

MARCELA CAVALCANTE DE ANDRADE SILVA

**Estudo citogenético e molecular de
síndromes mielodisplásicas /
leucemia mieloide aguda familiar**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de Patologia

**Orientadora: Profa. Dra. Elvira Deolinda
Rodrigues Pereira Velloso**

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Marcela Cavalcante de Andrade
Estudo citogenético e molecular de síndromes
mielodisplásicas/leucemia mieloide aguda familiar /
Marcela Cavalcante de Andrade Silva. -- São Paulo,
2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Elvira Deolinda Rodrigues Pereira
Velloso.

Descritores: 1.Leucemia mieloide aguda 2. Pré-
leucemia 3.Deficiência de GATA2 4.Mutação em
linhagem germinativa

USP/FM/DBD-447/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais e irmão.

Agradecimentos

À Dra. Elvira Velloso, pela orientação, parceria e incentivo durante todos estes anos e por despertar em mim o interesse pelas doenças medulares e desafio que, muitas vezes, acompanham estes casos.

A todos os pacientes e familiares que participaram desta pesquisa. Deles recebi ensinamentos e lições de vida que não caberiam nestas páginas.

À Dra. Lucy Godley e a toda a equipe do “Godley Lab”, que não só foram fundamentais para realização dos testes de exoma, como me acolheram com amizade e tanto me ensinaram sobre pesquisa básica e translacional.

Às Dras Ana Krepischi e Carla Rosenberg, pela análise do CGH array.

À Dra. Leslie Kulikowski e sua equipe, em particular, à Dra. Evelin Zanardo, tão importantes na realização do MLPA.

À Dra. Márcia Dezan, Dra. Carla Luana Dinardo e Regina do Laboratório de imunohematologia que me ajudaram a realizar parte dos PCRs.

Ao Dr. Israel Bendit e Luciana Nardinelli, pelo sequenciamento do *RUNX1*.

À Dra. Nair Hideki, que me ajudou a navegar os conceitos de biologia molecular.

À Dra. Jussara Castelli que, pacientemente, revisou comigo todas as biópsias de medula óssea.

À Isabel Mota Romano por sua incrível ajuda com o sistema regulatório e submissões ao CEP e CONEP.

Ao Dr. Felipe Melo, que “abraçou a causa” e foi fundamental na coleta de amostras dos pacientes.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Luiza, Thiana, Luciana, Juliana, Denise, Cynthia, Andreia, Verônica e Alexandra que me apoiaram e tornaram este projeto viável.

A toda equipe do laboratório de Citogenética do HC-FMUSP, em especial, minhas amigas Aline Leal, Maria Gabriella Cordeiro e Patrícia Pinotti, sem vocês nada seria possível!

A meus pais, exemplo e estímulo constante e meu irmão sempre tão influente em minha vida.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, et al.. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. 3º ed. São Paulo: divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas e títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Classificação da OMS para NMPG.....	10
2.1.1 Neoplasia mieloide com predisposição germinativa sem dusfunção orgânica pré-existente.....	10
2.1.1.1 LMA com mutação germinativa de <i>CEBPalpha</i>	10
2.1.1.2 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de <i>DDX41</i>	10
2.2 Plaquetopenia e disfunção plaquetária associada à propensão para NM.....	11
2.2.1 Plaquetopenia familiar e propensão a Neoplasia Mieloide (FPD/MN) associada à mutação do gene <i>RUNX1</i>	11
2.2.2 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de <i>ETV6</i> ou trombocitopenia 5	12
2.2.3 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de <i>ANKRD26</i> ou trombocitopenia 2	13
2.3 Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e outra disfunção de outros órgãos.....	13
2.3.1 Neoplasia mieloide com mutação germinativa do gene <i>GATA2</i>	13
2.3.2 Neoplasia mieloide associada a síndromes de insuficiência medular.....	14
2.3.2.1 Anemia de Fanconi.....	14
2.3.2.2 Neutropenia congênita grave (NCG).....	15
2.3.2.3 Síndrome de Shwachman-Diamond (SDS)	16
2.3.2.4 Anemia de Diamond-Blackfan (DBA).....	16
2.3.3 Neoplasia mieloide associada a distúrbios da biologia do telômero.....	16
2.3.4 Leucemia mielomonocítica juvenil associada à neurofibromatose, síndrome de Noonan ou doenças Noonan- símile	17

2.3.5	Neoplasia mieloide associadas à síndrome de Down	17
2.4	Outras MNGP ainda não classificadas pela OMS	18
2.4.1	Anemia aplástica familiar com mutação do gene <i>SRP72</i>	18
2.4.2	<i>SAMD9</i> e <i>SAMD9L</i>	18
2.4.3	<i>ATG2B/GSKIP</i>	19
2.4.4	Síndrome associada ao <i>MECOM</i>	19
2.4.5	Síndromes de predisposição ao câncer.....	19
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivos principais.....	24
3.2	Objetivo secundário.....	24
4	MÉTODOS	25
4.1	Desenho do Estudo	26
4.2	Casuística	26
4.2.1	Critérios de inclusão.....	26
4.2.2	Critérios de exclusão	26
4.2.3	Aspectos Éticos	27
4.2.4	Financiamento.....	27
4.2.5	Avaliação clínica.....	27
4.2.6	Testes laboratoriais iniciais	27
4.2.7	Análise molecular e citogenética	28
4.2.7.1	Testes citogenéticos.....	28
4.2.7.2	Testes moleculares.....	28
4.2.7.2.1	Tecido de origem de material genômico	28
4.2.7.2.2	Extração de DNA.....	29
4.2.7.2.3	Técnicas.....	30
4.2.7.2.4	Fluxograma de Análise.....	40
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Tamanho da população estudada e triagem dos casos	43
5.2	Casos e famílias indicados conforme fenótipo	51
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÃO	102
8	REFERÊNCIAS.....	104
9	ANEXOS	126
10	APÊNDICE.....	155

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

22q11.2DS	Síndrome de deleção 22q11.2
AA	Anemia aplástica
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica
AD	Autossômico dominante
AF	Anemia de Fanconi
AR	Autossômico recessivo
CGH array	Hibridação genômica comparativa
CNV	Varição de número de cópias
DBA	Anemia de Diamond-Blackfan
DEB	Diepoxibutano
EUA	Estados Unidos da América
FPD/MN	Plaquetopenia familiar com predisposição à neoplasia mieloide
GCSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LLA-B	Leucemia linfocítica aguda B
LLA-T	Leucemia linfocítica aguda T
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
MAF	Frequência alélica menor (Minor Allele frequency)
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MO	Medula óssea
NCG	Neutropenia congênita grave
NGS	Sequenciamento de nova geração
NM	Neoplasia mieloide

NMPC	Neoplasia mieloproliferativa crônica
NMPG	Neoplasia mieloide com predisposição germinativa
OMS	Organização Mundial de Saúde
SDS	Síndrome de Shwachman-Diamond
SMD	Síndromes mielodisplásicas
SP	Sangue periférico
TCTH	Transplante de células tronco-hematopoiéticas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMO	Transplante de medula óssea
VUS	Variante de significado indeterminado
WES	Sequenciamento de exoma completo (whole exome sequencing)

FIGURAS

- Figura 1 - Ano, gene, e autor da publicação dos principais genes associados à NMPG identificados nos últimos 10 anos. Em preto, genes incorporados à classificação da OMS, 2016 4
- Figura 2 - Fluxograma de investigação molecular dos casos suspeitos de neoplasia mieloide com predisposição germinativa..... 41
- Figura 3 - Distribuição dos pacientes do ambulatório de citopenias com suspeita de predisposição germinativa à neoplasia mieloide de acordo com fenótipo..... 44
- Figura 4 - Distribuição de acordo com suspeita clínica/diagnóstico dos pacientes com idade igual ou inferior a 40 anos do ambulatório de citopenias diagnosticados de Janeiro/2010 a Dezembro/2018. Para maior clareza, os casos de predisposição germinativa à neoplasia mieloide decorrentes de anemia de Fanconi foram listados separadamente 44
- Figura 5 - Heredograma da família A. Símbolos brancos representam parentes não afetados; símbolos cheios (cinza-escuro) representam indivíduos com neoplasias hematológicas; símbolos cinza-claros representam indivíduos com trombocitopenia, (*) representa indivíduos avaliados diretamente; E representa a avaliação das microdeleções dos éxons 1 e 2 do *RUNXI*. E +: microdeleção de éxons 1 e 2 do *RUNXI* detectados; E-: microdeleção de éxons 1 e 2 do *RUNXI* não detectados. Símbolos cruzados por uma linha vertical representam indivíduos assintomáticos que testaram positivo para microdeleção dos éxons 1 e 2 do gene *RUNXI*..... 52
- Figura 6 - A. CGH-array do probando da família A mostrando microdeleção de 163kb no cromossomo 21 em sangue periférico e medula óssea. B e C Multiplex dependent Probe Amplification (MLPA) mostrando deleção no gene *RUNXI*. B. Seta verde indica pico de amostra (azul) menor que o controle (vermelho). C. Deleção das sondas dos éxons 1 e 2 do gene *RUNXI* (seta roxa)..... 54

