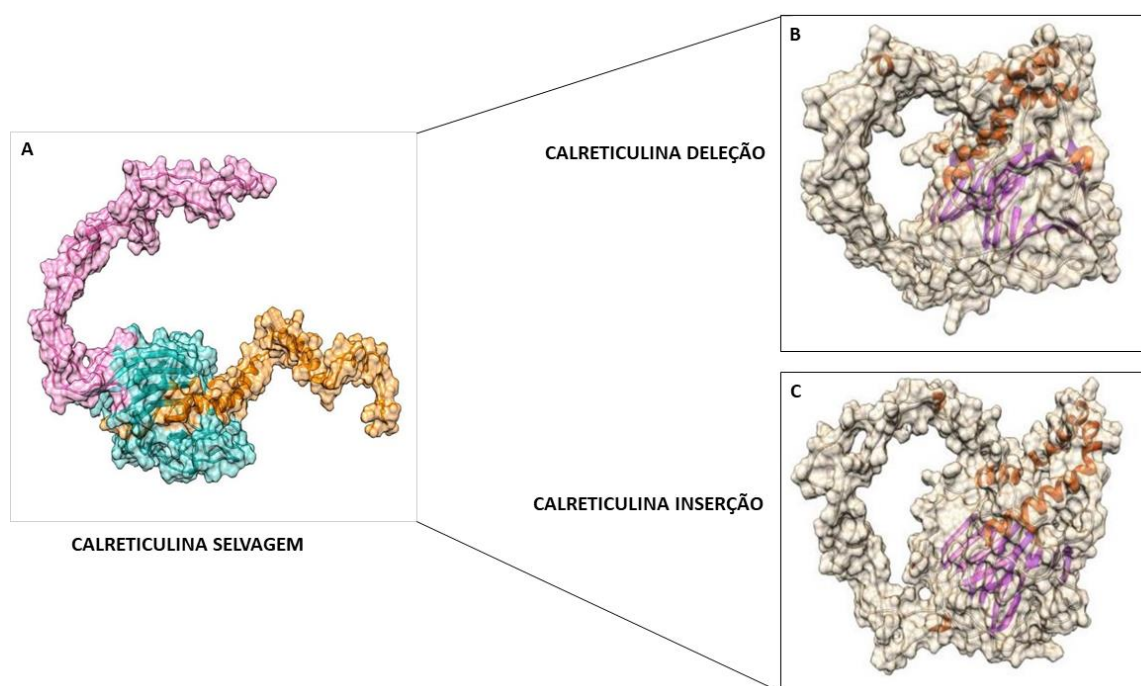
Proteína	Domínio-C	Sinal de Retenção
calreticulina sem variante	Aminoácidos negativos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presença da sequência KDEL</li> <li>• Sequência normal</li> <li>• Composta por 27 aminoácidos</li> </ul>
calreticulina com variante	Aminoácidos positivos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção da sequência KDEL</li> <li>• Formação de novo terminal- C</li> <li>• Composta por 36 aminoácidos</li> </ul>

**Fonte:** Clinton A. *et al.*, 2016 (59). Adaptado

Até o momento, foram descritas mais de 150 variantes genéticas no éxon 09 do gene *CALR*. Dessas variantes, mais de 85% deles correspondem à deleção de 52 bp (del52) e a uma inserção de cinco pares de bases (ins5) (13,14,65); e sua distribuição varia de acordo com o subtipo de neoplasia mieloproliferativa (66). Essas variantes podem se diferenciar em (tipo1) del52 (c.1092\_1143del/ p.L367\*46) e (tipo2) ins5 (c.1154\_1155insTTGTC / p.K385fs\*47) (10,14,67) (Figura 10 e 11).



**Figura 10:** Sequência de CALR selvagem e variantes tipo I e tipo II. O frameshift (resíduos de aminoácidos com deslocamento de quadro em negrito) dentro do éxon 09 gera um novo terminal-C, sendo comum a todas as mutações de deslocamento de quadro, e substitui a maior parte do domínio C selvagem, envolvido no armazenamento de cálcio. O sinal de recuperação ER (KDEL) também é perdido. Fonte: Prins D. et al., 2020 (67) Adaptado.



**Figura 11:** Visualização da proteína estrutural 3D entre: CALR selvagem (A), CALR com del52 (B) e CALR com ins5 (C). Fonte: Jaiswal A. et al., 2021 (68)

A variante *CALR* tipo 1 eliminam todos os aminoácidos ácidos (cargas negativas) do novo terminal- C, enquanto as do variante *CALR* tipo 2 retêm aproximadamente a metade dos aminoácidos carregados negativamente (61)(7). A classificação em tipo 1 –

deleção de 52 pb está associada a um fenótipo de mielofibrose; enquanto o tipo 2 – uma inserção de cinco pb está associada a fenótipo da trombocitemia essencial (13,65)(Tabela 4).

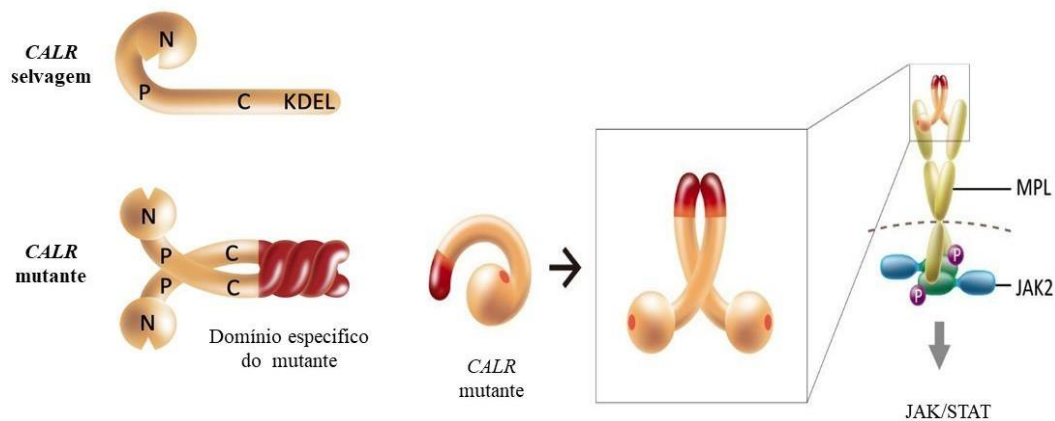
**Tabela 4:** Variantes no éxon 09 do gene *CALR*

<i>CALR</i>	Variação	Terminal-C	Mudança de nucleotídeo	Aminoácido	Clínica
<i>CALR</i> Tipo 1	Deleção (52 bp)	Elimina quase todos os aminoácidos negativamente	c.1092_1143del	p.L367*46	mielofibrose
<i>CALR</i> Tipo 2	Inserção (5 bp)	Retém a metade dos aminoácidos carregados negativamente	c.1154_1155insT TGTC	p.K385fs*47	trombocitemia essencial

**Fonte:** Choi M-AJ. et al.,2020 (13) e Klampfl T. et al.,2013(10). Adaptado.

Na TE e MF é encontrada uma correlação da presença das variantes *CALR*, que contribuem para o aumento na ativação via JAK-STAT e para a proliferação megacariocítica (56,63), no entanto alguns pontos do mecanismo molecular detalhado da atividade de *CALR* mutada ainda permanecem desconhecidos (69).

As variantes alteram a formatação estrutural do domínio-C da proteína (os locais de ligação Ca<sup>2+</sup>), afetando os locais de ligação de Ca<sup>2+</sup> e prejudicando diferentes sinalizações dos muitos processos celulares, interrompendo três dos sítios de fosforilação dependentes de JAK2. Essa interrupção sugere que as proteínas mutadas possam ligar-se ao Ca<sup>2+</sup> ineficientemente respondendo à ativação JAK2 (9,10). A atividade independente da TPO gera uma proliferação anormal das células e uma interação intramolecular entre as proteínas de *CALR* que contêm o domínio-C mutante para formação de um complexo homomultimérico, sendo um pré-requisito para ligação e ativação do receptor c-MPL (69,70)(Figura 11).



**Figura 12:** Comparação de estrutura de CALR sem mutação e CALR mutada. CALR mutada uma mudança estrutural ao novo terminal-C, que promove a ligação entre CALR mutante com o receptor c-MPL. **Fonte:** Araki. M. *et al* 2018 (69); Edahiro Y ET *et al.*, 2020 (71). Adaptado

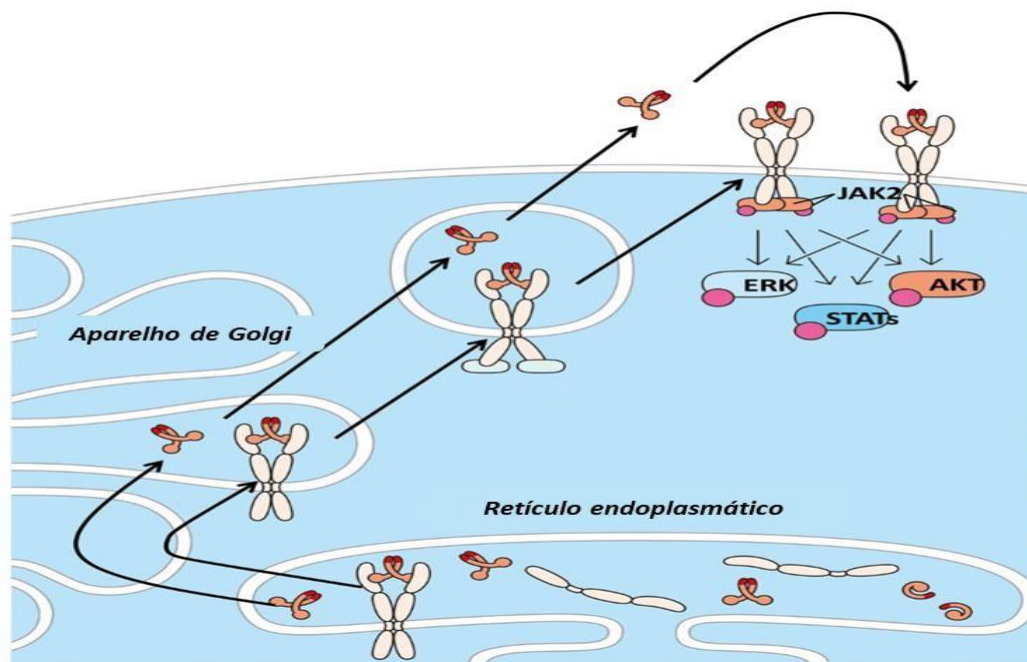
Usando ensaios de transcrição e de proliferação (72), observou-se que o mecanismo molecular de transformação celular gerada pela proteína CALR mutada induz a ativação de uma série de receptores de citocinas que sinalizam por meio da via JAK-STAT (62,72). Ainda que a proteína CALR não seja uma molécula ativadora direta de sinalização JAK-STAT, a calreticulina interage com o receptor c-MPL por meio do novo peptídeo do terminal-C, independentemente da presença da citocina TPO.

Na CALR selvagem o domínio-P bloqueia a ligação do domínio- N ao receptor c-MPL, no entanto esse efeito inibitório é modificado a partir da formação do novo terminal-C reforçada pelas cargas positivas, permitindo assim que o novo domínio- N interaja com o domínio extracelular do receptor c-MPL, o que confere assim um crescimento independente por citocinas (14,53).

Esse processo independente, acaba gerando a principal causa de megacariocitose em neoplasias mieloproliferativas com CALR mutada (13,14). Além disso, a proteína CALR mutada pode causar discreta ativação G-CSFR e induzir a secreção de citocinas por monócitos (73).

Reforçada pelas cargas positivas do novo terminal-C, a dinâmica na sinalização da proteína CALR mutada inicia-se com uma interação de forma anormal na ligação N-glicosilado do domínio extracelular do receptor c-MPL no retículo endoplasmático. Ligado pela CALR mutada, o receptor c-MPL será exportado para a superfície celular gerando a ativação sem a necessidade de indução por citocina TPO, o que leva à dimerização e à

ativação da via JAK-STAT. A ativação constitutiva do receptor c-MPL pela CALR mutada resulta na ativação de JAK2 e de outras vias ERK 1/2 e STATs (14). Esse efeito oncogênico depende tanto do terminal-C da CALR mutada quanto da presença do c-MPL (6,71)(Figura 12) .



**Figura 13:** Interação da CALR com receptor de trombopoietina: CALR interage com c-MPL por meio do reconhecimento de N-glicano imaturo em MPL no retículo endoplasmático (RE); o complexo MPL então se move para a superfície da célula por meio do aparelho de Golgi. A CALR mutada, juntamente com o c-MPL, acumula na superfície da célula, onde inicia a ativação das JAK2. Isso resulta na ativação persistente das vias STATs, da proteína quinase ativadora por mitogênio (MAPK/ERK) e de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) / AKT. Fonte: Araki M. et al., 2020 (14) e Varghese LN et al., 2017 (73). Adaptado.

## 2.10 Classificação clínica das variantes *CALR*

As variações do gene *CALR* encontram-se em conjunto com outras mutações *JAK2* e *MPL*, representando a segunda alteração molecular no grupo das NMPs(66)No entanto estudos iniciais identificaram que as variações no gene *CALR* contribuíam para o quadro clínico distinto associado às modificações geradas da calreticulina em comparação a outras variantes presentes nas neoplasias mieloproliferativas (67).

O trabalho realizado por Marty *et al.*(74) demonstrou a diferença de efeitos por expressão envolvendo as variantes *CALR* tipo 1 e tipo 2 por modelagem retroviral em camundongos que expressavam *CALR* del52 (tipo 1), que desenvolveram rapidamente



trombocitose e em seguida evoluíram para condição semelhante à MF, diferentemente dos camundongos que expressavam *CALR* ins5 (tipo 2), que tinham um fenótipo de TE com leve propensão à progressão da doença. Essas observações sugeriram que as diferenças entre as variantes *CALR* podem ter diferentes efeitos em humanos (65). No Brasil, o estudo realizado com base no levantamento de variantes de *CALR* em pacientes NMPs demonstrou a alta prevalência de variantes tipo 1 em 50% incluindo TE e MF e 40% para o tipo 2 em pacientes brasileiros (75).

A existência de variantes do gene *CALR* tipo 1 e *CALR* tipo 2 proporciona expressões fenotípicas distintas em casos de TE e MF, dentre elas a presença de megacariócitos maduros na área medular e a detecção de variantes *CALR* em CTH (76,77) Na tabela a seguir descreve algumas apresentações clínicas entre os dois grupos de neoplasias (Tabela 5).

**Tabela 5:** Aspectos clínicos associados às variantes *CALR* tipo 1 e tipo 2

	<i>CALR</i> TIPO 1	<i>CALR</i> TIPO 2
Variantes	Deleção de 52 pb	Inserção de 5 pb
Prevalência	MF	TE
Clínico (TE)	Contagem baixa de plaquetas	Contagem mais alta de plaquetas baixo risco de trombose
Clínico (MF)	Esplenomegalia, leucocitose e anemia. Plaquetas mais altas Presença de blastos circulantes	Esplenomegalia, leucocitose e anemia. Plaquetas mais baixas
Pós TE -MF	Risco aumentado	Menor probabilidade
Prognóstico geral TE	Semelhante ao tipo 2.	Semelhante ao tipo 1.
Prognóstico geral MF	Melhor	Pior

**Fonte:** How J. *et al.*, 2019 (16) .Adaptado.

Desde a descoberta e a identificação das variantes do gene *CALR*, diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar o mecanismo e os resultados da doença em termos de trombocitose, transformação mielofibrótica/leucêmica e sobrevida global.