Figura 7 -	Heredograma da paciente B. Símbolos brancos representam familiares não afetados, símbolos em cinza representam familiares com relato de plaquetopenia, símbolo preto representa paciente com diagnóstico de neoplasia hematológica. (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores, E+ indivíduos positivos para a mutação <i>ANKRD26</i>	56
Figura 8 -	Sequenciamento por técnica de Sanger da região 5'UTR do gene <i>ANKRD26</i> , confirmando presença de mutação c.-128G>A em heterozigose (seta preta) identificada em WES do probando e presença de segunda mutação c.-140C>G nos indivíduos testados da geração 3 (seta vermelha), não encontrada previamente.....	56
Figura 9 -	Heredograma da família C. Símbolos brancos representam familiares não afetados, símbolos em cinza representam indivíduos com citopenia, símbolo preto representa paciente com diagnóstico de neoplasia hematológica. (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores, E+ indivíduos positivos para a mutação <i>TERT</i> :c.1610G>A.....	58
Figura 10 -	Sequenciamento por técnica de Sanger da região do éxon 3 do gene <i>TERT</i> mostrando presença de mutação c. 1610G>A em heterozigose (seta preta). Sequenciamento realizado em sentido 3'-5' (fita reversa)	58
Figura 11 -	Heredograma da família D. Símbolos brancos representam parentes não afetados; símbolos cinza-escuros representam indivíduos com neoplasias hematológicas; símbolos cinza-claros representam indivíduos com trombocitopenia, (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores; E representa a avaliação da mutação <i>RUNXI</i> c.320G>C p.Arg107Pro. E +: mutação c.320G>C detectada.....	59
Figura 12 -	Família D. Sequenciamento por técnica de Sanger de região do éxon 4 do gene <i>RUNXI</i> mostrando presença de mutação c. 320G>C em heterozigose (seta preta). Sequências numeradas de acordo com posição no heredograma	60
Figura 13 -	Paciente E. A. Linfedema bilateral. B: Cariótipo de medula óssea com técnica de banda G mostrando monossomia do cromossomo 7. C: Sequenciamento por Sanger do éxon 3 mostrando deleção de 14 aminoácidos e frameshift de sequenciamento	62
Figura 14 -	Paciente F. A: Mão de paciente com verrugas e sequelas de crioterapia. B: Heredograma da família F, símbolo cinza-claro representam individuo com plaquetopenia, símbolo cinza-escuro	

	representa paciente com suspeita de síndrome de deficiência de GATA2.....	64
Figura 15 -	Cariótipo de medula óssea do paciente F realizado com técnica de Banda G mostrando em A clone normal, em B clone com der(21)t(1;21)(q12;p12) e em C clone hiperdiploide com duplicação do der(21) t(1;21)(q12;p12).....	65
Figura 16 -	Heredograma família G. Símbolo cinza escuro representa indivíduo com linfedema; símbolo cruzado por linha vertical representa indivíduo positivo para a mutação do gene <i>GATA2</i> , porém, sem linfedema ou fenótipo sugestivo. (*) representa indivíduo avaliado pelos investigadores. (E) representa indivíduo testado para mutação do gene <i>GATA2</i> , (+) representa teste positivo para a mutação	67
Figura 17 -	Paciente G. A: Linfedema bilateral de membros inferiores, B: Verrugas em mãos, C: Cariótipo mostrando evolução clonal com der(1;15) e trissomia do cromossomo 8, achado confirmado por CGH array (D).....	68
Figura 18 -	Paciente G. A: Gel de agarose a 1,5% mostrando heterozigose em sequenciamento de éxon 5 do gene <i>GATA2</i> em paciente (2) e sua mãe (3). Escala e controle (1 e 4 respectivamente). B: sequenciamento por técnica de Sanger mostrando frameshift de sequenciamento do éxon 5 na amostra de paciente F. C: sequenciamento de amostra de mãe de probando apresentando mesma inserção	69
Figura 19 -	Heredograma da família H. Símbolos brancos representam familiares não afetados, símbolos cinzas representam indivíduos com suspeita de linfedema.....	70
Figura 20 -	Heredograma família I. Símbolo cinza-claro representa neoplasia hematológica. Símbolo cinza escuro representa presença de linfedema	72
Figura 21 -	Paciente I. A: Foto de membros inferiores do paciente I evidenciando linfedema de membro inferior esquerdo (paciente em uso de meia compressiva). B: displasia de megacariócitos caracterizada por elementos multinucleados	72
Figura 22 -	Paciente I. A: Cariótipo de medula óssea masculino normal. B: sequenciamento por técnica de Sanger mostrando frameshift de sequenciamento do éxon 3 na amostra de paciente I.....	73
Figura 23 -	Paciente J. A: Foto de membros inferiores do paciente evidenciando linfedema bilateral, mais proeminente à direita. B: Condiloma acuminado em nádega de paciente J.....	75

Figura 24 -	Família K. A: Foto de indivíduo II-2 evidenciando linfedema em membro superior e inferior esquerdo. B: Heredograma de duas gerações, símbolo em cinza escuro representa indivíduo acometido por síndrome mielodisplásica. Símbolo cinza-claro representa paciente com linfedema. (*) representa indivíduo diretamente avaliado pelos pesquisadores	77
Figura 25 -	Família L. Heredograma de duas gerações, símbolos em cinza escuro representam indivíduos com insuficiência medular. (*) representa indivíduo diretamente avaliado pelos pesquisadores.....	78
Figura 26 -	Heredograma família M. Símbolos em cinza-escuro representam pacientes com anemia e alta necessidade transfusional e reticulogênese acentuada em medula óssea	80
Figura 27 -	Manchas café com leite em probando da família M. A: joelho direito e B: antebraço direito.....	80
Figura 28 -	Família M. sequenciamento por técnica de Sanger, mostrando <i>frameshift</i> de sequenciamento do éxon 10 do gene <i>BLM</i> na amostra dos pacientes III-6 e III-7	80
Figura 29 -	Heredograma da família da paciente N. Símbolos escuros representam neoplasia hematológica, símbolos cinza-claros representam plaquetopenia. E representa indivíduo avaliado pelos examinadores, (+) representa deleção de 2.88 Mb em braço longo do cromossomo 22	81
Figura 30 -	SNP array Cytoscan [®] 750k do probando da família N mostrando presença de deleção de 2.88 Mb no braço longo do cromossomo 22	82
Figura 31 -	Imagens de biópsia de medula óssea e mielograma dos pacientes III-2, III-6 e III-10 da família A. A: aspirado de medula óssea do probando III-2 mostrando mieloblasto e micromegacariócito (May-Grunwald-Giemsa x 1.000). B: Aspirado de medula óssea do paciente III-6 mostra blastos mieloides, ninho de eritroblastos, figura de mitose e disgranulopoiese (May-Grunwald-Giemsa x 500) C, E e G : biópsias dos pacientes III-2, III-6, e III-10 respectivamente, mostrando megacariócitos pequenos e hipolobados (Hematoxilina-eosina x 400). D, F e H: Imuno-histoquímica para o fator VIII dos pacientes III-2, III-6, III-10 respectivamente. Também é possível perceber uma menor celularidade na biópsia do paciente III-10 (sem histórico de neoplasia hematológica) em relação aos irmãos III-2 e III-6	90

TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de neoplasias mieloides com predisposição germinativa, de acordo com a OMS.....	3
Tabela 2 -	Manifestações clínicas possíveis em portadores de síndrome de deficiência do GATA2 e alterações citogenéticas adquiridas recorrentes.....	14
Tabela 3 -	Principais síndromes de predisposição a neoplasias mieloides	20
Tabela 4 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com suspeita de NMPG.....	45
Tabela 5 -	Características clínicas dos pacientes e familiares portadores de predisposição germinativa à neoplasia mieloide.....	47
Tabela 6 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes e familiares de primeiro grau da família A	53
Tabela 7 -	Achados em exoma do gene <i>GATA2</i> em pacientes com fenótipo suspeito para síndrome de deficiência de GATA2.....	83
Tabela 8 -	Características clínicas dos pacientes suspeitos de mutação do gene <i>GATA2</i>	84

QUADROS

Quadro 1 -	Mistura (Master Mix) para realização de PCR	33
Quadro 2 -	Ciclo de PCR.....	33
Quadro 3 -	Primers para sequenciamento do gene <i>RUNX1</i> éxons 3-8 (Preudhomme et al., 2009).....	34
Quadro 4 -	Primers para amplificação do gene <i>GATA2</i> Éxons 1-7 (Hsu et al., 2011)	35
Quadro 5 -	Primers para sequenciamento do gene <i>GATA2</i> Éxons 1-7 (Hsu et al., 2011)	35
Quadro 6 -	Primers utilizados para confirmação de resultado de WES ou busca de alteração em familiares de primeiro grau. <i>GATA2</i> (NM_032638); <i>TERT</i> (NM_001193376), <i>AKRD26</i> (NM_014915), <i>RUNX1</i> (NM_001754.4); <i>BLM</i> (NM_000057); <i>SAMD9</i> (NM_001193307); <i>DKC1</i> (NM_001142463). *Primer conforme descrito por Li et al., 1998. ** Primer conforme descrito por Parry et al. 2011	36
Quadro 7 -	Lista de genes utilizados para a triagem de variantes gênicas e evolução clonal.....	39

Resumo

Silva MCA. Estudo citogenético e molecular de síndromes mielodisplásicas/leucemia mieloide aguda familiar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Em 2016, a Organização Mundial de Saúde reconheceu em sua classificação as neoplasias mieloides com predisposição germinativa (NMPG). A proporção de casos de síndromes mielodisplásicas/leucemia mieloide aguda (SMD/LMA) relacionados a uma maior predisposição familiar ainda é incerta, mas, tem impacto no seguimento e tratamento destes pacientes e seus familiares. Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar os pacientes com suspeita de NMPG do ambulatório de citopenias do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o ponto de vista clínico, hematológico e molecular e evolução clonal nos casos onde foi possível o diagnóstico de mutação germinativa. **Métodos:** Foram incluídos pacientes do ambulatório de citopenias do HC-FMUSP cadastrados entre 01/01/2010 e 31/12/2018 que apresentavam: 1) diagnóstico de LMA ou SMD com familiares de primeiro grau ou segundo grau também com diagnóstico de LMA, SMD, leucemia linfóide aguda ou trombocitopenia; 2) pacientes com história pessoal ou familiar de citopenias sem causa conhecida, histórico de sangramento, linfedema ou infecções por micobactérias atípicas. Foram excluídos pacientes com diagnóstico de síndromes de insuficiência medular clássica já diagnosticados como anemia de Fanconi. Após obtenção de histórico pessoal e familiar direcionado, sangue periférico, medula óssea e/ou swab de mucosa oral foram coletados para extração de DNA. O caráter germinativo da mutação foi inferido por sua presença em mais de um indivíduo na família. Para investigação de potenciais variantes responsáveis pelo fenótipo identificados, foram realizados sequenciamento de exoma completo (WES), sequenciamento direto por técnica de Sanger (identificação ou confirmação dos resultados de WES), além de Multiplex Ligation-dependent Probe amplification (MLPA) e CGH array para avaliar as variações de número de cópias (CNV) **Resultados:** De 322 pacientes cadastrados, 30(9,3%) apresentavam suspeita de NMPG, seis (20%) foram excluídos por diagnóstico de anemia de Fanconi. Foram analisados 17 pacientes de 14 famílias distintas e 24 familiares de primeiro e segundo graus. Entre os pacientes, houve predominância do sexo feminino (52,94%), mediana de idade ao diagnóstico de 29 anos. Gene potencialmente associado ao fenótipo foi identificado em sete famílias (50%). Mutação do *RUNX1* em dois casos e mutação da *ANKRD26* em um dos casos de plaquetopenia familiar com predisposição à neoplasia mieloide. Mutação do gene *GATA2* estava presente em três casos e um caso apresentou deleção de porção do braço longo do cromossomo 22 que, em associação com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, plaquetopenia familiar, foi compatível com síndrome deleção 22q. Evolução clonal citogenética foi identificada em quatro indivíduos (três com suspeita de síndrome de deficiência do *GATA2* e um com plaquetopenia familiar associada à mutação de *ANKRD26*). Evolução clonal molecular estava presente em cinco de seis dos pacientes testados (83%) e apenas um de 11 familiares (9%) de cinco famílias

distintas. Conclusão: Suspeita de NMPG correspondeu a uma porção significativa dos pacientes em seguimento no ambulatório de citopenias. A confirmação foi possível em apenas metade dos casos. Evolução clonal molecular não foi identificada em todos os pacientes, sugerindo que hajam outros mecanismos de progressão para neoplasia mieloide.

Descritores: Leucemia mieloide aguda; Pré-leucemia; Deficiência de GATA2; Mutação em linhagem germinativa

Abstract

Silva MCA. Molecular and cytogenetic study of familial myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Background: In 2016, the World Health Organization (WHO) recognized in its classification, myeloid neoplasms with germline predisposition (MNGP). The proportion of cases of myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia (MDS/AML) associated with family predisposition is still uncertain but has an impact on the follow-up and treatment of these patients and their families. This study aims to identify and characterize patients with suspected MNGP from the cytopenias outpatient clinic of the University of São Paulo Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) and clonal evolution in cases where the diagnosis of germline mutation was made. **Methods:** In this study, we included patients from the HC-FMUSP cytopenia outpatient clinic registered between 01/01/2010 and 31/12/2018. Criteria for inclusion were: 1) diagnosis of AML or MDS with first or second-degree relatives also diagnosed with AML, MDS, acute lymphoid leukemia or thrombocytopenia; 2) personal or family history of cytopenias with no known cause, history of bleeding, lymphedema or atypical bacterial infections. Patients previously diagnosed with classic bone marrow failure syndromes such as Fanconi Anemia were excluded. After obtaining a personal and family history, peripheral blood, bone marrow, and oral mucosa swab were collected for DNA extraction. Germline origin of mutations was inferred by its presence in more than one individual in the family. In order to investigate potential variants responsible for the identified phenotypes, whole-exome sequencing (WES), Sanger direct sequencing (identification or confirmation of WES results). MLPA and CGH array was performed to evaluate copy number variations (CNV). **Results:** Of 322 registered patients, 30 (9.3%) had suspected MNGP, 6 (20%) were excluded due to diagnosis of Fanconi anemia. Seventeen patients from 14 different families and 24 first and second-degree relatives were analyzed. Among the patients, there was a predominance of females (52.94%); the median age at diagnosis was 29 years. Seven families (50%) had a gene associated with the phenotype identified. *RUNX1* mutation in 2 cases and *ANKRD26* mutation in 1 of familial thrombocytopenia cases with predisposition to myeloid neoplasia. *GATA2* mutation was present in 3 cases, and 1 case presented with a deletion of a portion of the long arm of chromosome 22, which in association with developmental delay and familial thrombocytopenia was compatible with 22q deletion syndrome. Cytogenetic clonal evolution was identified in 4 individuals (3 with suspected *GATA2* deficiency syndrome and one with familial thrombocytopenia associated with *ANKRD26* mutation.) Molecular clonal evolution was present in 5 of 6 of the patients tested (83%) and only 1 of 11 family members (9%) from 5 different families. **Conclusion:** Suspected MNGP represents a significant portion of patients at the cytopenia outpatient clinic. Confirmation was possible in only half of the cases. Molecular clonal evolution was not present in all patients suggesting that there may be other mechanisms of progression to myeloid neoplasm.

Descriptors: Acute myeloid leukemia; Pre leukemia; GATA2 deficiency; Germ line mutation

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um conjunto de doenças clonais da célula tronco-hematopoética com múltiplos espectros de apresentação, cuja principal característica é a hematopoiese ineficiente e a displasia de uma ou mais linhagens celulares da série mieloide¹. Com real incidência ainda incerta, ela aumenta com a idade atingindo nos Estados Unidos da América, aproximadamente, 35,5 casos a cada 100 mil habitantes acima dos 80 anos, mas é rara em pacientes jovens chegando a 0,1 casos em 100 mil habitantes abaixo dos 40 anos².

Acredita-se que até 20% dos casos de SMD sejam secundários à exposição a agentes danosos ao DNA, em particular, pacientes submetidos a tratamentos citotóxicos (quimioterapia e radioterapia), nesta situação recebe o nome de neoplasia mieloide associada a terapêutica^{2,3}.