Para os pacientes de TE que contém a variante *CALR*, a caracterização clínica é mais heterogênea, com dados laboratoriais que revelaram leucocitose, baixa hemoglobina e

elevada contagem de plaquetas, maior sobrevida de trombose, com predominância de ocorrência em jovens e do sexo masculino (13,78,79).

Em pacientes com MF, a presença da *CALR* mutada revela uma associação de sobrevida maior em relação aos pacientes com variantes *JAK2* e *MPL*. Os casos da progressão da doença TE para MF estariam restritos às variantes *CALR* tipo 1 (67,80). Os pacientes com MF com variante do tipo 1 apresentam grande probabilidade de desenvolverem fibrose óssea, diferentemente da possibilidade de essa transformação mielofibrótica ocorrer naqueles do *CALR* tipo 2.(65). É mais expressiva sua predominância em jovens, com menor incidência de anemia, leucocitose e aumento de plaquetas (16).

### 3. JUSTIFICATIVA

A calreticulina é uma proteína chaperona funcional, atuante em diversos processos fisiológicos e patológicos em nosso organismo. Em 2013, houve a identificação da presença de variantes no gene *CALR* no éxon 09 em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose. A presença dessas variantes compromete a normalidade da estrutura e da função da proteína, a partir da eliminação da região de ligação de cálcio, contribuindo para a formação de uma nova estrutura, que permite a estimulação contínua de proliferação celular por ativação constitucional da via de sinalização JAK/STAT.

A identificação da frequência dessas variantes durante o curso clínico da trombocitemia essencial e da mielofibrose tem contribuído muito para a elucidação do mecanismo evolutivo dessas neoplasias mieloproliferativas. Porém alguns projetos de pesquisa ainda são limitados em alguns países. No Brasil, essa restrição de informações, prejudica a identificação genética de variantes e a incidência por região.

O desenvolvimento deste projeto de pesquisa tem como objetivo principal identificar e construir um perfil clínico e analisar uma possíveis influência das variantes gênicas do gene *CALR* para desenvolvimento da trombocitemia essencial e da mielofibrose em pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM). O trabalho visa contribuir com novas informações genéticas, possibilitando aprimoramentos na abordagem clínica médica, incluindo um direcionamento mais preciso para o desenvolvimento de protocolos e futuros testes de diagnósticos específicos para essas condições.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Rastrear alterações no éxon 09 do gene *CALR* em pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose assistidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

### **4.2 Objetivo específico**

- 4.2.1** Determinar o perfil clínico-epidemiológico de pacientes.
- 4.2.2** Determinar a frequência das variantes no éxon 09 no gene *CALR*.
- 4.2.3** Categorizar as variantes identificadas em substituição de bases, inserção, deleção.
- 4.2.4** Investigar uma possível correlação da presença das variantes com os aspectos clínicos e moleculares dos pacientes
- 4.2.5** Investigar uma possível influência das variantes com aspectos clínicos e moleculares dos pacientes.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Tipo e área de estudo

O estudo foi Observacional Descritivo-Transversal, realizado na cidade de Manaus-Amazonas, desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

### 5.2. População de estudo

A população de estudo foi composta por livre demanda de indivíduos atendidos na FHEMOAM, recrutados no período entre julho de 2021 e julho de 2022, com diagnóstico clínico de neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPs) *BCR::ABL1* negativo: trombocitemia essencial (CID 47.3) e mielofibrose (CID 94.5).

Este estudo faz parte de um projeto principal intitulado “Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) e aprovado com o número de Parecer 4.450.813 e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) identificável pelo número 39991420.6.0000.0009 (Anexo 9.2), como estabelecido pelas normativas da Resolução n.º 466, de 12 de dezembro de 2012, a qual trata sobre as diretrizes e as normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e respeitando as diretrizes da Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas (GCP). Os dados obtidos durante a pesquisa são mantidos em anonimato durante todo o período estabelecido e serão utilizados apenas para fins investigativos.

A pesquisa demonstrou uma demanda segura e bem fundamentada, para a composição das amostras e na execução da análise pois, de acordo com os dados registrados no sistema iDOCTOR (acesso em 21 de dezembro de 2021), a população com diagnóstico clínico para participar da pesquisa de Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas foi de 61 casos para trombocitemia essencial e 8 casos de mielofibrose, totalizando 69 casos.

Algumas amostras utilizadas fizeram parte do projeto de mestrado intitulado “Caracterização molecular de variantes no gene *JAK2* em pacientes com neoplasias

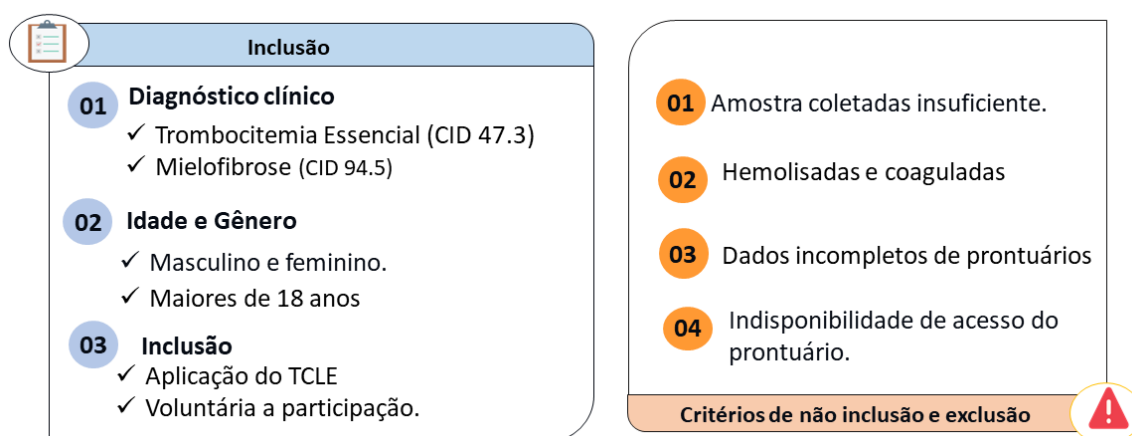
mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativo”, realizado pela MSc. Dania Isamary Gutiérrez Torres, do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia. Foram separadas somente os tubos de material biológico dos pacientes com trombocitemia essencial e mielofibrose para ser realizada a análise molecular de pesquisa de variantes do gene *CALR*.

### **5.3. Recrutamento dos pacientes**

Com o auxílio da recepção, de médicos hematologistas e de consulta no sistema iDOCTOR, os pacientes foram contactados por meio de telefonemas, cujo primeiro contato é uma apresentação do pesquisador, seguido de uma breve conversa sobre a proposta do projeto. Em seguida, o paciente foi convidado a participar da pesquisa, e a coleta agendada para o mesmo dia em que o participante da pesquisa, fosse em sua consulta marcada com o médico hematologista a qual faz o seu acompanhamento. A participação desses indivíduos foi realizada mediante explicação detalhada da pesquisa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 9.1), com apresentação do documento de identificação do pesquisador e esclarecimento de todas as dúvidas para, em seguida, a realização da assinatura do documento, sendo uma cópia entregue ao participante; e outra cópia ficará guardada com a equipe da pesquisa.

### **5.4. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão**

Os pacientes incluídos no estudo tiveram o diagnóstico clínico em prontuário de NMPs *BCR::ABLI* negativo, de ambos os sexos, com idade a partir de 18 anos e atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (figura 14).



**Figura14:** Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

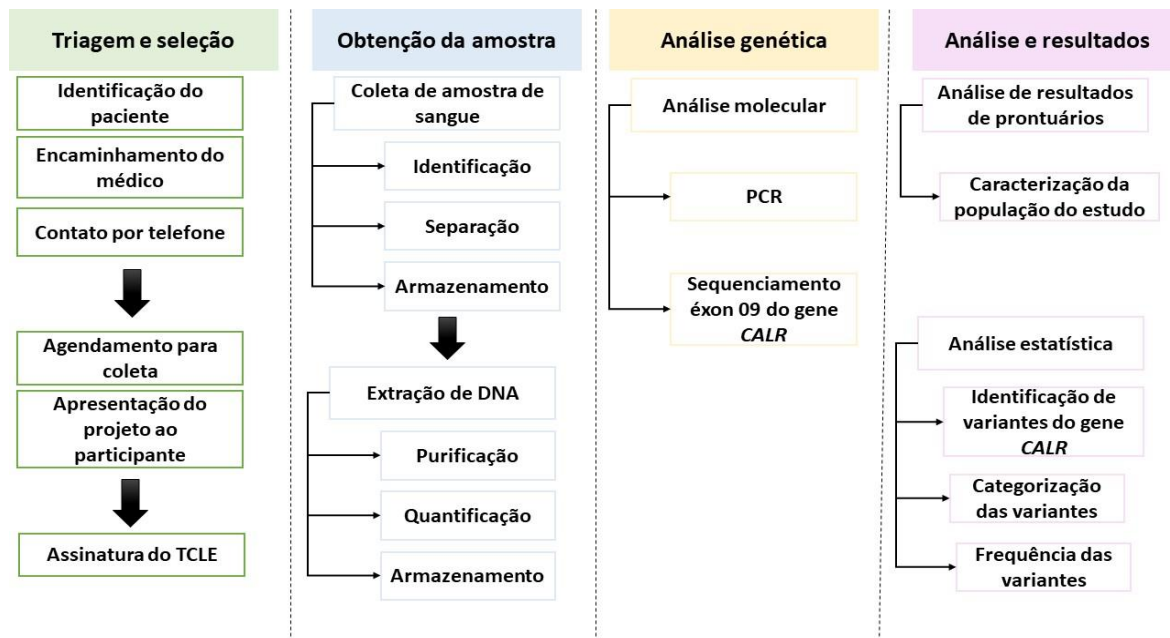
Foram excluídos do projeto pacientes que não apresentam as informações necessárias para a caracterização clínica e laboratorial da possível NMPs ou optam por desistir da pesquisa, como é estabelecido no TCLE.

## 5.5. Aspectos éticos

Este estudo fez parte de um projeto principal intitulado “Caracterização molecular de pacientes com neoplasias mieloproliferativas crônicas”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) e aprovado com o número de Parecer 4.450.813 e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) identificável pelo número 39991420.6.0000.0009 (Anexo 9.2), como estabelecido pelas normativas da Resolução n.º 466, de 12 de dezembro de 2012, a qual trata sobre as diretrizes e as normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e respeitando as diretrizes da Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas (GCP). Os dados obtidos durante a pesquisa foram mantidos em anonimato durante todo o período estabelecido e serão utilizados apenas para fins investigativos.

## 5.6. Fluxograma de trabalho

As atividades foram divididas em diversas etapas, das quais as principais estão demonstradas na Figura 15 e descritas nas fases seguintes:



**Figura 15:** Fluxograma de atividades do projeto. Observa-se uma divisão de quatro categorias de atividades (captação de pacientes, obtenção da amostra, análise molecular e estatística) necessárias para obtenção dos resultados esperados. Fonte: Autoria própria

## 5.7 Coleta de dados do prontuário

Quanto aos dados contidos em prontuários, foram consultadas informações relacionadas ao gênero, idade, dados laboratoriais bioquímicas e homeostáticas, assim como informações de eventos trombo-hemorrágicos e hemorrágicos e casos de transformação mielofibrótica/leucêmica. Esses dados foram coletados em um instrumento de coleta de dados (Anexo 9.3) em formato digital para melhor organização e manuseio dos dados, bem como para montagem de banco de dados para posterior análise estatística.

## 5.8. Coleta de sangue e armazenamento

Nas amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa: três tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2), dois tubos de Citrato de Sódio (Citrato de Sódio Tamponado 0,105 mol/L (3,2%) utilizados para prova de coagulação e dois tubos contendo o ativador de coágulo jateado na parede do tubo, para acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro (BD Vacutainer® SST® II Advance®) nas análises bioquímicas e sorológicas. Nas coletas de amostras sanguíneas, foram usadas em testes moleculares e controle de exames laboratoriais dos pacientes. Em seguida, a amostra foi alíquotada em criotubos, e identificadas com o código



do paciente e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.9. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas com reagente Brazol. Inicialmente, o descongelamento das amostras e a identificação dos microtubos utilizado a foram utilizados durante o processo. Em seguida, adiciona-se  $200\mu\text{L}$  de sangue total com EDTA num tubo previamente rotulado, seguido da adição de  $400\mu\text{L}$  de Brazol gelado ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e agitação no vórtex até a sua homogeneização completa. Consequente, adicionam-se  $100\mu\text{L}$  de clorofórmio gelado ( $4^{\circ}\text{C}$ ), mistura-se no vórtex e centrifuga-se a uma velocidade de  $10.000\text{rpm}$  por 12 minutos, em temperatura ambiente. Após centrifugação, verificam-se as fases nas amostras, fazendo-se a transferência do sobrenadante para um tubo novo de  $1,5\text{ mL}$  previamente rotulado. No novo tubo, adicionam-se  $500\mu\text{L}$  de etanol  $100\%$  gelado, fazendo homogeneização no vórtex até observar o precipitado. Faz-se a centrifugação novamente a  $10.000\text{rpm}$  por 15 minutos, em temperatura ambiente e, logo após essa etapa, descarta-se o sobrenadante, vertendo o microtubo em papel absorvente para retirar o excesso de etanol.  $500\mu\text{L}$  de etanol a  $100\%$  gelado são adicionados ao tubo, agitando por dez segundos no vórtex, e uma nova centrifugação a  $10.000\text{rpm}$  por 12 minutos, em temperatura ambiente, é realizada. Descarta-se o sobrenadante e retira-se o excesso de álcool com a pipeta e coloca-se no banho-seco a  $56^{\circ}\text{C}$  por dez minutos. Por último, adicionam-se  $100\mu\text{L}$  de água ultrapura gelada para ressuspender o botão de material genético por agitação no vórtex.

A quantificação do material extraído foi realizada por espectrofotometria com o Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), aferindo-se as relações  $260/280$  e  $230/260$ , sendo que esta última mensura também a qualidade da amostra. Em seguida, o material será armazenado ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até a realização das análises moleculares.