Apresentações familiares de SMD/leucemia mieloide aguda (LMA) são raras. Em geral, com idade de acometimento mais baixa, a sua real incidência ainda é desconhecida, mas, provavelmente, subestimada. Isto se justifica pela recente descrição de algumas destas síndromes e pela falha na coleta de história familiar detalhada em pacientes oncológicos. Além disto, pequenas séries publicadas onde os pacientes apresentavam familiar de primeiro grau com história de SMD/LMA mostram alta incidência de mutações relacionadas à SMD familiar⁴. Estudo sueco realizado com base em dados de registros populacionais sugere que familiares de pacientes jovens diagnosticados com SMD/LMA podem apresentar risco aumentado de desenvolver a doença⁵.

O acometimento familiar de SMD/LMA era antes separado didaticamente entre as formas sindrômicas e aquelas nas quais a predisposição para SMD/LMA é o único traço herdado (puras). No primeiro grupo, encontravam-se as síndromes associadas à insuficiência medular já conhecidas (exemplos, são anemia de Blackfan-Diamond, disqueratose congênita), as síndromes associadas às falhas de reparo de DNA (anemia de Fanconi e síndrome de Bloom) e as relacionadas a anomalias dos genes de supressão tumoral (exemplo: Síndrome de Li Fraumeni). O segundo grupo tinha apenas cinco representantes: SMD familiar associada à

deficiência do telômero (disqueratose congênita oculta), Monossomia do 7 familiar, Leucemia mieloide aguda familiar com *CEBPA* mutado, SMD/LMA familiar com mutação do *GATA2* e o distúrbio plaquetário familiar associado à propensão a neoplasia mieloide (mutação de *RUNXI* familiar) ^{4,6}.

Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em sua revisão da classificação de neoplasias hematológicas, reconheceu que havia pacientes com risco familiar e/ou germinativo para SMD/LMA e incluiu a categoria de neoplasia mieloide com predisposição germinativa distinguindo três subgrupos: 1) Neoplasia mieloide com predisposição germinativa sem disfunção ou acometimento de outros órgãos; 2) Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e outra disfunção orgânica 3) Neoplasia mieloide com predisposição germinativa associada à disfunção plaquetária⁷ conforme os dados da Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de neoplasias mieloides com predisposição germinativa de acordo com a OMS

Neoplasia mieloide com predisposição germinativa

Predisposição germinativa à neoplasia mieloide sem distúrbio preexistente ou disfunção orgânica

LMA com mutação germinativa de *CEBPA*

Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *DDX41* *

Predisposição germinativa à neoplasia mieloide e distúrbio plaquetário preexistente

Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *RUNXI*

Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *ANKRD26* *

Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *ETV6* *

Predisposição germinativa à neoplasia mieloide e outra disfunção orgânica

Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *GATA2*

Neoplasia mieloide associada às síndromes de insuficiência medular

Neoplasia mieloide associada aos distúrbios da biologia dos telômeros

Leucemia mielomonocítica juvenil associada à neurofibromatose, síndrome de Noonan ou síndromes Noonan-símile

Neoplasia mieloide associada à síndrome de Down*

Fonte: Adaptado de Arber et al., 2016

*Neoplasia linfoides também são descritas.

Algumas famílias que apresentam agregação familiar de SMD/LMA não se enquadram nos grupos acima, e o maior acesso e o uso de técnicas de sequenciamento genético deverão elevar o número de entidades descritas nos

próximos anos (ver Figura 1). O surgimento de consensos para investigação e manejo destas síndromes, assim como a necessidade de identificar doadores de medula óssea aparentados que não apresentem a mutação responsável pela doença, torna necessária a disponibilidade de meios de estudo e identificação destas alterações genéticas.

OMS 2016	2018	<i>MECON</i>	Bluteau et al, Ripepergger et al; Germeshausen, et al
	2017	<i>SAMD9 E SAMD9L</i>	Narumi et al e Tesi et al
	2015	<i>ETV6</i>	Zhang et al
	2015	<i>ATG2/GSKIP</i>	Saiba et al
	2015	<i>DDX41</i>	Polprasert, Lewinsohn
	2012	<i>SRP72</i>	Kirwan et al
	2011	<i>ANKRD26</i>	Noris et all, Pippucci et al
	2011	<i>GATA2</i>	Hahn et al
	2005	<i>TERT</i>	Yamaguchi et al
	2004	<i>CEBPA</i>	Smith et al
	2001	<i>TERC</i>	Vulliamy T et al
	1999	<i>RUNX1</i>	Song et al

Figura 1 - Ano, gene, e autor da publicação dos principais genes associados a NMPG identificados nos últimos 10 anos. Em preto, genes incorporados à classificação da OMS, 2016

Embora sejam raras, as apresentações familiares de SMD/LMA, agora conhecidas como neoplasia mieloide com predisposição germinativa (NMPG), oferecem oportunidade interessante para aprimorar o estudo das neoplasias mieloides, seus mecanismos fisiopatológicos e a busca de genes responsáveis pelas alterações hematopoiéticas. Acredita-se que o desenvolvimento de SMD/LMA dependa de um

processo no qual múltiplos passos estão envolvidos e o conhecimento sobre os mesmos propiciará novas oportunidades de tratamento em doenças com opções limitadas e ainda pouco eficazes. Assim, a predisposição germinativa a neoplasias mieloides pode ajudar a entender também os mecanismos fisiopatológicos das síndromes mielodisplásicas esporádicas. Partindo de mutação inicial (constitucional e herdada), como primeiro passo na oncogênese, seguindo-se de mutações adquiridas (induzidas ou não pela mutação inicial) que podem conferir vantagem proliferativa e desenvolvimento do clone leucêmico.

Não existem estatísticas publicadas sobre a incidência de SMD no Brasil. Em julho de 2013, o grupo de SMD pediátrico não discriminou nenhum caso familiar⁸. No ambulatório de citopenias do Hospital das Clínicas HC-FMUSP, 806 pacientes foram cadastrados a partir de 1987. Em 2010, pacientes com suspeita de predisposição germinativa à neoplasia mieloide passaram a ser cadastrados.

O presente estudo visa a analisar do ponto de vista hematológico, citogenético e molecular os pacientes do ambulatório de citopenias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com suspeita de predisposição germinativa à neoplasia mieloide que não apresentavam síndrome de insuficiência medular previamente diagnosticada.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estudos populacionais, valendo-se de grandes bancos de dados, foram capazes de definir que existe um risco aumentado em familiares de primeiro grau de pacientes com diagnóstico de neoplasia hematológica de desenvolver neoplasias mieloides⁹. Com mediana de incidência na sétima década de vida, a presença de SMD em pacientes jovens é rara, estudo populacional sueco sugere que familiares de pacientes jovens, marcadamente abaixo dos 21 anos, diagnosticados com SMD/LMA e outras neoplasia mieloides (NM) podem apresentar risco até três vezes maior de desenvolver a doença⁵. Em 2019, foi possível demonstrar nessa população que os familiares de pacientes com SMD têm risco aumentado em três vezes quando o diagnóstico é acima dos 68 anos, e este risco aumenta em quase 12 vezes quando o diagnóstico é abaixo dos 68 anos. No grande grupo das neoplasias mieloides, foi percebido também o aumento do risco, de acordo com a quantidade de familiares afetados. Famílias com dois ou mais membros afetados por NM têm risco duas vezes maior dos que apresentavam apenas um familiar com risco acumulado de 4,4%⁹.

Basear-se somente na história clínica e familiar não parece ser suficiente para identificar os casos de predisposição germinativa a neoplasia mieloide. Uma vez presente, como visto acima, podem sugerir o diagnóstico de predisposição germinativa, porém sua ausência não exclui o diagnóstico¹⁰. Em estudo analisando crianças e adultos jovens portadores de síndrome mielodisplásica e anemia aplástica apenas cerca 50% dos casos com mutação germinativa identificada apresentavam histórico familiar de doença hematológica¹¹. Algumas explicações podem existir para a ausência de histórico familiar: mutações germinativas *de novo*, no qual a mutação ocorre na formação dos gametas, não sendo encontrada em células somáticas dos pais, famílias cada vez menores e síndromes com penetrâncias variáveis, além da coleta deficiente de histórico familiar.

A OMS publicou os critérios que ajudam a suspeitar de predisposição germinativa em pacientes portadores de neoplasia mieloide. Foram eles: história pessoal de múltiplos tumores, trombocitopenia e macrocitose precedendo o diagnóstico por muitos anos; familiar de primeiro ou segundo grau com neoplasia

hematológica; familiar de primeiro ou segundo grau com diagnóstico de tumor sólido compatível com predisposição germinativa (câncer de mama, em menor de 50 anos); presença de dismorfismos e disfunções orgânicas (alteração de unhas, pigmentação de pele, leucoplasia oral, fibrose pulmonar idiopática, doença hepática não explicada, linfedema, infecções atípicas, imunodeficiência, anormalidades congênitas de membros ou baixa estatura). Além do paciente, qualquer doador de medula óssea que preencha algum dos critérios mencionados também deve ser testado ¹².

Mesmo em centros onde técnicas para sequenciamento em larga escala como NGS (sequenciamento de nova geração) são amplamente disponíveis, a taxa de identificação de alterações genéticas patogênicas, utilizando painéis contendo genes associados a NMPG e síndromes de insuficiência medular varia entre 15% e 48%¹³⁻¹⁵. Existem diversos motivos para a falha ao identificar fatores genéticos predisponentes que vão desde limitações técnicas dos testes, amostra biológica escolhida ou mesmo desconhecimento do mecanismo fisiopatológico e fator causal¹⁶. Pacientes com histórico familiar e suspeita forte, mesmo após avaliação molecular negativa devem ser considerados portadores de predisposição germinativa e, assim, aconselhados.

Não está clara ainda a proporção de pacientes com diagnóstico de neoplasia mieloide que são portadores de predisposição germinativa, a inclusão recente desta categoria na OMS é passo importante, para que os dados futuros sejam mais consistentes. O crescente uso de painéis para identificação de mutações somáticas termina por ajudar a identificar mutações germinativas, uma vez que alguns genes associados à predisposição genética podem encontrar-se somaticamente mutados em NM e fazer parte da maioria dos painéis^{17,18}, porém será essencial distinguir entre a origem somática e germinativa da mutação, uma vez que isso tem impacto significativo no seguimento, tratamento e aconselhamento adequado dos pacientes e avaliação de familiares em risco.

O modo mais adequado de conseguir distinguir entre uma mutação somática e germinativa é a avaliação pareada de tecido tumoral (no caso sangue ou medula óssea) e tecido representativo de origem germinativa ¹⁰. Como é sabido que sangue periférico pode contaminar diversos tecidos, no momento, a origem preferencial do

DNA é a cultura de fibroblastos, uma vez que isto pode reduzir a contaminação por sangue¹⁹.

Talvez o impacto mais visível da identificação de predisposição germinativa seja no cenário do transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH). Falhas de enxertia, recorrência de neoplasia hematológica pós TCTH e toxicidade exacerbada associada ao condicionamento ocorrem em boa parte das insuficiências medulares e até durante o próprio tratamento²⁰ e são complicações já identificadas em portadores de NMPG²¹. Mas os benefícios vão além do cenário do TCTH. A adequada discriminação de mutações germinativas pode ajudar a interpretar os achados de medula óssea nos portadores de mutações germinativas, como acontece nos portadores de mutações do gene *RUNXI* que apresentam displasia megacariocítica sem que isto signifique evolução para SMD²², podem permitir o seguimento e o protocolo de vigilância de familiares portadores de mutações e assintomáticos, além de aconselhamento genético adequado.

A descoberta de NMPG tem implicações não só ao paciente como também aos familiares em risco. As penetrâncias variadas, dados epidemiológicos ainda escassos em uma área de estudo em franca expansão tornam os desafios ainda maiores. O ideal é que estes pacientes sejam avaliados por especialistas no tema, cada vez mais complexo e com número crescente de entidades definidas. Além disto, mesmo com o refinamento diagnóstico mais de 50% dos casos não podem ser explicados do ponto de vista genético. Na ausência de ambulatórios especializados e com o uso crescente de amplos painéis de mutações somáticas e consequente risco de descoberta incidental de mutações germinativas, é importante que o hematologista seja, minimamente, treinado para discutir as questões éticas e iniciar a discussão sobre o que significam os resultados encontrados. Existem algumas recomendações clínicas baseadas na experiência de especialistas e também emitidas pelas sociedades²³⁻²⁵, mas dados prospectivos ainda são muito escassos ou inexistentes.

O tratamento das neoplasias mieloides ainda apresenta opções limitadas. O advento das técnicas de sequenciamento acaba por sinalizar sobre potenciais vias de leucemogênese e abrir novos caminho na descoberta de novas drogas capazes de melhorar a curta sobrevida dos portadores de SMD/LMA. As NMPG são uma oportunidade de aprofundar o entendimento da leucemogênese. Depois de muitos

anos sem novas drogas, duas novas terapias direcionadas surgiram e novas drogas encontram-se em estudo inclusive com efeito em portadores de mutações germinativas do *RUNXI* ²⁶.

Abaixo, uma revisão sobre as NMPG classificadas pela OMS e também algumas NMPG que não foram incluídas, mas parecem ter relevância, conforme os dados da Tabela 2.

2.1 Classificação da OMS para NMPG

2.1.1 Neoplasia mieloide com predisposição germinativa sem disfunção orgânica preexistente

2.1.1.1 LMA com mutação germinativa de *CEBPA*

Mutações somáticas do fator de transcrição *CEBPA* ocorrem entre 5% e 10% das leucemias mieloides agudas e foram descritas em associação à leucemia mieloide aguda familiar em 2004 ²⁷. O *CEBPA*, localizado no cromossomo 19q13.2, no sistema hematopoiético é expresso, primariamente, na linhagem mieloide e codifica o fator de transcrição que tem papel essencial na manutenção da célula tronco-hematopoiética e na diferenciação granulocítica e monocítica²⁸. Com padrão de herança autossômico dominante apresenta evolução direta para LMA sem uma fase de citopenias ou mielodisplasia prévias²⁹. Em geral, pacientes com mutação germinativa do *CEBPA* apresentam cariótipo normal e presença de mutação somática em segundo alelo do *CEBPA*. A presença de dupla mutação do *CEBPA* está associada a melhor prognóstico, com altas taxas de remissão, inclusive, após recaída^{29,30}.

2.1.1.2 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *DDX41*

O gene *DDX41*, localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35), é um gene de supressão tumoral que está envolvido em, pelo menos, três processos intracelulares: *splicing* de RNA mensageiro, imunidade inata e biogênese de ribossomos ³¹. Com mais de 70 famílias já descritas, vem se tornando uma das propensões germinativas mais descritas ³¹. Dois grandes estudos em populações não selecionadas de LMA e SMD identificaram presença da mutação, provavelmente,

germinativa em quase 2,5% dos casos, fazendo com que esta seja provavelmente a NMPG mais comum^{32,33}. Ela difere das demais propensões familiares pelo tempo de latência maior e mediana de idade ao diagnóstico em torno de 70 anos^{32,33}. O tipo de mutação pode sugerir a origem germinativa, uma vez que até o momento não foram encontradas mutações do tipo *frameshift* somaticamente^{32,34}. A necessidade de mutação do alelo selvagem ou novas mutações somáticas indica que a haploinsuficiência de *DDX41* é capaz de manter a hematopoese normal³⁵. Do ponto de vista clínico, além da idade mais elevada do que habitualmente encontrada nas predisposições germinativas, há preponderância de acometimento do sexo masculino, aumento da predisposição a SMD de alto risco e LMA com cariótipo normal, medula óssea com marcada diseritropoiética^{31,34,35} e, ao contrário do que se acreditava, aproximadamente metade dos pacientes apresenta período de citopenias antes do diagnóstico de neoplasia mieloide^{32,33}.

2.2 Plaquetopenia e disfunção plaquetária associada à predisposição para NM

As três entidades deste grupo (associadas a mutações germinativas dos genes *RUNX1*, *ETV6* e *ANKRD26*) têm em comum baixa contagem plaquetária, plaquetas de tamanho normal e tendência hemorrágica leve. Isto torna difícil a distinção destas entidades apenas pela apresentação clínica¹⁹.

2.2.1 Plaquetopenia familiar com predisposição à neoplasia mieloide (FPD/MN) associada à mutação do gene *RUNX1*

A plaquetopenia familiar associada à predisposição para neoplasia mieloide com mutação do gene *RUNX1* é um distúrbio autossômico dominante, caracterizado pela plaquetopenia, disfunção plaquetária e predisposição à neoplasia mieloide. Durante o período embrionário, o gene *RUNX1* (localizado no braço longo do cromossomo 21) produz fator de transcrição homônimo, que é essencial para a formação de células tronco-hematopoiéticas e na fase adulta participa da maturação de megacariócitos e linfócitos B e T³⁶. Dois mecanismos básicos estão implicados na FPD/MN: haploinsuficiência e efeito dominante negativo. Aparentemente, todas as mutações apresentam o mesmo efeito na emergência da célula tronco-hematopoiética

e diferenciação megacariocítica³⁷, mas os precursores granulocíticos apresentam maior taxa proliferativa e instabilidade genômica que induz a um estado pré-leucêmico, quando os níveis de *RUNX1* estão muito baixos, como os que são observados em mutações com efeito dominante negativo³⁸.