## 5.10 Análise molecular

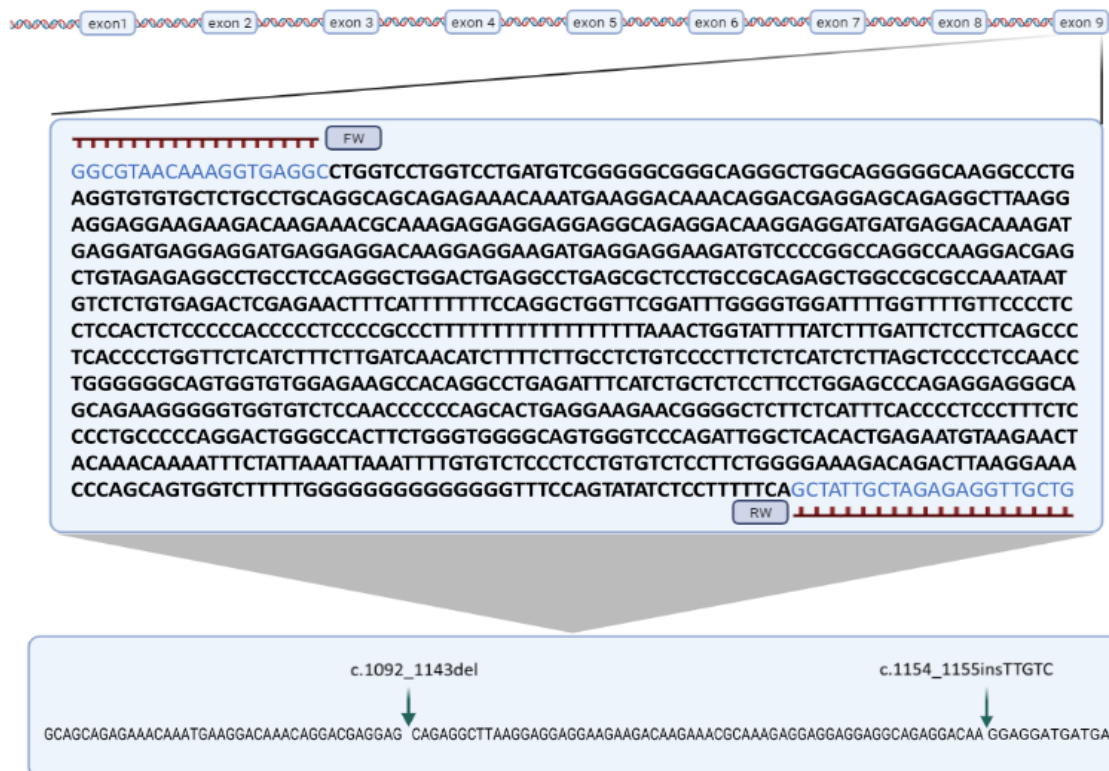
### 5.10.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Foram preparados oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para investigação das variantes de interesse. O delineamento da região foi realizado com base na sequência de referência do gene *CALR* (NC\_000019.10) de interesse disponibilizada

pelo NCBI (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). As sequências do gene foram armazenadas no software Geneious (Biomatters, v6.0.6), com o qual foi realizado um mapeamento da sequência do gene de referência, o que facilita a seleção da área de desenho dos oligonucleotídeos e a futura análise genética.

Após seleção da área gênica, fez-se a elaboração dos iniciadores na ferramenta on-line OligoAnalyzer (disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) considerando as concentrações de oligonucleotídeos (0,25 $\mu$ M), magnésio (2,5mM), sódio e desoxirribonucleotídeos trifosfatados (ambos a 0mM). Características estruturais e termodinâmicas como tamanho, temperatura de melting (T<sub>m</sub>), Selfdímero (SD), Heterodímero (HD) e Harpin (H) também foram avaliadas nessa mesma ferramenta. Em seguida, as sequências dos primers passaram por análise no PrimerBlast (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), outra ferramenta do NCBI utilizada para mensurar a especificidade dos iniciadores com os alvos de interesse. O conjunto de primers foi desenhado conforme ilustrado na Figura 16.

CALR	SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEO	TAMANHO (BASES)	START	STOP	TEMPERATURA (°C)	GC %
FW1	GGC GTA ACA AAG GTG AGG C	19	10019	10037	63.6 °C	57.9 %
RW1	CAG CAA CCT CTC TAG CAA TAG C	22	11008	10987	63 °C	50 %



**Figura 16:** Estratégia para o desenho dos *primers*. Oligonucleotídeos iniciadores (em azul), sequência amplificada (em preto). Apresentando em destaque abaixo as variantes mais frequentes descrita pela literatura. **Fonte:** Autoria própria.

### 5.10.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do material genético será realizada por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com volume final de 50µL de reação contendo 50-100ng de DNA genômico e reagentes descritos na Tabela 7. Será utilizada água ultrapura para completar o volume supracitado. Para amplificação dos fragmentos, segue os seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 1 minutos por 35 ciclos e finalmente 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR serão submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização do fragmento em fotodocumentador UV light Gel Doc™ XR + System (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, USA). (Tabela 7).

**Tabela 6:** Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR

<b>Reagente</b>	<b>Volume na reação</b>	<b>Concentração final</b>
Tampão (10x)	5,0 µL	1 x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5 µL	1,5 mM
dNTP (10 mM)	1,0 µL	0,2 µM
Iniciadores (10 µM)	2,0 µL (cada iniciador)	0,4 µM
Taq (5 U/µL)	0,2 µL	0,2 Unidade
DNA	1 µL	300 ng
Água pura	q.s.q	
<b>Total</b>	<b>50 µL</b>	

### 5.10.3 Purificação da PCR com polietilenoglicol (PEG)

Após a amplificação, o material foi purificado com polietilenoglicol (PEG) visando à remoção de nucleotídeos e de iniciadores não incorporados na PCR que podem interferir na reação de sequenciamento. Antes do procedimento, o amplicon e o etanol 80% foram armazenados a -80°C e -20°C, respectivamente, liga-se o banho-maria seco a 37°C, separam-se as placas de sequenciamentos ou tubos de 1,5mL, e prepara-se PEG a 20% (10g de PEG 8000 e 7,3g de NaCl). Faz-se a transferência do PEG para o tubo ou placa de sequenciamento, adicionando o amplicon em seguida. Posteriormente, agita-se a placa suavemente por dez segundos e incuba-se a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, centrifuga-se a 2.500 rcf (força centrífuga relativa) por 15 minutos em caso de tubo; ou 2.200 rcf em caso de placas, todavia, nos dois casos, a centrifugação ocorre em temperatura ambiente. Em seguida, descarta-se o sobrenadante e adicionam-se 125µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifuga-se a 1450 rcf por dois minutos a 4°C. Depois de centrifugar, descarta-se o sobrenadante, deixa-se secando a 60°C por dez minutos (em caso de placas) ou 37°C entre 20-50 minutos (em casos de tubos), para remover resíduos de etanol. Após a secagem, adicionam-se 20µL de água ultrapura, homogeneiza-se e armazena-se a -80°C. Antes de armazenar as amostras a -80°C, armazena-se entre 4-5°C por algumas horas para melhor eluição de DNA. Por último, quantificam-se as amostras pelo menos três dias após precipitação, passando do freezer (-80°C) à geladeira 4-5°C pelo menos duas horas antes da quantificação.

#### 5.10.4 Sequenciamento

Aproximadamente cerca de 20-40ng de produto de PCR purificado foram aplicados nesta reação de sequenciamento. O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), e os primers desenhados para o presente estudo. Foram utilizados a quantidade nessa reação como descrito na Tabela 8. A eletroforese capilar será realizada no sequenciador de DNA ABI 3130 com o polímero POP-7TM.

**Tabela 7:** Volume e concentração dos reagentes utilizados para o sequenciamento.

Reagente	Volume final da reação
Produto purificado	1 µL (20-40ng)
BigDye® Terminator v3.1	0,5 µL
Oligonucleotídeos iniciadores (3,3µM)( <i>foward ou reverse</i> )	1,0 µL
Tampão (5x)	2,0 µL
Água pura	q.s.q
<b>Volume final</b>	<b>50 µL</b>

As sequências foram inicialmente analisadas com o software Sequencing Analysis (Applied Biosystems, v5.3.1), com uma avaliação secundária, realizada no Geneious (Biomatters, v6.0.6) para construir contigs em comparação com a sequência do gene de referência do CALR (GenBank ID: NC\_000019.10).

#### 5.11 Categorização das variantes e análise das novas variantes identificadas

As variantes identificadas no éxon 09 foram categorizadas em substituição de bases, deleção e inserção. A frequência das categorias de variantes será calculada e apresentada por meio de porcentagem.

Variantes não descritas na literatura serão avaliadas quanto a possíveis impactos na função da proteína, com uso das ferramentas Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) (ADZHUBEI et al., 2010; ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013) e SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (VASER et al., 2016). Esses algoritmos são utilizados para prever o efeito que a variante pode causar na estrutura e na função de uma proteína humana,

utilizando análises evolutivas estruturais e comparativas. A análise gera uma pontuação (score) que varia de 0,0 a 1,0. No Polyphen2 variantes com pontuações de 0,0 a 0,15 são consideradas benignas, enquanto variantes com valores acima de 0,15 são preditas como prejudiciais. Para o SIFT, variantes de 0,0 a 0,05 são consideradas deletérias, enquanto variantes acima de 0,005 são consideradas toleráveis.

### **5.12 Análise estatística**

Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%); e as variáveis numéricas serão expressas por média  $\pm$  desvio padrão e mediana (Md) e intervalo interquartílico [IIQ].

Utilizando o programa Graphpad Prism software v.8.0.1.( GraphPad Software). Foi aplicado o teste de normalidade para ambas as categorias, observando as distribuições . Na associações de variáveis qualitativas entre os dois grupos foram testados Man- Whitney (paramétrico) entre 2 grupos e para os dados numérico o teste Kruskall- Wallis (não paramétrico) para comparações de mais de um grupo e Pós-Teste de Múltiplas Comparações (Dunn's). Nós consideramos o *p* valor  $<0,05$  estatisticamente significativo para todos os testes.

### **5.13 Riscos e benefícios**

O projeto possui riscos, limitados ao aparecimento de hematomas pós-coleta de sangue e possíveis desconfortos no local da punção, como exposto no TCLE no momento de sua aplicação. Ressalta-se que a coleta foi realizada por profissionais do laboratório da fundação HEMOAM, os quais são qualificados e aptos para a execução do processo. Os benefícios principais estão relacionados à caracterização molecular dos pacientes incluídos nos estudos, o que levará a uma melhor compreensão sobre os achados genéticos envolvidos nas NMPs e sua importância para a terapêutica e o manejo.

### 5.14 Cronograma de atividades

Nº	Atividades	01/2021						02/2021					
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
01	Créditos – Disciplinas	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
02	Revisão Bibliográfica	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
03	Coleta de amostras								F	F	F	F	F
04	Desenho dos primers								F	F			
05	Elaboração do projeto para qualificação								F	F	F	F	F
Nº	Atividades	01/2022						02/2022					
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
01	Qualificação						F						
02	Revisão Bibliográfica	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
03	Créditos – Disciplinas	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
04	Coleta de amostras	F	F	F	F	F	F	F	F				
05	Extração de DNA								F	F	F	F	F
06	Padronização da PCR								F	F			
07	PCR e sequenciamento do éxon 09 do gene <i>CALR</i>									F	F	F	F
Nº	Atividades	01/2023											
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
01	PCR e sequenciamento do éxon 09 do gene <i>CALR</i>	F	F	F	F								
03	Organização e tabulação dos resultados				F	F	F						
04	Análises Estatísticas				F	F	F						
05	Redação da dissertação					F	F	F					
06	Elaboração dos artigos e relatórios						F	F					
07	Defesa pública								F				

(F): Finalizada (AR): A Realizar

### 5.15. Equipe de pesquisa

	Integrantes do projeto	Instituição	Formação acadêmica	Função no projeto
01	Erycka Alves de Mesquita	HEMOAM	Farmacêutica- Bioquímica	Execução do projeto
02	Lucivana Prata de Souza Mourão	HEMOAM	Bióloga, Dra.	Orientadora
03	Andréa Monteiro Tarragô	HEMOAM	Farmacêutica- Bioquímica, Dra.	Coorientadora
04	George Allan Villarouco da Silva	HEMOAM	Biólogo, Dr.	Análise molecular
05	Allyson Guimarães da Costa	HEMOAM	Enfermeiro, Dr.	Análise estatística
06	Adriana Malheiro Alle Marie	HEMOAM	Bióloga, Dra.	Colaboradora
07	Dania Isamary Gutiérrez Torres	HEMOAM	MSc. Biomédica	Coleta de amostras biológicas
08	Deborah Canté de Aquino	HEMOAM	Bióloga	Coleta de amostras biológicas
09	Emanuela Vitória Barbosa Alves	HEMOAM	Biomédica	Coleta de amostras biológicas
10	Jhemerson Fernandes Paes	HEMOAM	Biomédico	Coleta de amostras biológicas
11	Miliane Araújo de Sousa	HEMOAM	Biomédica	Coleta de amostras biológicas



### **5.16 Financiamento e Infraestrutura**

O projeto possui financiamento próprio e foi realizado nos laboratórios Multidisciplinar de Pesquisa e Laboratório de Genômica (HEMOAM). Leituras de Sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Genômica no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Estado do Amazonas (UFAM) e da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E PERFIL DE VARIANTES NO ÉXON 09 DO GENE CALRETICULINA (CALR) EM PACIENTES COM TROMBOCITEMIA ESSENCIAL E MIELOFIBROSE DO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.

Erycka A. Mesquita<sup>1</sup>, Deborah Canté de Aquino<sup>1</sup>, Jhemerson Fernandes Paes<sup>1</sup>, Dania G. Torres<sup>1</sup>, Emanuela Vitória Barbosa Alves<sup>1</sup>, Míliane Araújo de Sousa<sup>1</sup>, Iandara Maíra Lopes de Souza<sup>1</sup>, Rosângela Santos de Abreu<sup>1</sup>, Cristina Mesquita<sup>1,2</sup>, Nelson Abrahim Fraiji<sup>1,2</sup>, George A. V. Silva<sup>1</sup>, Andréa M. Tarragô<sup>1,2</sup>, Lucivana P. de Souza Mourão<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus 69850-000, AM, Brasil.

<sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brasil.

\*Autor correspondente: Lucivana Prata de Souza Mourão, PhD, Laboratório de Genética Humana, Escola Superior de Ciências da Saúde, Av. Carvalho Leal, 1777 - Cachoeirinha, Manaus - AM, Cep.: 69065-001, E-mail: lpsouza@uea.edu.br

**Introdução:** Variantes no éxon 09 gene *CALR* foram identificadas em trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF). Uma deleção de 52 pares de base (tipo 1) e uma inserção de 5 pares de bases (tipo 2) são as variantes mais frequentes. **Objetivo:** O presente estudo, visou identificar essas variantes indels em indivíduos com trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF) e avaliar as características clínicas e laboratoriais em relação aos tipo 1/tipo 2. **Metodologia:** foram incluídos no estudo 69 indivíduos diagnosticados clinicamente com, trombocitemia essencial (n=61) e mielofibrose (n=8). Dados laboratoriais obtiveram-se de coletas de amostras durante o seguimento dos indivíduos. Realizou-se avaliação molecular em Reação em cadeia de Polimerase e Sequenciamento de Sanger para detecção de variantes na região éxon 09 gene *CALR*. **Resultados:** na éxon 09 do gene *CALR* foram identificadas as variantes rs1555760738 (tipo1) e rs765476509 (tipo 2). Dos pacientes com TE (n=61), 4 apresentavam (tipo 1) e 10 com (tipo2), enquanto em MF (n=8), foram identificadas 2 variantes; uma com tipo 1 e outra tipo 2. Ao nível de distribuição, houve uma predominância de TE *CALR* tipo 2. Na análise entre os subtipos TE, os pacientes com tipo 2, apresentando maior contagem de plaquetas e discretas alterações no perfil clínico-laboratorial nos demais investigados. Aos pacientes com MF, a análise seguiu de forma descritivas, composto por um indivíduo *CALR* tipo 1 (heterozigose) e um indivíduo *CALR* tipo 2 (homozigose) apresentando diferenças comportamentais laboratoriais em ambas principalmente em produção de plaquetas. **Conclusão:** Esses achados confirmam, que modificações frameshift gerada por variantes

no *CALR* altera a estrutura do domínio-C da proteína calreticulina, estando envolvida em processos intermoleculares e uma ativação constitutiva na formação de megacariócitos.