Pelo menos, 70 famílias com mutação germinativa do gene *RUNX1* e NM foram descritas³⁹. Neoplasias mieloides são mais comuns, mas casos de LLA⁴⁰⁻⁴³ e até casos de tricoleucemia já foram reportados⁴⁰. O risco estimado de neoplasia hematológica varia entre 35% e 40% nas famílias. LMA e SMD são as mais prevalentes, seguida de LLA-T. A idade de apresentação varia entre 6 e 72 anos^{37,40,42}.

Quando anormalidades físicas ou outras disfunções estão presentes, é provável que haja não só a deleção do gene *RUNX1* (que tende a ser uma deleção *de novo*) como também a deleção de genes adjacentes^{44,45}. Deve-se salientar que a trombocitopenia não é evento onipresente nesta entidade, casos sem histórico prévio de sangramento ou citopenias já foram descritos^{38,46,47}.

O diagnóstico propriamente dito de SMD pode ser um desafio, visto que estudos recentes mostram que displasia megacariocítica pode estar presente na ausência de síndrome mielodisplásica^{22,45}, reforçando a necessidade de estudo da medula basal.

2.2.2 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *ETV6* ou trombocitopenia 5

A associação entre mutação do *ETV6*, plaquetopenia e predisposição à neoplasia hematológica com casos de neoplasia mieloide e leucemia linfóide aguda B foram descritas pela primeira vez em 2015 por Zhang e colegas⁴⁸, com aproximadamente, 18 famílias reportadas até o momento⁴⁹. Bem conhecido como gene afetado em translocações balanceadas em leucemias linfóide e mieloide, o *ETV6* está localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p13.2) e faz parte da família de genes ETS (“E26 transformation-specific”) de fatores de transcrição com função repressora de transcrição⁵⁰, tem papel relevante na manutenção de célula tronco-hematopoiética⁵¹, na regulação de megacariócitos e plaquetas e como supressor tumoral^{49,50}. Ocorre penetrância quase que completa de plaquetopenia nos

portadores de mutações do *ETV6*, a tendência à macrocitose⁵² não é um achado consistente e há aumento de células CD34+ circulantes⁵³. Embora as neoplasias mieloides sejam descritas, há neste grupo maior incidência de leucemia linfóide aguda (LLA), em particular, LLA-B⁴⁹.

2.2.3 Neoplasia mieloide com mutação germinativa de *ANKRD26* ou trombocitopenia 2

A trombocitopenia 2, também caracterizada por plaquetopenia, com plaquetas de tamanho normal e aumento do risco de neoplasia hematológica, teve sua associação com mutação do gene *ANKRD26* descrita em 2011⁵⁴. Localizado no braço curto do cromossomo 10 (10p12.1), a mutação na região 5'UTR interfere na interação com outros fatores de transcrição, como o RUNX1.

Clinicamente, há aumento de risco para neoplasia mieloide, em particular, de LMA de até 25 vezes em relação à população sem mutação⁵⁴. Alguns pacientes têm resposta parcial ou aumento transitório de plaquetas durante quadros infecciosos⁵⁵. Na medula óssea, chama atenção a dismegacariopoiese com elementos hipolobados e imaturos, além de micromegacariócitos^{54,56}.

2.3 Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e disfunção de outros órgãos

2.3.1 Neoplasia mieloide com mutação germinativa do gene *GATA2*

A síndrome de deficiência de *GATA2* é doença autossômica dominante associada à mutação do gene *GATA2* (3q21.3) que pode levar à imunodeficiência, insuficiência medular, doença pulmonar, vascular ou linfática⁵⁷ em combinações e espectros clínicos variados. Sua associação com imunodeficiência e síndrome MonoMac (monocitopenia e infecção micobacteriana), inicialmente, foi descrita em 2011⁵⁸. O *GATA2* é um fator de transcrição que está associado à manutenção e proliferação de células tronco-hematopoiéticas, cuja expressão declina com a maturação da célula e faz parte de um intrincado mecanismo de regulação com outros fatores de transcrição como o *RUNX1*^{59,60}. É uma das síndromes de predisposição à neoplasia mieloide mais comum e apresenta com espectro clínico variável, porém,

talvez a mais facilmente identificável na prática clínica. Em coorte europeia que analisou 426 crianças e adolescentes com SMD primária, a mutação germinativa do *GATA2* foi responsável por 7% de todos os casos e 14% dos casos avançados. Quando analisados os pacientes com monossomia 7, estava presente em 37% dos casos e em até 72% dos adolescentes com monossomia 7⁶¹.

A identificação destes casos é importante para evitar terapêuticas desnecessárias como imunossupressão nos pacientes portadores de medula óssea hipocelular, ou quimioterapia de indução de leucemia aguda. Alguns especialistas sugerem transplante de medula óssea como única forma curativa e, preferencialmente, antes de evolução clonal com monossomia 7 e progressão para SMD com excesso de blastos⁶². Além do risco de SMD/LMA, apresenta maior risco de tumores sólidos associados à infecção pelo HPV⁵⁷. Os dados da Tabela 2 listam as possíveis manifestações clínicas de mutação do *GATA2*.

Tabela 2 - Manifestações clínicas possíveis em portadores de síndrome de deficiência do GATA2 e alterações citogenéticas adquiridas recorrentes

Hematológicas	Infeciosas	Outros Sistemas	Citogenéticas
SMD/LMA	Verrugas por HPV	Linfedema	Monossomia 7
Monocitopenia	Infecções por micobacterias	Surdez	trissomia 8
Monocitose	Infecções fúngicas	Proteinose alveolar pulmonar	trissomia 21
Diminuição do número de células B e seus precursores	Infecção recorrente de via aérea superior	Manifestações auto-ímmunes (paniculite, hipotireoidismo, lúpus simile)	der(1;7), +1q, -7q
Diminuição do número de células NK		Tumores sólidos associados à infecção por HPV Câncer de mama Trombose venosa profunda	

2.3.2 Neoplasia mieloide associada a síndromes de insuficiência medular

2.3.2.1 Anemia de Fanconi

A anemia de Fanconi (AF) é a insuficiência medular mais comum e, provavelmente, a mais estudada. Tem cerca de 21 subtipos genéticos identificados, a

maioria de padrão autossômico recessivo com exceção de duas, FANCB e FANCR, que apresentam herança ligada ao X e autossômico dominante, respectivamente ⁶³. De fenótipo variado, seu diagnóstico exige suspeição clínica, mas cerca de 60% dos casos apresentam anormalidades físicas. As mais comuns são baixa estatura e alterações de pigmentação da pele conhecidas como manchas café com leite, que ocorrem em, aproximadamente, 40% dos casos ⁶⁴. Portadores de anemia de Fanconi apresentam risco elevado de insuficiência medular (em geral o primeiro evento), leucemia e tumores sólidos, com risco acumulado de 50% para insuficiência medular ao longo da vida ⁶⁴. O fenótipo hematológico pode variar no curso da vida em razão do fenômeno de mosaicismo somático ^{64,65}. A via AF, também conhecida como a via FA-BRCA, é uma via bioquímica que tem a função de coordenar a resposta ao dano do DNA⁶³. O diagnóstico, habitualmente, é confirmado pelo teste de fragilidade cromossômica em cultura de linfócitos com agentes clastogênicos, em particular, o diepoxibutano (DEB).

2.3.2.2 Neutropenia congênita grave (NCG)

Neutropenia congênita grave é uma doença rara com prevalência estimada de 2-8 casos por milhão de indivíduos⁶⁶, que se caracteriza por um quadro de neutropenia grave, parada de maturação da série granulocítica e risco acentuado de SMD/LMA⁽⁶⁷⁾ sem dismorfismos⁶⁴. Seu principal diagnóstico diferencial é a neutropenia congênita cíclica que cursa com recorrência de neutropenia a cada 21 dias e compartilha mutações no mesmo gene. Com o uso do fator de crescimento estimulador da colônia de granulócitos (GCSF) e antibioticoterapia, houve redução da mortalidade por infecções graves⁶⁶. Portadores de NCG apresentam risco acumulado de incidência de LMA/SMD de, aproximadamente, 20% que tende a ser maior quanto maior for o uso de GCSF ⁶⁸. É uma doença heterogênea do ponto de vista molecular e seu padrão de herança varia conforme o gene acometido, as mutações do gene *ELANE* correspondem a 50% dos casos⁶⁷ e têm padrão autossômico dominante. Os genes *HAX1*, *WAS*, *G6PC3*, *GFII* também estão associados à neutropenia congênita grave^{64, 67}. Estudo que investigou 31 casos de NCG mostrou que os pacientes que evoluem para leucemia mieloide aguda

apresentam taxas elevadas de mutações somáticas dos genes *CSF3R* (80,5%) e *RUNX1* (64,5%)⁶⁹.