**Palavras chaves:** Neoplasias mieloproliferativas, *BCR::ABL1* negativo, *frameshift*, *CALR* tipo 1, *CALR* tipo 2.

## 1.INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) é um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação contínua das células tronco-hematopoiéticas, dentre as quais as células de linhagem mieloides (1–4). As NMPs caracterizam-se quanto ao aumento da produção celular e alterações no estágio de maturação, provavelmente em resposta a fatores estimuladores (4–6). Das alterações clínicas e laboratoriais(7,8), geralmente são apresentadas por hiperplasia na medula óssea com progressão fibrótica, hematopoese extramedular, e casos de evolução para leucemias aguda (5,9)

Novos avanços na área molecular permitiram a compreensão dos diferentes caminhos envolvidos no desenvolvimento das NMPs *BCR::ABL1* negativo (2,4,10). Nota-se uma sinalização alterada de citocina atribuída pela presença de variantes de genes (10–12), conduzindo à ativação direta ou indireta da via de sinalização JAK-STAT. Esta ativação está incorporada nas ligações do receptor da eritropoetina (EpoR) característica comum em mutações somáticas na tirosina quinase JAK2, ao receptor da trombopoetina (Tpo-R) também descrito como MPL e na proteína chaperona calreticulina (*CALR*)(11,13,14)

A patogênese desses subgrupos de NMPs *BCR::ABL1* negativa ficou bem mais esclarecida após identificações de variações somáticas em genes, que contribuem como mioestimuladores para a progressão de doença, alterando níveis de estrutural e funcional de proteínas e receptores (15–17). Fato observado a partir de mutações *frameshift* observadas exclusivamente em pacientes com TE e MF no éxon 09 do gene da calreticulina (*CALR*), responsável por codificar a proteína calreticulina (*CALR*) (15,17,18).

A calreticulina é uma proteína multifuncional e exerce a função de chaperona para muitas glicoproteínas recém-sintetizadas destinadas à secreção e inserção na membrana plasmática (13,19–21), atividade de equilíbrio homeostático (22,23), proliferação celular e de forma indireta auxiliando em via de sinalização de citocinas, diferenciação e apoptose

(24,25). Possui 417 aminoácido e é constituída pelos domínios: Domínio-N de estrutura globular, com aminoácidos altamente conservados e de ligação de lectina acoplado a um amino terminal-N; Domínio-P rico em aminoácidos prolina (P) com regiões de ligação com alta afinidade e baixa capacidade de ligação para  $Ca^{2+}$ , e um Domínio-C(carboxil terminal-C) que atua na atividade chaperona e formada por aminoácidos ácidos com baixa afinidade e alta capacidade  $Ca^{2+}$ . Ao final do Domínio-C, segue uma sequência de quatro aminoácido: lisina(K), aspartato(D), glutamato(E) e leucina (L) formando o sinal KDEL (15,23,26,27)

As variantes no gene CARL ocorrem após o códon 352 do éxon 09, e são relatadas como a segunda alteração genética mais frequente nos casos mieloproliferativos de TE e MF (5,17,21). Estudos demonstraram que as variantes gênicas mais presentes nestes casos são: tipo 1, uma deleção de 52 pb (c.1099\_1150del; p.Leu367Thr\*46); tipo 2, uma inserção de 5 pb (c.1154\_1155insTTGTC; p.Lys385Nfs\*47)(28), levando a uma reestruturação na sequência de aminoácidos no domínio C da proteína mutada, em que os aminoácidos negativos são substituídos por aminoácidos neutros e de cargas positivas, e a retirada do sinal de retenção KDEL(17,18,29).

Essa mudança estrutural confere a proteína calreticulina alterações em ligação ao receptor da trombopoetina (MPL) uma ativação independente de citocinas favorecendo a sinalização via JAK-STAT de forma contínua, contribuindo para a patogênese dessas neoplasias (3,14,30,31)

Vários trabalhos descrevem diferentes fenótipos e evolução clínica associado ao tipo de variante do CALR (tipo 1 e tipo 2) (28,32,33). Neste trabalho, realizou-se o rastreamento de variantes gênicas no gene CALR em pacientes confirmados com Trombocitemia essencial e Mielofibrose.

## **2.MATÉRIAS E MÉTODOS**

### **2.1 População de estudo e amostras**

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado com trombocitemia essencial e com mielofibrose seguindo os critérios definidos pela OMS (2017), na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), entre o período Agosto 2021 a 2022 (2,4).

## 2.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM sob número de parecer 4.450.813. Inclusão prévia de todos os pacientes no estudo, todos os respectivos pais ou responsáveis legais leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Esse estudo foi realizado de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e Resolução 466/12 de Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos.

## 2.3 Coleta e dados clínicos e laboratoriais

As informações sobre os dados clínicos, laboratoriais e demográficos (como idade e sexo) foram obtidas dos prontuários eletrônicos da própria Fundação HEMOAM.

## 2.4 Amostra biológica e extração de DNA

As amostras de sangue venoso coletadas em tubos com EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2). O DNA foi extraído com Brazol (Lgcbio, Brasil) conforme orientações do fabricante. Em seguida armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para garantir sua estabilidade e integridade até o momento da análise.

## 2.5 PCR e Sequenciamento de Sanger

Para amplificação da região do éxon 09 do gene CALR, foram desenhados primers cujas sequências estão apresentadas na tabela 01, seguindo os parâmetros recomendados pelas ferramentas Primer-BLAST-NCBI e OligoAnalyzer Tool-IDTDNA.com, permitindo à amplificação de 990 pb de todo éxon 09 e áreas adjacentes por meio da técnica de PCR convencional usando um termociclador (Applied Biosystems™ ProFlex™).

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados para a amplificação do éxon 09 do gene *CALR*.

	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho (bases)	Início	Parada	Produto (pb)
FW	GGC GTA ACA AAG GTG AGG C	19	10019	10037	990
RW	CAG CAA CCT CTC TAG CAA TAG C	22	11008	10987	

Para a reação de PCR utilizou-se um volume final de 25  $\mu$ L, sendo usado 50-200 ng de DNA, Tampão (1x), Magnésio (1.5 mM) , Primer (0.4 mM), dNTP mix (0.2 mM) e TAQ Polimerase (1U/reação). Os parâmetros de ciclagem de 94 °C por 5 minutos; 94 °C por 30 segundos; 60 °C por 30 segundos (anelamento); 72 °C por 1 minutos por 35 ciclos e 72 °C por 7 minutos. O fragmento de 990 pb foi visualizado em gel de agarose a 1,5%.

Para análise do sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados por meio do protocolo com polietilenoglicol (PEG)(34–36). Para a Reação de Sequenciamento de Sanger foi usando H<sub>2</sub>O ultrapura, tampão 5x, primer [3.3 Mn], DNA e reagente BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) seguindo as especificações do fabricante. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados mediante o protocolo de EDTA/Etanol, para posteriormente realizar a leitura no sequenciador automático 3500 XL Genetic Analyzer® (Applied BioSystems, USA).

Para a análise de dados as sequências obtidas foram inicialmente analisadas mediante software Sequencing Analysis (Applied biosystem [Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil]) e somente as sequências de boa qualidade foram usadas para análise de variantes. Software Geneious 6.0.6 (Biomatters, USA) foi usado para obter contigs e compará-los com a sequência de referência Homo sapiens CALR (calreticulina) (NCBI NC\_000019.10). A amostra com variante rara foi sequenciada e confirmadas duas vezes.

## 2.6 Análise estatística

Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). Variáveis numéricas contínuas foram expressas por mediana e intervalo interquartil [IIQ]. Foi aplicado o teste de normalidade para ambas as categorias, no intuito de analisar as distribuições. Na associações das variáveis qualitativas entre os dois grupos foram testados Man-Whitney entre 2 grupos e o teste Kruskal- Wallis para comparações de mais de dois grupo. Consideram-se o *p* valor <0,05 estatisticamente significativo. A análise estatística realizou-se através do programa Graphpad Prism software v.8.0.1.(GraphPad Software).

## 3.RESULTADOS

### Características clínico-epidemiológico e laboratoriais

Esse estudo incluiu 69 pacientes da FHEMOAM sendo 88,4% (n= 61) com TE e 11,6% com MF (n= 8). Observou-se uma predominância significativa de pacientes TE do gênero

feminino (78,69%), com média de idade de 57,3 (16,53) anos. Foram observados casos de esplenomegalia em 16,39%, eventos trombóticos em 24,59% e hemorrágicos em 22,95%. Em pacientes com MF houve uma predominância do gênero masculino (62,50%), com média de idade de 61,8 (11,19) anos. Dos pacientes com mielofibrose, 62,50% apresentaram esplenomegalia. Não foram registrados casos de eventos trombóticos ou hemorrágicos nesse grupo de pacientes. As principais características clínicas e as diferenças observadas estão relacionadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Características epidemiológicas e clínica dos pacientes com TE e MF.

<b>Dados epidemiológicos</b>		
	<b>TE (n= 61)</b>	<b>MF (n= 8)</b>
<b>Idade</b> (anos) média (desvio padrão)	57,3 (16,53)	61,8 (11,19)
Masculino, n (%)	13 (21,31%)	5 (62,50%)
Feminino, n (%)	48 (78,69%)	3 (37,50%)
<b>Dados clínicos</b>		
<b>Esplenomegalia</b>		
Sim	10(16,39%)	5 (62,50%)
Não	51(83,61%)	3 (37,50%)
<b>Eventos Trombóticos</b>		
Sim	15 (24,59%)	0 (0,00%)
Não	46 (75,41%)	8(100,00%)
<b>Eventos Hemorrágicos</b>		
Sim	14 (22,95%)	0 (0,00%)
Não	47 (77,05%)	8(100,00%)

Abreviações. TE: trombocitemia essencial, MF: mielofibrose  
 Valor absoluto (n) e Frequência relativa (%) aplicado na tabela 2

Nos parâmetros hematológicos, observou-se uma ligeira diminuição na produção de linhagem eritrocitária em pacientes TE e MF. No grupo de pacientes TE, os valores de Hto e Hb mantiveram-se dentro dos padrões de referência, ao contrário dos pacientes MF, que apresentaram níveis reduzidos de Hematócrito e Hemoglobina. Além disso, os índices hematimétricos, como e, demonstraram aumento significativo no grupo TE em comparação ao grupo MF.

Os valores de WBC estavam dentro dos intervalos normais. A contagem de plaquetas foi maior em pacientes com TE, porém permaneceu dentro dos limites estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) quando comparada aos pacientes com MF.

Observou-se uma redução no percentual de linfócitos. As análises bioquímicas revelaram concentrações significativamente mais elevadas de DHL (desidrogenase láctica)

e AU (ácido úrico) em indivíduos com MF em comparação com TE. Em relação aos valores homeostáticos, foi observado que os dados da MF apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com TE. Os resultados do fibrinogênio mostraram valores normais tanto em TE quanto em MF. Todos dados laboratoriais estão descritos na tabela 3.



**Tabela 3.** Características laboratoriais de pacientes TE e MF.

<b>Dados hematológicos</b>				
<b>Hemograma</b>	<b>TE (n= 61)</b>	<b>MF (n= 8)</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>p-valor</b>
RBC x mm <sup>3</sup> Md [ IIQ ]	3,75 [3,24 - 4,54]	3,25 [2,80 - 4,72]	3,9-5,3	0,3022
Hto- hematócrito (%) Md [ IIQ ]	37,70 [34,60 - 42,10]	30,30 [23,35 - 38,73]	36-48	<b>0,0141</b>
Hb- hemoglobina (g/dL) Md [ IIQ ]	12,60 [11,60 - 13,90]	9,500 [7,42 - 12,00]	12-16	<b>0,0093</b>
VCM (fL) Md [ IIQ ]	103,8 [93,70 - 112,7]	86,35 [78,68 - 92,98]	80-100	<b>0,0005</b>
HCM (pg) Md [ IIQ ]	33,50 [30,10 - 36,70]	28,50 [24,68 - 29,03]	27-33	<b>&lt;0,0001</b>
CHCM (g/dL) Md [ IIQ ]	32,40 [32,00 - 33,60]	31,30 [30,48 - 33,48]	32-36	0,2680
WBC x mm <sup>3</sup> Md [ IIQ ]	5,370 [3,950-7,110]	9,115 [4,470 - 13,37]	3.600-11.000	0,0970
PLT x mm <sup>3</sup> Md [ IIQ ]	452,0 [323,0 -534,5]	305,5 [134,3 - 480,5]	150.000-400.000	0,0648
Neutrófilos segmentados (%)	61,90 [56,00- 68,80]	68,00 [22,25 - 77,70]	40-78	0,6553
Eosinófilos (%)	2,00 [1,20 - 2,85]	3,500 [1,25 - 6,00]	1-5	0,1496
Basófilos (%)	0,70 [0,40 - 1,00]	0,00	0-2	<b>&lt;0,0001</b>
Monócitos (%)	5,00 [3,90 - 6,00]	2,400 [1,25 - 5,50]	2-10	<b>0,0259</b>
Linfócitos (%)	29,40 [22,75 - 35,55]	15,00 [11,00- 28,23]	20-50	<b>0,0115</b>
<b>Dados bioquímicos</b>				
	<b>TE (n= 61)</b>	<b>MF (n= 8)</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>p-valor</b>
LDH (U/L) Md [ IIQ ]	420,0 [354,5-495,5]	904,5 [488,2- 1276]	214 - 450 (M) 195 - 453 (F)	<b>0,0059</b>
AU (mg/Dl) Md [ IIQ ]	4,00 [2,80-4,80]	6,850 [4,35- 8,00]	3,5- 7,2 (M) 2,6 - 6,0 (F)	<b>0,0031</b>
<b>Dados homeostáticos</b>				

	<b>TE (n= 61)</b>	<b>MF (n= 8)</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>p-valor</b>
TAP (seg)	11,30 [10,80-12,25]	13,85 [13,13 - 14,25]	10-12	<b>&lt;0,0001</b>
INR	0,97 [0,920 - 1,045]	1,18 [1,12 - 1,29]	0,9 -1,1	<b>&lt;0,0001</b>
TTPa (seg)	29,80 [27,85 - 33,10]	36,15 [32,13 - 40,70]	30- 35	<b>0,0026</b>
Fibrinogênio (mg/dL)	291,0 [239,0-369,0]	302,0 [210,5 - 443,5]	180-350	0,8361

Na tabela 3 os valores de mediana [intervalo interquartil (IQR)] são fornecidas: WBC= Contagem de glóbulos brancos, RBC= contagem de glóbulos vermelhos, Hba= hemoglobina, Hto= hematócrito, VCM= Volume corpuscular médio, HCM= Hemoglobina corpuscular média, CHCM= Concentração da hemoglobina média e PLT= Plaquetas.

Valores de mediana [intervalo interquartil (IQR)] são fornecidas: LDH= Lactato Desidrogenase, UA= Ácido úrico.

Valores de mediana [intervalo interquartil (IQR)] são fornecidas: TAP=Tempo de atividade da Protrombina, INR= Razão de Normalizada internacional, TTPa= Tempo de Tromboplastina parcial ativada.

Valores de referência seguidos conforme a instituição de pesquisa, *p* valor <0,05 = valor de significativo. Teste Man-Whitney aplicado na tabela 3

**Identificação das variantes no éxon 09 em pessoas com TE e MF.**

Identificou-se variantes na região do éxon 09 do gene CALR. As variantes *rs1555760738*, *rs765476509* foram classificadas como patogênicas de acordo com a plataforma ClinVar-NCBI (37)A variante COSV57129834 foi classificada como benigna na plataforma VARSOME (38). Durante a análise, também foi identificada a variante *rs1049481* (G>C,T), localizada na região 3`UTR (região não traduzida) do éxon 09, e foi classificada como benigna conforme a plataforma VARSOME2 (38). Todas as variantes identificadas na presente pesquisa estão descritas no quadro 1.

**Quadro 1.** Identificação de variantes no éxon 9 do gene CALR em pacientes com TE e MF.

Localização	Variação	ID Cosmic*	ID da variante dbSNP*	Variação na proteína**	Significado clínico**	Tipos de variação **
Éxon 9 do gene <i>CALR</i>	c.1092_1143del52 (TIPO 01)	COSV57116546	<i>rs1555760738</i>	p.L367Tfs*46	patogênico	Deleção - Frameshift
	c.1154_1155insTTGTC (TIPO 02)	COSV57116551	<i>rs765476509</i>	p.K385Nfs*47	patogênico	Inserção-frameshift
	c.1154_1155insATGTC (TIPO 02)	COSV57118194	<i>rs765476509</i>	p.E386Cfs*46	patogênico	Inserção-frameshift
	c.1155_1156insTGTCG (TIPO 02)	COSV57117852	<i>rs765476509</i>	p.E386Cfs*46	patogênico	Inserção-frameshift
	c.1099 C > A	COSV57129834		p.L367I	benigna	Substituição de bases
Região 3' UTR	NC_000019.10:12943966:G:C NC_000019.10:12943966:G:T G>C,T		<i>rs1049481</i>		benigna	Variante de transcrição gênica
*Registro das variantes encontradas descrito de acordo: ID Cosmic (COSMIC) e ID da variante (dbSNP)						
**Variação de proteína, significado clínico e tipo de variação descritos de acordo com as plataformas CLINVAR e VARSOME						

Os resultados da análise do éxon 09 do gene *CALR* indicam a distribuição das variantes genéticas no gene *CALR* nas duas neoplasias mieloproliferativas, com uma maior prevalência da variante do tipo 2.

Dos pacientes TE, 23% apresentaram variantes *CALR*, dos quais 28,6% apresentaram variantes tipo 1 (c.1099\_1150del) e 71,4% com variantes tipo 2 (c.1154\_1155insTTGTC, c.1154\_1155insATGTC, c.1155\_1156insTGTCG). Dos pacientes com MF, 25% apresentaram a variante *CALR*, desses 01 apresentou a variante *CALR* tipo 1 (c.1099\_1150del) em heterozigose e 01 a variante *CALR* tipo 2 (c.1154\_1155insATGTC) em homozigose (Tabela 04).

A variante rs1049481 (G>C,T), localizada na região 3'UTR, foi identificada em 49,3% da amostra total. Dos pacientes com essa variante, 85,3% são TE e 14,7% são MF. Verificou-se um indivíduo da amostra com MF com duas variantes: *CALR* tipo 2 e rs1049481. A variante benigna COSV57129834 (c.1099 C > A) foi identificada em um paciente com TE. A variante não descrita c.1144-1254del (110pb) foi identificada em um paciente com TE (Tabela 04).

Quanto a variante rs1049481 na população em estudo, constatou-se que 65,5% dos pacientes com TE apresentaram genótipo GT e 34,5% genótipo TT. Quanto aos pacientes com MF, 60% apresentaram genótipo TT e 40% genótipo GT. Informações detalhadas sobre a distribuições desses genótipos na população são apresentadas nas tabelas 4.

**Tabela 4.** Distribuição das variantes no éxon 09 do gene *CALR* em pacientes com TE e MF

	Grupo	Varição no cDNA	TE (n= 61)	MF (n= 8)	Total
Éxon 9 do gene <i>CALR</i>	Tipo 1	c.1099_1150del	4	1	5
	Tipo 2	c.1154_1155insTTGTC	9	-	9
		c.1154_1155insATGTC	-	1	1
		c.1155_1156insTGTCG	1	-	1
	Outros	c.1099 C > A	1	-	1
			<b>TE</b>	<b>MF</b>	
Região 3' UTR		rs1049481 (G > C,T)	10 (34,5%) TT 19(65,5%) GT	3 (60,0%) TT 2(40,0%) GT	13 21

Abreviações. TE: trombocitemia essencial, MF: mielofibrose e UTR : untranslated region.

A análise dos resultados incluiu a comparação entre pacientes com variantes CALR tipo 1, tipo 2 e pacientes sem variantes. Nessa análise, considerou-se apenas as variantes no éxon 9 do gene CALR classificadas como patogênicas. Não se descarta a possibilidade de haver outras variantes presente nas MNPs, não estudadas na presente pesquisa (Tabela 5).

### **Análise das variantes tipo 1 e 2 no éxon 9 do gene CALR em TE**

Quanto ao gênero, observou-se que os pacientes com TE, tanto com a variante tipo 1 e variante tipo 2, são predominantemente mulheres. A média de idade da população com a variante tipo 1 foi 58,5 anos e com a variante tipo 2 foi de 60,5 anos, enquanto os pacientes que não apresentaram nenhuma variante tiveram idade média de 56,5 anos (Tabela 05).

Verificou-se que as contagens de glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina, índices hematimétricos, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média apresentaram-se dentro do esperado na clínica de TE e MF, sem diferenças entre indivíduos com e sem variantes.

A contagem plaquetária revelou que os indivíduos com as variantes CALR tipo 1 e CALR tipo2 apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo negativo para as variantes (tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com TE

Variáveis	Valores de referência	Tipo 1 (n=4)	Tipo 2 (n=10)	Negativo (n= 16)	p-valor	p-valor tipo 1 vs tipo2	p-valor tipo 1 vs negativo	p-valor tipo 2 vs negativo
Homens/ Mulheres, n (%)		1/3	4/6	4/12	-	-	-	-
Esplenomegalia, n (%)		2	1	4	-	-	-	-
Eventos trombóticos, n (%)		1	1	2	-	-	-	-
Eventos hemorrágicos, n (%)		0	4	4	-	-	-	-
Idade (anos)		58,50 [45,00-77,25]	60,50 [44,00 - 76,75]	56,50 [42,50- 76,00]	0,924			
RBC (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ]	3,9-5,3	3,78 [3,41 - 3,91]	3,83 [3,19- 4,66]	3,90 [3,28 - 4,55]	0,876	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Hto (%) Md [IIQ]	36-48	35,50 [33,78 - 37,38]	37,25 [34,23 - 41,55]	40,45 [34,55- 41,93]	0,353	0,9537	0,4534	>0,9999
Hb (g/dL) Md [IIQ]	12-16	11,45 [10,20 - 12,25]	12,35 [10,90- 13,80]	13,05 [12,15 - 13,98]	0,159	0,5220	0,1673	>0,9999
VCM (fL) Md [IIQ]	80-100	92,35 [88,85 - 108,8]	105,3 [87,78 - 107,1]	100,3 [89,23 - 119,9]	0,505	>0,9999	0,9839	>0,9999
HCM (pg) Md [IIQ]	27-33	30,00 [26,85 - 35,33]	33,90 [28,20 - 35,58]	33,85 [29,80 - 38,35]	0,323	>0,9999	0,4865	>0,9999
CHCM (g/dL) Md [IIQ]	32-36	31,65 [30,29 - 33,38]	32,25 [31,80 - 33,28]	33,30 [32,08 - 33,78]	0,347	>0,9999	0,4907	>0,9999
WBC (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ]	3.600-11.000	7.650 [3,743 - 10,41]	5.130 [3,710- 7,350]	4.830 [3,060 - 5,753]	0,411	>0,9999	0,5596	>0,9999
PLT (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ]	150.000-400.000	547.500 [346,8 - 683,8]	589.500 [504,5- 828,8]	459.500 [308,3- 512,8]	0,046	>0,9999	0,5225	0,0543

Valores de referência seguidos conforme a instituição de pesquisa.

p valor <0,05 = valor de significativo . Teste Kruskal- Wallis e pós Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, aplicado na tabela 5

### Análise das variantes tipo 1 e 2 no éxon 9 do gene CALR em MF

Nos pacientes com MF, identificou-se dois pacientes com variantes, sendo um com o subtipo 1 e outro com subtipo 2. Os dois pacientes são do gênero masculino, possuem idade 54 anos (CALR tipo 1) e 47 anos (CALR tipo 2). Os indivíduos negativos para variantes CALR em MF apresentaram faixa etária média de 71,5 anos.

Na apresentação clínica, a esplenomegalia estava presente nos dois pacientes com variantes CALR, juntamente com um paciente negativo para as variantes. Não foram evidenciados casos de eventos trombo-hemorrágicos no estudo.

Os resultados hematológicos mostraram que os pacientes CALR tipo 1 e os negativos apresentaram normalidades para RBC, Hto, Hba. Por outro lado, o paciente com CALR tipo 2 (em homozigose) apresentou níveis muito baixos em RBC, Hto e Hba.

Em relação às plaquetas, observou-se um aumento na contagem para o paciente CALR tipo 1 (em heterozigose), enquanto houve uma diminuição para o paciente com a variante CALR tipo 2 (em homozigose). Pacientes com MF sem a variante apresentaram esse índice dentro dos valores de referência. Os resultados são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com MF.

Variáveis	Valores de referência	Tipo 1 (n= 1)	Tipo 2 (n= 1)	Negativo (n= 2)	p-valor
Homens/ Mulheres, n (%)		1(H)	1(H)	1/1	
Esplenomegalia, n (%)		1	1	1	
Idade (anos)		54	47	71,50 [69,00- 74,00]	0,500
RBC x mm <sup>3</sup> Md [IIQ]	3,9-5,3	5,10	3,10	4,74 [2,970 - 6,520]	>0,999
Hto (%) Md [IIQ]	36-48	40,40	23,20	39,15 [27,10 - 51,20]	0,833
Hb (g/dL) Md [IIQ]	12-16	12,30	7,000	12,85 [8,500 - 17,20]	0,833
VCM (fL) Md [IIQ]	80-100	79,20	74,80	84,85 [78,50 - 91,20]	0,833
HCM (pg) Md [IIQ]	27-33	24,10	22,60	27,50 [26,40 - 28,60]	0,500
CHCM (g/dL) Md [IIQ]	32-36	30,40	30,20	32,50 [31,40 - 33,60]	0,500
WBC (x mm <sup>3</sup> ) Md [IIQ]	3,600-11,000	4,360	12,040	12,240 [8,180- 16,30]	0,833



PLTs x mm <sup>3</sup>	150,000-400,000	522,000	106,000	275,00	0,500
Md [IIQ]				[219,0 - 331,0]	

Valores de referência seguidos conforme a instituição de pesquisa  
 $p$  valor <0,05 = valor de significativo . Teste Kruskal- Wallis aplicado na tabela 6

## Discussão

Variantes no éxon 09 do gene CALR comprometem a estrutura e funcionalidade da proteína, principalmente exercida no domínio C, que desempenha funções essenciais, como a ligação de cálcio, retenção da calreticulina no retículo endoplasmático e crescimento celular (39–41). Essas variantes resultam em mudanças na sequência de aminoácidos e a remodelagem do domínio C, levando à eliminação da sequência KDEL(17,42,43). Essa estrutura variante permite que a calreticulina saia do retículo endoplasmático e se ligue aos receptores da trombopoietina na membrana celular, ativando via de sinalização JAK-STAT(24,44,45). Embora o processo ainda não esteja totalmente compreendido, essa alteração está associada à proliferação anormal de megacariócitos e à produção de plaquetas presentes, características observadas em paciente com TE e MF(17,27,44,46).

Nesse estudo, foram incluídos 61 pacientes com TE e 8 pacientes com MF, com o objetivo de investigar variantes presentes no éxon 09 do gene CALR nesses pacientes e possível associação com características clínicas e laboratoriais.

Investigação e identificação de variantes no gene CALR, desempenham um papel fundamental no diagnóstico preciso de TE e MF, permitindo obter respostas cruciais relacionadas ao controle proliferativo dessas neoplasias mieloproliferativas, fornecendo uma base sólida para a compreensão do surgimento da patogênese e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas e eficazes para TE e MF.

Ao analisar o perfil dos pacientes do presente estudo, foi observado uma prevalência de pacientes do gênero feminino no grupo de TE e faixa etária predominante entre a sexta e sétima década de vida (47,48). Por outro lado, o grupo de MF teve maior predominância de pacientes masculinos, com idade média de 61,8 anos. Esses dados corroboram com os indicadores alcançados pela OMS(2,4,49). Além disso, maior prevalência do gênero feminino em pessoas com TE também foi observada em outros estudos (50,51), assim como em MF, onde estudos também mostram maior prevalência no gênero masculino (49,52,53).

Em relação às manifestações clínicas, os casos de esplenomegalia presentes nos

grupos de MF e TE são consistentes com essas patologias (2,4,54,55)

Em relação ao evento trombo-hemorrágicos em TE, esses achados estão de acordo com as características clínicas conhecidas da TE, que frequentemente envolve um aumento anormal no número de plaquetas no sangue, predispondo alguns eventos trombóticos e hemorrágicos(56,57). De forma geral, na avaliação hematológica, todos os pacientes atenderam a um perfil normal de produção de linhagem eritrocitária. Embora tenha sido observado um aumento na contagem de plaquetas, os valores permaneceram dentro dos parâmetros da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2,4), assim como os dados encontrados relacionados a bioquímica e homeostáticas(21,58). Esses dados, possivelmente, refletem ao tratamento terapêutico, cuja análise não faz parte do escopo dessa pesquisa.

Em relação aos MF, os pacientes apresentaram um perfil laboratorial de alterações de produção eritrocitária e elevada quantidade de leucócitos, assim como os níveis bioquímicos e homeostáticos normalmente visto para esta patologia. Foram identificadas alterações de produção de plaquetas, porém isso pode ocorrer ou não como descrito em outros trabalhos (2,52,54).

As variantes identificadas por Klampf T (17) e Nangalia J (18) no éxon 09 do gene CALR foram também identificadas na população em estudo. Além disso, foi identificada outra variante de substituição de base (c. 1099 C > A) classificada como benigna pelo banco de dados genéticos Varsome(38). É importante ressaltar que a identificação não se limitou à área do éxon 09, pois identificamos uma variante de transcrição gênica (rs1049481) na região 3'UTR, cujo significado clínico no site ClinVar-NCBI é descrito como benigno(59,60).

Nossos achados sobre a distribuição das variantes no gene CALR na população estudada estão em concordância com a literatura. Um estudo coordenado por Sun C et. al, identificou variantes CALR em 30% da população com TE (61). Rumi E et al, com 24,5% em TE (55) e Lin N et al, que encontrou 20% em TE e 28% em MF(62) Enquanto, Safavi M. et al, com 26,3% de pacientes com NMPs com variantes para o gene CALR (63). E no Brasil em pacientes com MF, revelou que 37% tiveram variantes no gene CALR (64). Esses estudos reforçam a importância da investigação genética para o apoio ao diagnóstico.

A distribuição dessas variantes difere de acordo com a neoplasia. Geralmente é encontrada a prevalência da variante tipo 01, rs1555760738 (c.1099\_1150del), em

indivíduos com MF, enquanto a variante tipo 02, rs765476509 (c.1154\_1155insTTGTC), são distribuídas entre os dois grupos TE e MF (5,52).

Categorizado como CALR tipo 2, a rs765476509 no presente estudo foi observada com maior prevalência em pacientes com TE, corroborando com o observado nos estudos de Witold Prejzner et al., e Rattarittamrong E. et al.,(65,66), no Brasil por Neto P et al., e Monte-Mor B et al., (67,68). No entanto trabalhos como de Pan Y. et al, Sun C et al., Gulbay G. et al., Safavi M. et al., Tefferi et al., e Pietra et al. relatam inversão da frequência de distribuição, com maior prevalência da variante CALR tipo 1 nas populações respectivamente estudadas (32,49,51,61,63,69).