2.3.2.3 Síndrome de Shwachman-Diamond (SDS)

A síndrome de Shwachman-Diamond é uma doença autossômica recessiva caracterizada, sobretudo, por insuficiência medular e insuficiência pancreática, mas alterações ósseas, endocrinológicas e neurológicas fazem parte do amplo espectro clínico. Rara, apresenta incidência 1 a cada 76 mil habitantes⁷⁰. Está associada à mutação do gene *SBDS*, localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q11), em mais de 90% dos casos⁶⁴, porém novos genes, que também estão envolvidos com a biologia dos ribossomos, foram descritos recentemente em associação a fenótipo semelhante. Dentre eles, a mutação autossômica recessiva do gene *DNAJC21*, localizado no cromossomo 5⁷¹. Há uma preponderância de casos do sexo masculino e risco aumentado para SMD e LMA, com risco estimado em 20%. Alterações citogenéticas adicionais mais frequentes são o isocromossomo 7q e del 20q⁷⁰.

2.3.2.4 Anemia de Diamond-Blackfan (DBA)

A anemia de Diamond-Blackfan caracteriza-se por um padrão de herança autossômico dominante e aplasia pura de série vermelha com graus de dismorfismo variáveis. Está associada a mutações dos genes que codificam subunidades ribossômicas (*RPS19*, *RPS17*, *RPS24*, *RPL35A*, *RPL5* e *RPL11*) em, aproximadamente, 50% dos casos^{64, 72}. Mas casos com fenótipo semelhante com mutações do gene *GATA1* também foram relatados⁷². Com diagnóstico habitualmente realizado no primeiro ano de vida, em alguns pacientes com formas mais brandas da doença, esta pode se apresentar na fase adulta⁷³. Levantamento realizado pelo registro norte americano de DBA mostrou aumento expressivo do risco de câncer, em particular, síndrome mielodisplásica com razão entre o observado e esperado de 352 para SMD, 49 para carcinoma de cólon, 42 para sarcoma osteogênico e 29 para LMA⁷⁴.

2.3.3 Neoplasia mieloide associada a distúrbios da biologia do telômero

A disqueratose congênita é uma doença associada à biologia dos telômeros, parte do grupo das insuficiências medulares clássicas, há um padrão de herança ligado ao X quando associado à mutação do gene *DKCI*. Possui fenótipo proeminente, início de sintomas na infância, com meninos apresentando anormalidades cutâneas (leucoplasia, distrofia ungueal e manchas hipopigmentadas), insuficiência medular e predisposição ao câncer^{75,76}. As telomeropatias associadas a mutações do *TERC/TERT*, por sua vez, são autossômicas dominantes, têm associação com fibrose pulmonar e cirrose⁷⁵, porém, com fenótipo mais brando e identificação mais tardia^{77,78}. Existe um fenômeno de antecipação com a doença tornando-se mais precoce e grave no decorrer das gerações⁷⁶.

2.3.4 Leucemia mielomonocítica juvenil associada à neurofibromatose, síndrome de Noonan ou doenças Noonan-simile

A leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) é uma neoplasia mieloide característica da primeira infância com 90% dos casos, apresentando mutações nos genes *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NFI* ou *CBL*. Dois subtipos são considerados de origem germinativa: o associado à neurofibromatose tipo 1 e os associados à síndrome *CBL*⁷⁹. Além destes, os pacientes com a síndrome de Noonan (dismorfismo facial, cardiopatia congênita e déficit cognitivo variável) que apresentam mutação *PTPN11*, têm risco de desenvolver a doença. As crianças com neurofibromatose tipo 1 têm um risco estimado 200-350 vezes maior que aquelas não portadoras⁸⁰.

O manejo varia muito conforme o tipo de mutação encontrado. LMMJ com mutações somáticas do *PTPN11* apresenta evolução rápida e alta letalidade⁷⁹, mas, nos casos de síndrome de Noonan com mutações germinativas do mesmo gene parece haver uma tendência a casos mais brandos e assim como naqueles com mutação do gene *CBL* a observação clínica está indicada^{79,81}. Em relação à evolução clonal citogenética, a monossomia do 7 ocorre em 25% dos casos⁸⁰.

2.3.5 Neoplasia mieloide associada à síndrome de Down

Os portadores de síndrome de Down apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de leucemia. Nas crianças menores de 5 anos, pode chegar a ser

150 vezes maior do que nas crianças não portadoras. A Organização Mundial de Saúde reconhece duas entidades associadas à síndrome de Down: a mieloproliferação anormal transitória associada à síndrome de Down e a LMA associada à síndrome de Down que correspondem a 20% de todos os casos de SMD/LMA em pediatria⁸⁰. Mutações somáticas do fator de transcrição GATA1 estão associadas a ambas as entidades e presentes em todos os casos. No entanto, a presença apenas de mutação de *GATA1* de modo isolado não justifica os casos de leucemia que, em geral, são precedidos de SMD⁸².

2.4 Outras NMPG ainda não classificadas pela OMS

2.4.1 Anemia aplástica familiar com mutação do gene *SRP72*

Com apenas duas famílias descritas até o momento, a mutação do gene *SRP72* (localizado em 4q12) está associada à insuficiência medular (anemia aplástica/SMD) com segregação autossômica dominante. Em uma das famílias, foi identificada ainda surdez congênita. Tem importância, já que abre novo mecanismo fisiopatológico para a insuficiência medular: a translocação de proteínas e seu processamento⁸³.

2.4.2 *SAMD9* e *SAMD9L*

SAMD9 e *SAMD9L* são genes adjacentes localizados no braço longo do cromossomo 7 que apresentam função repressora de proliferação celular (supressora tumoral). Recentemente, foram descritas duas síndromes: 1) Síndrome de ataxia e pancitopenia com mutação com ganho de função do *SAMD9L*, com padrão autossômico dominante, leva a citopenias, imunodeficiência, SMD e sintomas neurológicos com disfunção cerebelar⁸⁴, 2) Síndrome MIRAGE (mielodisplasia, infecção, restrição de crescimento, hipoplasia adrenal, alterações genitais e enteropatia) associada a mutação com ganho de função do *SAMD9*⁸⁵. Ambas apresentam evolução para SMD com monossomia do 7, provavelmente, decorrente de adaptação à condição de restrição de crescimento levando a uma adaptação por aneuploidia^{84, 86}. Não é incomum que os pacientes apresentem mutações somáticas

capazes de reverter o fenótipo por meio de mosaïcismo, sendo necessário maior cuidado na avaliação de doadores de medula óssea ⁸⁴.

2.4.3 ATG2B/GSKIP

A duplicação da região 14q32 e a duplicação dos genes *ATG2B/GSKIP* estão correlacionadas a propensão à neoplasia mieloproliferativa crônica, em particular, trombocitemia essencial com risco de progressão para mielofibrose e leucemia aguda. Nas quatro famílias descritas por Saliba et al. ⁸⁷, o paciente mais jovem com diagnóstico de neoplasia mieloide tinha 29 anos. Recentemente, porém, Babushok et al. relatam família com duplicação da mesma região cromossômica, porém, sem apresentar a duplicação *ATG2B/GSKIP*. Em comum com o descrito por Saliba et al., apresentava apenas duplicação do gene *TCL* ⁸⁸. A identificação de mais famílias poderá ajudar a definir qual será a importância destas mutações.

2.4.4 Síndrome associada ao MECOM

Situado no braço longo do cromossomo 3, o gene *MECOM* (complexo MDS1 e EV1) foi implicado por grupos diferentes como gene responsável por uma insuficiência medular caracterizada, sobretudo, mas não obrigatoriamente, por trombocitopenia amegacariocítica e sinostose radioulnar. De espectro clínico variável, foi descrita em, pelo menos, 16 pacientes até o momento ^{15, 89, 90}. Está sendo proposta que seja incluída como síndrome de predisposição à neoplasia hematológica, já que foi observada nos casos de SMD e LMA em associação com a síndrome ⁹⁰.