Associando essas variantes aos dados clínicos, os pacientes com a variante tipo 02 com TE apresentaram aumento de plaquetas, dados também semelhantes em outros estudos (32,51,53,67,68,70). Observou-se que os subtipos de variantes não apresentaram um impacto profundo entre os demais resultados laboratoriais, confirmando com outros estudos realizados (49,51,66,69).

Entre nossas amostras de pacientes com MF, a análise seguiu de forma descritiva devido ao número limitado de amostra disponível. Foram identificados dois indivíduos com variantes CALR de subtipos diferentes, sendo CALR tipo 1 em heterozigose e CALR tipo 02 em homozigose, sendo essa considerada uma variação rara em NMPs (17,18).

Ao avaliarmos o paciente com a variante tipo 01 em relação ao paciente com a variante tipo 02, observa-se que o segundo possui alteração nos dados RBC, Hto, Hb, VCM, HCM, CHCM e trombocitopenia significativa. Esses dados nos levam a supor que a variante tipo 02 em homozigose pode contribuir para uma maior gravidade evolutiva da doença e ainda considerando-se se tratar de um paciente jovem (47 anos) (52,68,71).

Destaca-se que no paciente com a variante tipo 01 houve aumento significativo de plaquetas e que os pacientes sem variantes apresentaram os dados supracitados dentro dos parâmetros de referência(68). Estudos posteriores devem ser realizados para essa investigação.

As observações encontradas em nosso estudo estão em consonância com trabalhos já descritos em MF. Tefferi et al., demonstrou em dois estudos diferentes que CALR tipo 2 está mais associado a quadros clínicos mais complexos, incluindo leucocitose, presença de blastos, esplenomegalia palpável e menor sobrevida (72,73), resultados também observados nos estudos de Li et al., e Kim H et al.,(28,74) No entanto, Pietra et al, não

encontrou diferenças significativas nos parâmetros clínicos e laboratoriais entre os subtipos de variantes em MF relacionado a idade, hemoglobina, leucócitos, blastos e plaquetas (32).

Pouco se conhece sobre os mecanismos real que induz a ativação constitutiva independente de citocinas em células hematopoiéticas. A teoria indica que a presença de variantes o CALR tipo 2, retenha trechos mais longos de aminoácidos ácidos (cargas negativas) em relação a CALR selvagem, gerando uma neutralização de cargas eletrônicas pela entrada de aminoácidos básicos (cargas positivas). Enquanto CALR tipo 1 gera encurtamento da sequência de aminoácidos de cargas negativas alterando a estrutura hélice do domínio formando proteínas mais alterada, impactando nas ligações de íons de cálcio citoplasmático, de ligação direta ao receptor MPL contribuindo para a patogênese da TE e MF (5,15,17,32,73,75,76).

Considerando MF, tendo somente duas representações de subtipos de variantes, não podemos fechar uma distribuição e perfil clínicos e genético da população estudada. Estudos adicionais em populações maiores devem ser realizados para se determinar a frequência de variantes em TE e MF, assim como a influência terapêutica utilizada ao tratamento (53,77,78). Deve-se considerar, ainda, o estudo em pacientes em início do tratamento para melhor avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais.

Os dados do presente estudo mostram a importância da caracterização genética de pacientes com TE e MF para apoio ao diagnóstico e avaliação do prognóstico visando melhores estratégias de tratamento, tendo em vista que as variantes possivelmente estão associadas a alterações nas plaquetas.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à equipe de apoio ao ensino do laboratório de Genômica (HEMOAM), laboratório de Genômica (CAM/UFAM). O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pro-Estado Program-#002/2008, #007/2018 and #005/2019, POSGRAD Program-#005/2022), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Conflito de Interesse**

Os autores declaram não possuir conflito de interesse.

## Referências

1. Nangalia J, Green AR. Review Article Myeloproliferative neoplasms : from origins to outcomes. 2017;130(23):2475–83.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Leri SAP, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Revised 4t. World Health Organization. 2017.
3. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–79.
4. Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng W joo, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours : Myeloid and Histiocytic / Dendritic Neoplasms. 2022;(June).
5. Choi MAJ and CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. Vol. 35, *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2020.
6. Marneth AE, Mullally A. *The Molecular Genetics of Myeloproliferative Neoplasms*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2020;
7. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008;3–13.
8. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *The Economics of Population Growth*. 1951;6(4):486–92.
9. Dale M, Abraham E, Editor A, Wagner PD, Spivak JL. Thrombocytosis, Polycythemia Vera, and JAK2 Mutations: The Phenotypic Mimicry of Chronic Myeloproliferation. *PHYSIOLOGY IN MEDICINE: A SERIES OF ARTICLES LINKING MEDICINE WITH SCIENCE*. 2010;152:301.
10. Szybinski J, Meyer SC. Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of NA [Internet]*. 2021;35(2):217–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.12.002>
11. Stanley RF, Steidl U. Molecular mechanism of mutant CALR–Mediated transformation. *Cancer Discov*. 2016;6(4):344–6.
12. Torres DG, Paes J, Costa AG, Malheiro A, Silva G V, Souza LP De, et al. JAK2 Variant Signaling : Genetic , Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. 2022;
13. Spivak JL. Mutated CALR: Tails from the crypt. *Blood [Internet]*. 2019;133(25):2630–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2019-04-901132>
14. Rao S, Carlson K. Mutant CALR ’ s “ sweet tooth .” 2022;140(11):1187–9.
15. Araki M, Komatsu N. The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol [Internet]*. 2020;111(2):200–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02800-0>
16. Tremblay D, Yacoub A, Hoffman R. Overview of MPNs: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022;35(2):159–76.
17. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25):2379–90.
18. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 . *New England Journal of Medicine*. 2013;369(25):2391–405.
19. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):842–6.
20. Agellon LB, Michalak M. Cellular Biology of the Endoplasmic Reticulum. 2021.
21. Wilkins BS. Myeloproliferative neoplasms. *Diagn Histopathol*. 2021;2168–81.
22. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. 2009;417(3):651–66.
23. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G. Calreticulin and cancer. *Cell Res [Internet]*. 2020;(April):1–12.

- Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-0383-9>
24. Cazzola M. Mutant calreticulin : when a chaperone becomes intrusive. *Blood*. 2016;127(10):1219–21.
  25. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017;102(1):7–17.
  26. Vargas-parada L, Mendlovic PF, Medicina MS, Nacional U, Anahuac U, Conconi M, et al. Calreticulina : uma proteína multifacetada. 2021;(i):2–5.
  27. KanduÅa Z, Lewandowski K. Calreticulin- A multifaced protein. *Postepy Hig Med Dosw*. 2021;75:328–36.
  28. Kim HY, Han Y, Jang JH, Jung CW, Kim SH, Kim HJ. Effects of CALR-Mutant Type and Burden on the Phenotype of Myeloproliferative Neoplasms. *Diagnostics*. 2022;12(11):2570.
  29. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(24):3714–9.
  30. Masubuchi N, Araki M, Yang Y, Hayashi E, Imai M, Edahiro Y, et al. Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0564-z>
  31. Prins D, Green AR. Mutant CALR functions : gains and losses. *Blood* [Internet]. 2020;136(1):6–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020005805>
  32. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V., Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431–8.
  33. Estey E. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelo fi brosis and essential thrombocytemia : relevance for disease evolution. 2015;(September 2014):2013–6.
  34. Paithankar KR, Prasad KSN. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(6):1346.
  35. Silva GAV, Naveca FG, Ramasawmy R, Boechat AL. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):130–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.12.002>
  36. Lis JT. Thus, we believe this peak splitting is not due to heterogeneity in the DNA fragments but is due to a column artifact. [42] F r a c t i o n a t i o n o f D N A F r a g m e n t s b y P o l y e t h y l e n e G l y c o l Induced Precipitation. *Methods*. 1980;65(1974):347–53.
  37. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062–7.
  38. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978–80.
  39. Constantinescu SN, Pecquet C. CALR Mutations in MPN. 2020;4:102–4.
  40. Mex RH, Morales-herrej R, Cort C. Mutaciones en el gen CALR y su papel en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas Mutations in CALR gene and its role in the diagnosis and prognosis of chronic. 2021;22(2):88–96.
  41. Varricchio L, Falchi M, Dall’Ora M, De Benedittis C, Ruggeri A, Uversky VN, et al. Calreticulin: Challenges posed by the intrinsically disordered nature of calreticulin to the study of its function. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5(NOV):1–19.
  42. Jaiswal A, Wang Z, Zhu X, Ju Z. Unraveling the Connections between Calreticulin and Myeloproliferative Neoplasms via Calcium Signalling Keywords. 2021;1–44.
  43. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticulum. *Am J Hematol*. 2014;89(5):453–6.
  44. Schürch PM, Malinowska L, Hleihil M, Losa M, Hofstetter MC, Wildschut MHE, et al. Calreticulin mutations affect its chaperone function and perturb the glycoproteome. *Cell Rep*. 2022;41(8).
  45. Shide K, Shide K. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;1–53.
  46. Constantinescu SN, Vainchenker W, Levy G, Papadopoulos N, Stefanconstantinescubrulicorg

- CSNC. Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms.
47. Pereira MLL, Furtado ALR, Pinto FCR, Flor AC, Teixeira AB, Maia Filho PA. Trombose essencial: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2020;52(1):27–31.
  48. Zaidi U, Sufaida G, Rashid M, Kaleem B, Maqsood S, Mukry SN, et al. A distinct molecular mutational profile and its clinical impact in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis patients. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1–10.
  49. Gulbay G, Bag HG, Yesilada E, Erkurt MA. Calreticulin Mutations in Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms. *UHOD - Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 2022;32(2):075–80.
  50. Loghavi S, Bueso-ramos CE, Kanagal-shamanna R, Ok CY, Salim AA, Routbort MJ, et al. Myeloproliferative Neoplasms With Calreticulin Mutations Exhibit Distinctive Morphologic Features. 2016;418–27.
  51. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol*. 2014;89(8):121–4.
  52. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: Relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249–52.
  53. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. 2014;99(7):1184–90.
  54. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(4):308–16.
  55. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. 2014;123(10):1544–51.
  56. Bittencourt RI, Fogliato L, Paz A, Souza MP, Lerner D. Trombocitose essencial: o que é essencial saber. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(SUPPL. 1):97–105.
  57. Torres BRS, Lins SR de O. Relações Genéticas Da Trombocitemia Essencial: Uma Revisão Narrativa Da Literatura / Genetic Relationships of Essential Thrombocythemia: a Narrative Literature Review. *Brazilian Journal of Development*. 2020;6(12):94154–64.
  58. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis : An International Study. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY ORIGINAL*. 2011;29(23):3179–84.
  59. Zagaria A, Tarantini F, Orsini P, Anelli L, Cumbo C, Coccaro N, et al. The genomic analysis brings a new piece to the molecular jigsaw of idiopathic erythrocytosis. *Exp Hematol Oncol [Internet]*. 2022;10–3. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00301-1>
  60. Anelli L, Orsini P, Zagaria A, Minervini A, Coccaro N, Parciante E, et al. Erythrocytosis with JAK2 GGCC\_46/1 haplotype and without JAK2 V617F mutation is associated with CALR rs1049481\_G allele. *Leukemia [Internet]*. 2021;35(2):619–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0847-4>
  61. Sun C, Zhou X, Zou ZJ, Guo HF, Li JY, Qiao C. Clinical Manifestation of Calreticulin Gene Mutations in Essential Thrombocythemia without Janus Kinase 2 and MPL Mutations : A Chinese Cohort Clinical Study. 2016;129(15):11–6.
  62. Li N, Yao QM, Gale RP, Li JL, Li L Di, Zhao XS, et al. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2V617F or MPL mutations. *Leuk Res [Internet]*. 2015;39(5):510–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.02.006>
  63. Safavi M, Monabati A, Safaei A, Mirtalebi MS, Faghieh M. JAK2, CALR, and MPL mutation profiles in BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms, a referral center experience in the middle east. *Iran J Pathol*. 2021;16(2):190–4.
  64. Nonino A, Campregher PV, de Souza Santos FP, Mazzeu JF, Pereira RW. Genomic characterization and prognostication applied to a Brazilian cohort of patients with

- myelofibrosis. *Int J Hematol* [Internet]. 2020;112(3):361–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02906-w>
65. Rattarittamrong E, Tantiworawit A, Kumpunya N, Wongtagan O, Tongphung R, Phusua A, et al. Calreticulin mutation analysis in non-mutated Janus kinase 2 essential thrombocythemia patients in Chiang Mai University: analysis of three methods and clinical correlations. *Hematology* [Internet]. 2018;23(9):613–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1448699>
  66. Witold Prejzner, Andrzej Mital, Maria Bieniaszewska, Aleksandra Leszczyńska, Agata Szymańska, Michał Czarnogórski AH, Department. Clinical characteristics of essential thrombocythemia patients depend on the mutation status. 2020;51(December):230–5.
  67. Neto PL de F. Caracterização clínica e molecular de pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica – cromossomo Ph- negativo [Internet]. Vol. 106, *Bulletin of the Seismological Society of America*. 2016. Available from: <http://www.bssaonline.org/content/95/6/2373%5Cnhttp://www.bssaonline.org/content/95/6/2373.short%0Ahttp://www.bssaonline.org/cgi/doi/10.1785/0120110286%0Ahttp://gji.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gji/ggv142%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/s00024-01>
  68. Monte-Mor B da CR, Ayres-Silva J de P, Correia WD, Coelho AC, Solza C, Daumas AH, et al. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2016;60:74–7.
  69. Pan Y, Wang X, Wen S, Liu X, Yang L, Luo J. The different variant allele frequencies of type I/type II mutations and the distinct molecular landscapes in CALR-mutant essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Hematology (United Kingdom)*. 2022;27(1):902–8.
  70. Terra L, Lasho, Christy M, Finke, Alexander Tischer, Animesh Pardani AT. Mayo CALR mutation type classification guide using alpha helix propensity Predictive value of the new renal response criteria in AL amyloidosis treated with high dose melphalan and stem cell transplantation. 2018;2(February):128–9.
  71. Rizvi Q, Zaidi U, Shahid S, Ahmed S, Shamsi T. Homozygous CALR Mutation in Primary Myelofibrosis and Its Effect on Disease Phenotype : A Case Report and Review of the Literature. 2019;2019.
  72. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: Differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(7):1568–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.83>
  73. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke C, Belachew AA, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Leukemia*. 2014;28(10):2106–9.
  74. Li B, Xu J, Wang J, Gale RP, Xu Z, Cui Y, et al. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2014;99(11):1697–700.
  75. Tanja B, Pajic T, Matjaz S. OPEN CALR mutations in a cohort of JAK2 V617F negative patients with suspected myeloproliferative neoplasms. 2019;1–9.
  76. Lee JS, Kim HY, Kim M, Lee YK. A Novel Pathogenic CALR Exon 9 Mutation in a Patient with EssentialThrombocythemia. *Lab Medicine*. 2021;51(3):306–9.
  77. Iurlo A, Cattaneo D, Orofino N, Bucelli C, Fabris S, Cortelezzi A. Anagrelide and Mutational Status in Essential Thrombocythemia. *BioDrugs*. 2016;
  78. Verger E, Cassinat B, Dosquet C, Giraudier S. Clinical and molecular response to interferon- a therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood*. 2016;126(24):2585–92.



## 7. CONCLUSÕES

Nesse estudo, os pacientes TE incluídos, foram encontradas variantes na região do éxon 09 do gene CALR, dentre essas as de identificadas como rs1555760738 (uma deleção de 52 pares de base) e rs765476509 (inserção de 5 pares de bases). Com predomínio da rs765476509. Enquanto em grupo de MF, evidenciadas somente duas variantes uma heterozigose e outra homozigose; rs1555760738 e rs765476509 respectivamente.

Indivíduos TE com as variantes rs1555760738 e rs765476509, ambas demonstraram o aumento de plaquetas acima dos valores de referência, tendo o destaque para níveis mais elevados com a rs765476509. Aos indivíduos com TE com a rs1555760738, tiveram alterações discretas no perfil clínico-laboratorial.

Os pacientes MF, os indivíduos com as variantes rs1555760738 e rs765476509 apresentaram perfil clínico-laboratorial divergentes, o que indica a necessidade de mais estudos para compreender melhor o perfil destes grupos.

## 8.REFERÊNCIAS

1. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(4):308–16.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Leri SAP, Stein H, et al. *World Health Organization Classification of Tumours. Revised 4t.* World Health Organization. 2017.
3. Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng W joo, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours : Myeloid and Histiocytic / Dendritic Neoplasms. 2022;(June).
4. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol [Internet].* 2015;43(8):599–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.06.007>
5. Dale M, Abraham E, Editor A, Wagner PD, Spivak JL. Thrombocytosis, Polycythemia Vera, and JAK2 Mutations: The Phenotypic Mimicry of Chronic Myeloproliferation. *PHYSIOLOGY IN MEDICINE: A SERIES OF ARTICLES LINKING MEDICINE WITH SCIENCE.* 2010;152:301.
6. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):667–79.
7. Torres DG, Paes J, Costa AG, Malheiro A, Silva G V, Souza LP De, et al. JAK2 Variant Signaling : Genetic , Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. 2022;
8. Tremblay D, Yacoub A, Hoffman R. Overview of MPNs: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022;35(2):159–76.
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 . *New England Journal of Medicine.* 2013;369(25):2391–405.
10. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine.* 2013;369(25):2379–90.
11. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal.* 2009;417(3):651–66.
12. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G. Calreticulin and cancer. *Cell Res [Internet].* 2020;(April):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-0383-9>
13. Choi MAJ and CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. Vol. 35, *The Korean Journal of Internal Medicine.* 2020.
14. Araki M, Komatsu N. The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol [Internet].* 2020;111(2):200–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02800-0>
15. Terra L. Lasho, Christy M. Finke, Alexander Tischer, Animesh Pardani AT. Mayo CALR mutation type classification guide using alpha helix propensity Predictive value of the new renal response criteria in AL amyloidosis treated with high dose melphalan and stem cell transplantation. 2018;2(February):128–9.
16. How J, Hobbs GS, Mullally A. Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2019;134(25):1–3.
17. Estey E. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia : relevance for disease evolution. 2015;(September 2014):2013–6.
18. Turgeon ML. *Clinical Hematology Theory and Procedures.* Vol. 6. 2018. 1–23 p.
19. Hoffbrand AV. *Fundamentos de hematologia de Hoffbrand.* 2018.
20. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of

- hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):1–13.
21. Benjamin Chun-Kit Tong. Aging and Hematopoiesis. *Physiol Behav.* 2017;176(5):139–48.
  22. Idarin. <https://www.depositphotos.com> [Internet]. 2022. Available from: <https://pt.depositphotos.com/424898146/stock-illustration-vector-types-blood-cells-erythrocytes.html>
  23. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *The Economics of Population Growth.* 1951;6(4):486–92.
  24. Analysis C, Chronic IN, Leukemia M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba.* 2008;10(3):5.
  25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
  26. Passamonti F, Maffioli M. Update from the latest WHO classification of MPNs: A user's manual. *Hematology (United States).* 2016;2016(1):534–42.
  27. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1607–16.
  28. Levine RL, Heaney M. New Advances in the Pathogenesis and Therapy of Essential Thrombocythemia. *American Society of Hematology.* 2008;
  29. Sciences ML, Szalai G, Larue AC, Watson DK, Carolina S, Carolina S. Review Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Review Article.* 2006;63:2460–76.
  30. ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. *Tratado de Hematologia.* Vol. 148. 2014. 925 p.
  31. Lorenzi TF. *Manual De Hematologia Propedêutica E Clínica.*pdf. 4 edição. 2006.
  32. Bittencourt RI, Fogliato L, Paz A, Souza MP, Lerner D. Trombocitose essencial: o que é essencial saber. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(SUPPL. 1):97–105.
  33. Varghese C, Immanuel T, Ruskova A, Theakston E, Kalev-zylinska ML. The Epidemiology of Myeloproliferative Neoplasms in New Zealand between 2010 and 2017 : Insights from the New Zealand Cancer Registry. 2021;1544–57.
  34. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014;123(14):2220–8.
  35. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis : An International Study. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY ORIGINAL.* 2011;29(23):3179–84.
  36. Tefferi A, Pardanani A. Essential Thrombocythemia. Solomon CG, editor. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1816082> [Internet]. 2019 Nov 27 [cited 2023 Jun 30];381(22):2135–44. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1816082>
  37. Valente ACMM, Ribeiro RT. Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* 2021;53(4):344–51.
  38. E Joanna Baxter, Linda M Scott, Peter J Campbell, Clare East, Nasios Fourouclas, Soheila Swanton, George S Vassiliou, Anthony J Bench, Elaine M Boyd, Natasha Curtin, Mike A Scott, Wendy N Erber, the Cancer Genome Project† ARG, Summary. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. 2005;365:1054–61.
  39. Pereira MLL, Furtado ALR, Pinto FCR, Flor AC, Teixeira AB, Maia Filho PA. Trombose essencial: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [Internet]. 2020;52(1):27–31. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.21877/2448-3877.202000882>
  40. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood.* 2008;112(6):2190–8.

41. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008;3–13.
42. Gitleman Lisa. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES MMP2 E MMP9 COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS. In: Paper Knowledge Toward a Media History of Documents. 2014.
43. NASCIMENTO JM, ANÁLISE. ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÕES DRIVER POR MLPA EM PACIENTES COM MIELOFIBROSE. 2017;
44. Rodrigues LP. Aspectos clínicos e laboratoriais da mielofibrose : relato de caso. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto.
45. Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu R V, Mughal TI, Orazi A, et al. Perspectives An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic / myeloproliferative neoplasms ( MDS / MPN ) in adults. *Blood Rev*. 2015;125(12):1857–65.
46. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. *Blood Rev* [Internet]. 2016;30(6):453–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.06.001>
47. Hu X. The JAK / STAT signaling pathway : from bench to clinic. REVIEW ARTICLE OPEN. 2021;(April).
48. Rawlings JS, Kristin M, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. 2004;1:1281–3.
49. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Et V, Iii H, Silvennoinen O, et al. Protein family review The Janus kinases ( Jaks ). *Genome Biol*. 2004;5:253.
50. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900–11.
51. Jit J, Tang H, Kai D, Thng H, Lim JJ, Toh TB. JAK / STAT signaling in hepatocellular carcinoma. 2020;
52. Bader MStephan, Meyer SC. JAK2 in Myeloproliferative Neoplasms : Still a Protagonist. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2022;15:1–13. Available from: <https://doi.org/10.3390/ph15020160>
53. KanduÁa Z, Lewandowski K. Calreticulin- A multifaced protein. *Postepy Hig Med Dosw*. 2021;75:328–36.
54. Varricchio L, Falchi M, Dall’Ora M, De Benedittis C, Ruggeri A, Uversky VN, et al. Calreticulin: Challenges posed by the intrinsically disordered nature of calreticulin to the study of its function. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5(NOV):1–19.
55. Lu YC, Weng W chin, Lee H. Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/526524>
56. Mex RH, Morales-herrej R, Cort C. Mutaciones en el gen CALR y su papel en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas Mutations in CALR gene and its role in the diagnosis and prognosis of chronic. 2021;22(2):88–96.
57. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. 2009;417(3):651–66.
58. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):842–6.
59. Clinton A, McMullin MF. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol*. 2016;69(10):841–5.
60. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(24):3714–9.
61. Machado-Neto JA, Campos P de M, Trainaen F. CALR (calreticulin). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2018 Jul;(3).
62. Cazzola M. Mutant calreticulin : when a chaperone becomes intrusive. *Blood*. 2016;127(10):1219–21.

63. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017;102(1):7–17.
64. Stanley RF, Steidl U. Molecular mechanism of mutant CALR–Mediated transformation. *Cancer Discov*. 2016;6(4):344–6.
65. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V., Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431–8.
66. Martínez LF, Alina C, Alonso D. Biomarcadores en las neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL1 negativas Biomarkers in Classical Myeloproliferative Neoplasms BCR-ABL1 negative. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2019;35(4):1–14.
67. Prins D, González Arias C, Klampfl T, Grinfeld J, Green AR. Mutant calreticulin in the myeloproliferative neoplasms. *Hemasphere*. 2020;4(1).
68. Jaiswal A, Wang Z, Zhu X, Ju Z. Unraveling the Connections between Calreticulin and Myeloproliferative Neoplasms via Calcium Signalling Keywords. 2021;1–44.
69. Araki M, Masubuchi N, Edahiro Y, Hironaka Y, Osaga S, Ohsaka A, et al. A homomultimerização da calreticulina mutante é um pré-requisito para Ligação e ativação de MPL Cultura celular e ensaio de proliferação. *Springer Nature*. 2018;
70. Masubuchi N, Araki M, Yang Y, Hayashi E, Imai M, Edahiro Y, et al. Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0564-z>
71. Edahiro Y, Araki M, Komatsu N. Mechanism underlying the development of myeloproliferative neoplasms through mutant calreticulin. 2020;
72. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325–35.
73. Varghese LN, Defour JP, Pecquet C, Constantinescu SN. The thrombopoietin receptor: Structural basis of traffic and activation by ligand, mutations, agonists, and mutated calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(MAR):1–13.
74. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelo fibrosis. *Blood*. 2016;127(10):1–3.
75. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, de Albuquerque DM, Costa FF, Lorand-Metze I, Olalla Saad ST, et al. Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(3):211–4.
76. Gotlib J. Mutação do gene da calreticulina (CALR) em neoplasias mieloproliferativas. *The Hematologist*. 2015;12(1):6–12.
77. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2013;123(10):1544–51.
78. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* [Internet]. 2014;123(10):1552–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-538983>
79. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia , polycythemia vera , and myelo fibrosis. *Blood* [Internet]. 2014;124(16):2507–13. Available from: <http://www.medscape.org/journal/blood>;
80. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classificação e Prognóstico Personalizado em neoplasias mieloproliferativas J. 2019;1416–30.

## 9. ANEXOS

### 9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

( ) Sim ou ( ) Não

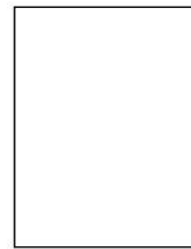


**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACÃO**

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

\_\_\_\_\_

(Assinatura do participante)



\_\_\_\_\_

(Assinatura do pesquisador)

(Impressão dactiloscópica)

Manaus, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## 9.2 PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39991420.6.0000.0009

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.450.813

#### Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

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

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

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

Benefícios:

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

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem delineado, metodologia coerente com objetivos e cronograma.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

Vide conclusões ou pendências.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

Investigador	projeto.pdf	09/11/2020 16:49:52	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	09/11/2020 16:42:42	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Outros	tcud.pdf	09/11/2020 16:38:18	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	hemoam.pdf	09/11/2020 16:35:37	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/11/2020 16:29:12	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Outros	labgen.pdf	09/11/2020 16:23:30	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Outros	SAME.pdf	09/11/2020 16:23:05	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Emanuela.pdf	09/11/2020 16:20:31	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lucivana.pdf	09/11/2020 16:20:05	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Wanessa.pdf	09/11/2020 16:17:36	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Nelson.pdf	09/11/2020 16:17:18	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Dania.pdf	09/11/2020 16:16:56	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Miliane.pdf	06/11/2020 18:14:02	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Juliana.pdf	06/11/2020 18:13:26	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Adriana.pdf	06/11/2020 18:12:50	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Allyson.pdf	06/11/2020 18:12:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Andrea.pdf	06/11/2020 18:12:01	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.450.813

MANAUS, 09 de Dezembro de 2020

---

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

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



## 9.4 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO DE DNA COM REAGENTE BRAZOL

### 1.0. Fase pré-extração de DNA:

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

### 2.0. Fase de extração de DNA:

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

### 3.0. Fase de precipitação do DNA genômico:

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



**IMPORTANTE: verificar se não há resíduo de etanol antes de adicionar água destilada estéril para diluir o DNA (resíduos de etanol podem inibir o DNA);**

8) Quantificar o DNA genômico no Nanodrop;

9) Separar uma alíquota de 5  $\mu$ L para correr em gel de agarose a 1%;

10) Armazenar o DNA purificado a 4°C ou -20°C

## 9.5 PROTOCOLO – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE: ÉXON 09 GENE *CALR*

### 1. Dados do primer

Primer	Sequência (5' – 3')	T <sub>m</sub>	Amplicom
éxon 09 FW	GGC GTA ACA AAG GTG AGG C	60°C	990 pb
éxon 09 RW	CAG CAA CCT CTC TAG CAA TAG C		

### 2. PCR

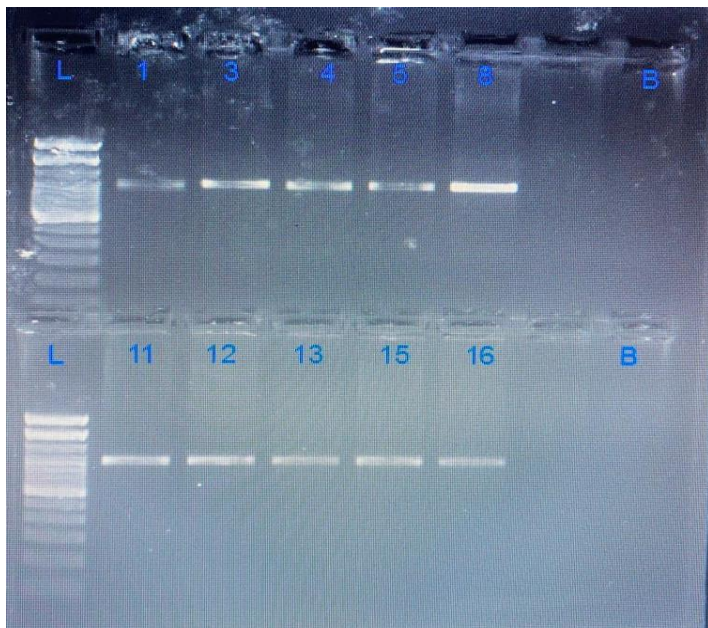
MIX PARA PCR		
Regentes	Concentração da reação	1 reação (VF = 25 µL)
H <sub>2</sub> O	-	11,05
Tampão (10x)	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50Mm)	1,5mM	0,75
Primer FW (10 µM)	0,2 µM	1
Primer RV (10 µM)	0,2 µM	1
dNTP mix (10 mM)	0,2 mM	2,5
TAQ 5U/µL	0,04 U	0,2
DNA	> 30 ng	6 ng/ul
TOTAL	-	25 µL (24 µL + 1 µL DNA)

### 3. Programação do termocilador

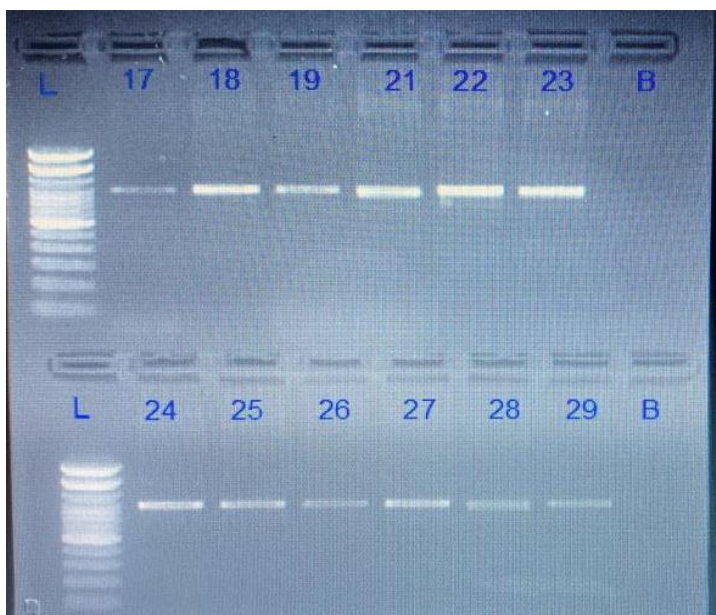
CICLAGEM PARA PCR- <i>CALR</i>			
Temperatura	Fase	Tempo	Ciclos
94°C	<b>Desnaturação inicial</b>	5 minutos	1
94°C	<b>Desnaturação</b>	30 segundos	35
60°C	<b>Anelamento</b>	30 segundos	
72°C	<b>Extensão</b>	1 minuto	
72°C	<b>Extensão final</b>	7 minutos	1
4°C	∞	-	-

**Ao final:** Correr as amostras em gel de Agarose ao 1,5 % corado com brometo de etídio

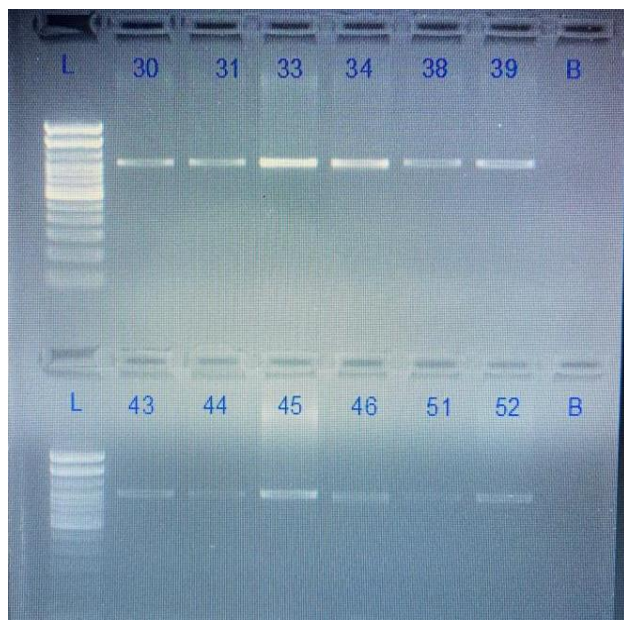
### 9.5.1 PRODUTOS OBTIDOS DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE - ELETROFORESE



**Figura 1:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 1-16:** amostras de pacientes incluídos no estudo.



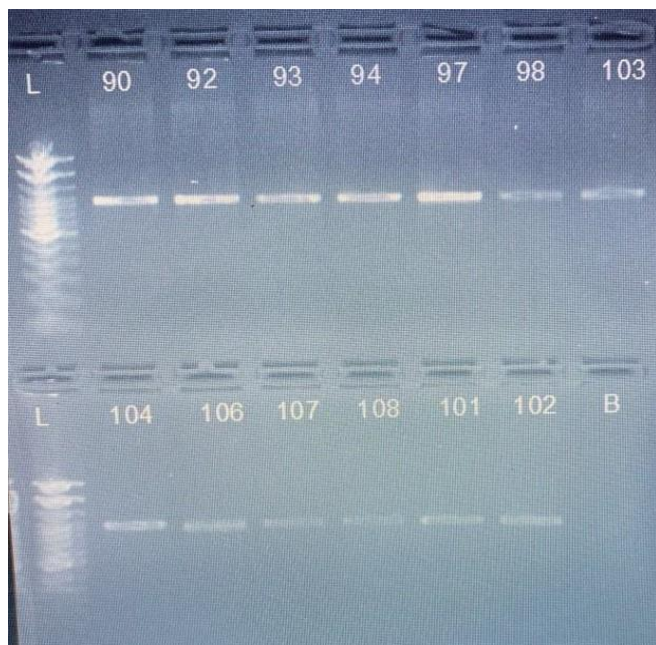
**Figura 2:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 17-29:** amostras de pacientes incluídos no estudo.



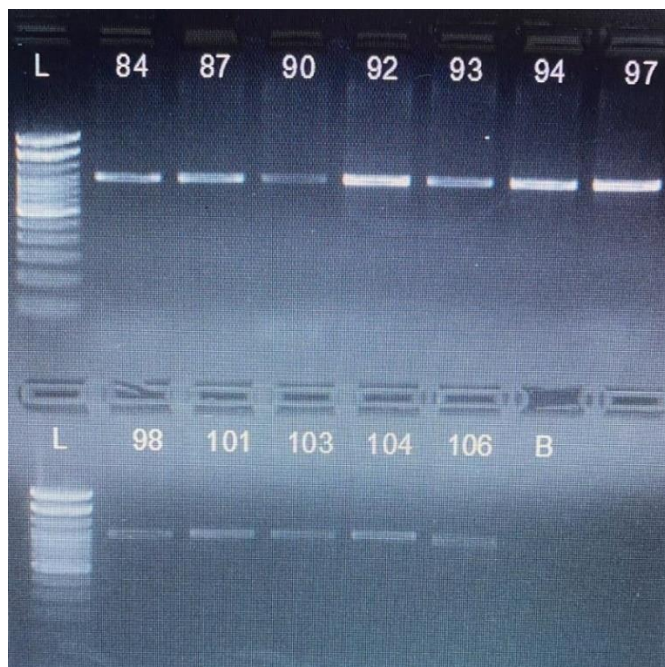
**Figura 3:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 17-29:** amostras de pacientes incluídos no estudo.



**Figura 4:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 62-88:** amostras de pacientes incluídos no estudo.



**Figura 5:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 90-102:** amostras de pacientes incluídos no estudo.



**Figura 5:** Amplificação do extremo 3' da região codificante do gene *CALR* determinada pelo fragmento de 990 pb. **Linha L:** Ladder 100 pb; **Linha B:** Branco; **Linhas 84-106:** amostras de pacientes incluídos no estudo.

## 9.6 PROTOCOLO: PRECIPITAÇÃO DE PRODUTO DA PCR COM POLIETILENOGLICOL (PEG)

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

Antes de iniciar o procedimento:

- Armazene etanol 80% a -20 C. (utilizar etanol 80% ou preparar a partir de etanol absoluto  $C1V1=C2V2$ , sendo V1 meu X)

- Programe o banho-maria seco a 37° C.

- Prepare placas de sequenciamento ou tubos de máximo 1,5 mL.

- Em caso necessário, preparar o PEG 20% W\V PEG 2,5 M NaCl) Para sua preparação, usar:

10 g de PEG 8000

7,3 g de NaCl

Adicione 35 mL de ddH<sub>2</sub>O. Agite para solubilizar o PEG durante 20 min ou até solubilizar. Após agitação, completar o volume para 50 mL com ddH<sub>2</sub>O.

Procedimento:

1-Transfira o volume do PEG no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento.

\*LEMBRE-SE: O volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR. Neste caso 20 uL + 20 uL.

2-Transfira o volume do amplicon no tubo de 1,5 mL ou na placa de sequenciamento. 3-Agite suavemente por 10 seg (em caso de ser tubo) e incube a 37° C por 15 min.

4- Após incubação, centrifugue a 2500 rcf (6000 rpm) por 15 min a temperatura ambiente em caso de ser tubo. Em caso de ser placa centrifugar entre 2200-2500 rcf por 25 min a temperatura ambiente.

5-Descarte o sobrenadante (por inversão da placa) e adicione 125 uL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf (4500 rpm) por 2 min a 4° C.

6-Descarte o sobrenadante, dei um spin com a placa invertida e deixe secando a 60°C por 10 min para remoção de resíduos de etanol. Deixe a placa sem adesivo. Em caso de tubos, a secagem pode ser a 37°C entre 20-50 min.

7-Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione H<sub>2</sub>O milli Q ou ultrapura, adicionando o mesmo volume inicial da PCR (20 uL). \*LEMBRE-SE: Amostras com banda fraca ou pouca quantidade de amostra devem ser ressuspensas em menor quantidade de H<sub>2</sub>O, 12 uL de água.

8-Homogenice e armazene a amostra a -80°C. \*LEMBRE-SE: Antes de armazenar as amostras a -80°C, armazene a 4-5°C por algumas horas para melhor eluição de DNA.

9- Quantificar as amostras pelo menos 3 dias após precipitação, passando do freezer (-80°C) à geladeira 4-5°C pelo menos 2 H antes da quantificação.

## 9.7 PREPARAÇÃO DO MASTEX MIX PARA SEQUENCIAMENTO

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

<b>Mix de Reação de Sequenciamento ( Sanger)</b>		
<b>Reagente</b>	<b>1 Reação Vol (1 uL)</b>	<b>22 Reações (Vol uL)</b>
H2O ultrapura	4,5	99
Tampão 5X	2,0	44
Primer [3.3 Mm]	1,0	22
BigDye	0,5	11
DNA	2,0/1,5/1,0	2
TOTAL por poço/tubo	10	10

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

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

## **9.8 PURIFICAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO (MÉTODO EDTA/ETANOL)**

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

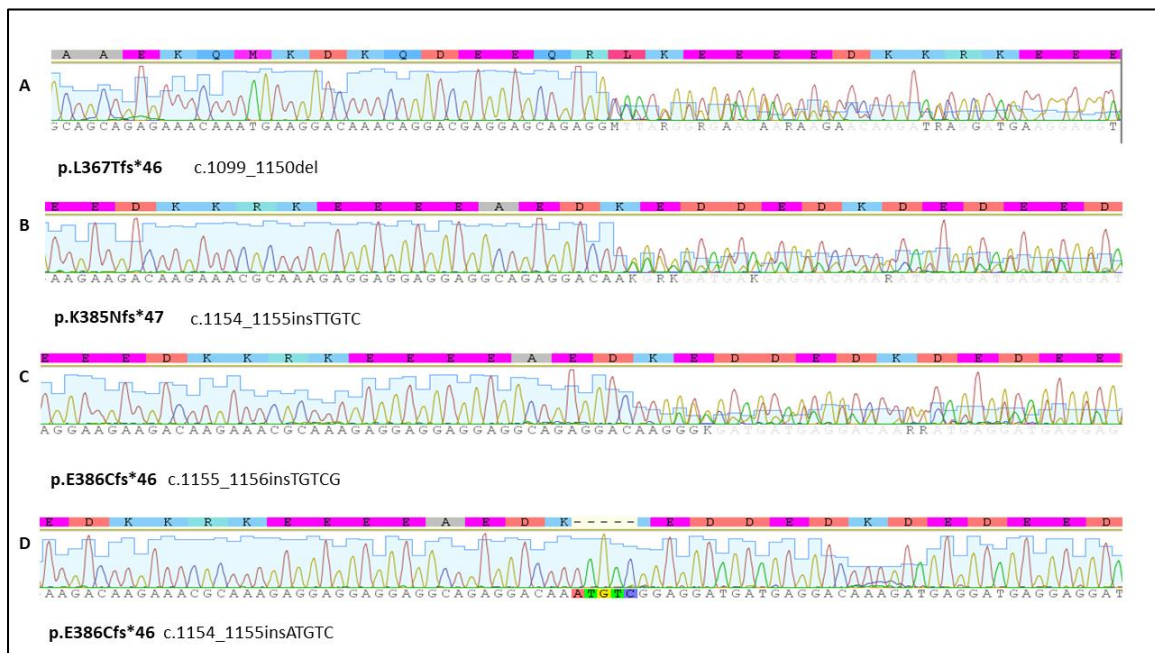
## **9.9 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PRÉ-LEITURA NO SEQUENCIADOR**

Prepare o termociclador ou termobloco a 95°C.

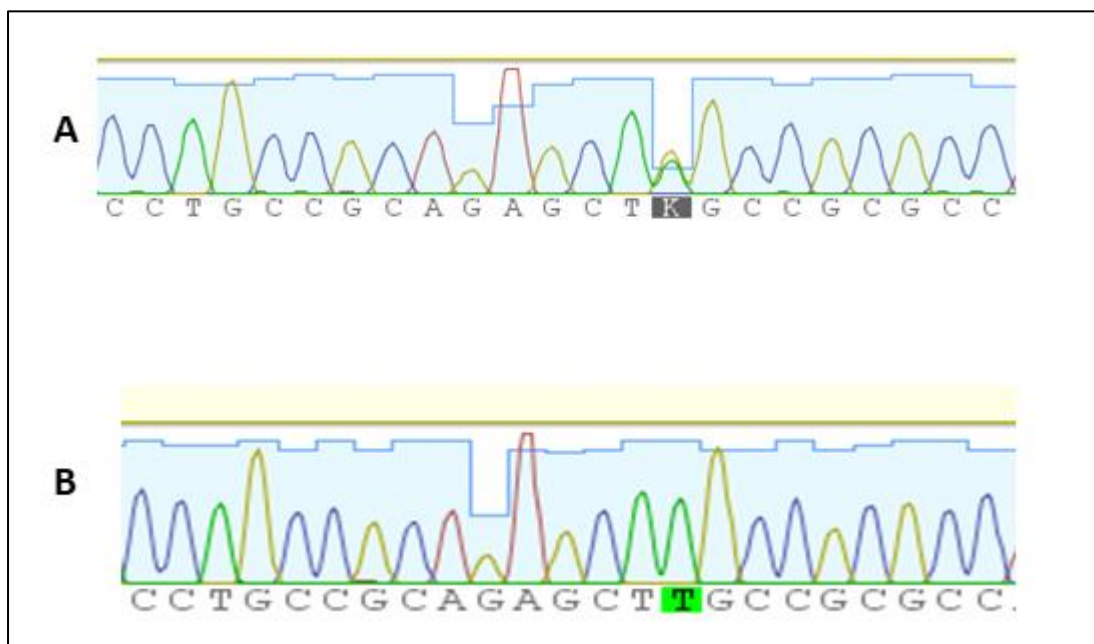
- 1- Nas amostras que foram armazenadas a -20°C, adicione 10 uL de Formamida em cada poço.
  - 2- Realizar um breve spin na placa.
  - 3- Aquecer a placa no termociclador a 95°C por 1 minuto.
  - 4- Ler no sequenciador. (Em caso de não ser lidas nesse momento congelar a -20°C)
- LEMBRE-SE de manter sempre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



## 9.10 VARIANTES IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER



**Figura 17:** Eletroferograma com presença das variantes *CALR*. (A) variante tipo 1 (deleção de 52 pares de bases; c.1099\_1150del); (B) variantes tipo 2 (inserção de 5 pares de bases; c.1154\_1155insTTGTC ); (C) variantes tipo 2 (inserção de 5 pares de bases; c.1155\_1156insTGTCG); (D) variantes tipo 2 ( inserção de 5 pares de bases; c.1154\_1155insATGTC) encontrado neste estudo.



**Figura 18:** Eletroferograma de alguns pacientes mostrando a presença das variantes rs1049481 G> C, T. (A) Heterozigose G/T e (B) Homozigose TT