2.4.5 Síndromes de predisposição ao câncer

Algumas síndromes de predisposição ao câncer aumentam o risco de tumores sólidos, assim como neoplasias hematológicas. Deste grupo, fazem parte a síndrome de Li Fraumeni (associada a mutação do *TP53*); a síndrome de Lynch associada a mutações dos genes de reparo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2* que aumentam não só o risco de câncer de cólon como também a neoplasias hematológicas, particularmente, de origem linfóide ⁹¹ e a síndrome de atelectasia/telangiectasia, associada à mutação do gene *ATM* ⁹².

Tabela 3 - Principais síndromes de predisposição a neoplasias mieloides

Doença	Gene	Localização	Padrão de Herança	Fisiopatologia	Neoplasia/manifestação hematológica	fenótipo	Alteração Citogenética/molecular adicional
Piquetopenia familiar com propensão a neoplasia mieloide	<i>RUNX1</i>	21q	AD	Fator de transcrição	Plaquetopenia/ Disfunção plaquetária SMD LMA LLA-T Linfoproliferações	Outras anormalidades em geral associadas à deleção de outros genes adjacentes	-
Trombocitopenia 2	<i>ANKRD26</i>	10p12.1	AD	Fator de transcrição	Plaquetopenia Disfunção plaquetária LMA SMD	Não apresenta	-
Trombocitopenia 5	<i>ETV6</i>	12p13.2	AD	Fator de transcrição	Plaquetopenia LLA-B SMD/LMA	Não apresenta	-
Mutação do <i>CEBPA</i>	<i>CEBPA</i>	19q13.1	AD	Regulação de transcrição	LMA	Não apresenta	Normal Mutação adquirida em alelo selvagem
SMD/LMA associada à mutação <i>DDX41</i>	<i>DDX41</i>	5q35	AD	DEADH-BOX helicase "Slicing" RNAm	SMD Diseritroipoiese Eritroleucemia Plaquetopenia	Não apresenta	-
Mutação germinativa <i>GATA2</i>	<i>GATA2</i>	3q21.3	AD	Fator de transcrição	SMD SMD hipocelular LMA	Linfedema Surdez neurosensorial Micobacteriose atípica Proteinose alveolar Verrugas	Monossomia 7

continua

Tabela 3 - Principais síndromes de predisposição a neoplasias mieloides (continuação)

Doença	Gene	Localização	Padrão de Herança	Fisiopatologia	Neoplasia/manifestação hematológica	fenótipo	Alteração Citogenética/molecular adicional
Anemia de Fanconi	FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCDE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ, FANCM, FANCN, FANCO, FANCP., FANCQ, FANCR, FANCS, FANCT, FANCU, FANCV	16q24.3, Xp22.2, 9q22.32, 13q13.1, 3p25.3, 6p21.31, 11p14.3, 9p13.3, 15q26.1, 17q23.2, 14q21.2, 16p12.2, 17q22, 16p13.3, 16p13.12, 15q15.1, 17q21.31, 1q32.1, 7q36.1, 1p36.22	AR Exceto FANCB(LX) e FANCR (AD)	Reparo de DNA	Insuficiência medular SMD LMA	Baixa estatura, alteração de pigmentação de pele, alterações renais, microcefalia, alterações ósseas	trissomia 1q, trissomia 3q, trissomia 8, monossomia 7
Neutropenia congênita Grave	ELANE, GFI1, HAX1, G6PC3, WAS	19p13.3, 1p22.1, 1q21.3, 17q21.31, Xp11.23	AD (ELANE, GFI1), AR (HAX1, G6PC3), LX (WAS)	Aumento de apoptose (ELANE), modificador de histonas e repressor de transcrição (GFI1),	SMD LMA	Neutropenia grave desde infância	-
Schwachman-Diamond	SBDS, DNAJC21	7q11.21, 5p13.2	AR	Biologia dos ribossomos	Neutropenia, trombocitopenia, anemia aplástica	Baixa estatura, dosostose metafásica, insuficiência pancreática exócrina	i(7q), monossomia 7 ou der(7)
Diamond Blackfan	RPS19, RPS17, RPS24, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS26, RPS10, RPL15, RPL23, RPL27, RPL31, RPL36, RPS15, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, GATA1, TSR2	19q13.3, 15q25, 10q22-23, 3q29-qter, 1p22.11, p26.1-35, 2p25.3, 12q13.2, 6p21.31, 3p24.2, 17q12, 17q21.31, 2q11.2, 19p13.3, 1q21.3, 2p16.1, 19p13.2, 14q21.3, Xp11.23, Xp11.22	AD exceto GATA1 e TSR2 (LX)	Biologia dos ribossomos, fator de transcrição (GATA1), via de apoptose NFKB(TSR2)	aplasia pura de serie vermelha	Fascies típica, alteração e polegar, cardiopatia, alterações do trato genito-urineario	-
Insuficiência medular associada à biologia dos telômeros	TERC, TERT, TINF2, RTEL1, NOP10, NHP2, WRAP53, CTC1, DKC1, ACD, PARN, NAF1, STN1	3q26.3, 5p15.53, 14q11.2, 20q13.33, 15q14-q15, 5q35.5, 5q35.3; 17p13.1, 17p13.1, Xq28, 16q22.1, 16p13.12, 4q32.2, 10q24.33	AD (TERT, TERC, TINF2, RTEL1), AR (NOP10, NHP2, WRAP53, RTEL1, TERT, CTC1), DKC1 (LX)	Biologia dos telômeros	SMD, LMA, insuficiência medular, telonero curto	Distrofia ungueal, fibrose pulmonar e/ou hepática, leucoplasia	-

continua

Tabela 3 - Principais síndromes de predisposição a neoplasias mieloides (conclusão)

Doença	Gene	Localização	Padrão de Herança	Fisiopatologia	Neoplasia/manifestação hematológica	fenótipo	Alteração Citogenética/molecular adicional
LMMJ associada a neurofibromatose ou síndrome de Noonan	<i>NF1, PTPN11, CBL</i>	17q11.2, 12q24.13, 11q23.3	AD	Alteração da via RAS	LMMJ, síndrome mieloproliferativa da síndrome de Noonan (na maior das vezes transitória)	NF1: neurofibromas, manchas café com leite, tumores do nervo óptico Noonan: cardiopatia congênita	Monossomia 7 iso (11q) (CBL)
Neoplasia mielóide associada à síndrome de Down	<i>trissomia cromossomo 21</i>	trissomia 21	-	Aquisição somática de mutação GATA1, aumento da proliferação de progenitores megacariocíticos e eritroides no fígado fetal	doença mieloproliferativa transitória SMD/LMA	Fácies típica, hipotonia muscular na infância, déficit cognitivo, cardiopatia congênita	trissomia 8/ GATA1
SAMD9/SAMD9L	<i>SAMD9/SAMD9L</i>	7q	AD	Controle de proliferação celular. Endossomos	SMD	MIRAGE (infecções, restrição de crescimento, hipoplasia adrenal malformações genitais, enteropatia)/ Síndrome de ataxia e pancitopenia com ataxia cerebelar	Monossomia 7
Aplasia e mielodisplasia familiar associada à mutação SRP72	<i>SRP72</i>	4q12	AD	Processamento proteico	Anemia aplástica SMD	Surdez congênita	-
ATG2B/GSKIP	<i>ATG2B/GSKIP</i>	14q32	AD	Aumento de expressão leva a maior sensibilidade de megacariócitos à trombopoetina	NMPC LMA	-	<i>JAK2, MPL, CALR</i>
MECOM	<i>MECOM</i>	3q26.2	AD	Fator de transcrição, Regulação da renovação de células tronco hematopoiéticas	trombocitopenia amegacariocítica, insuficiência medular	sinostose radio-ulnar, surdez neurosensorial, malformação óssea em mãos, cardiopatia	

AD: autossômico dominante, LX: Ligado ao X, AR: autossômico recessivo; NMPC: neoplasia mieloproliferativa crônica

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos principais

- a) Identificar e caracterizar os pacientes com suspeita de neoplasia mieloide com predisposição germinativa do ambulatório de citopenias do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob o ponto de vista clínico, hematológico e molecular.
- b) Identificar as mutações genéticas constitucionais relacionadas à predisposição germinativa a neoplasia mieloide.

3.2 Objetivo secundário

- a) Caracterizar a evolução clonal citogenética e/ou molecular em pacientes com mutação germinativa identificada.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Estudo de série de casos de pacientes do ambulatório de citopenias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

4.2 Casuística

4.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes cadastrados no ambulatório de citopenias do HC-FMUSP entre 01/01/2010 e 31/12/2018 e seus familiares de primeiro e/ou segundo grau selecionados de acordo com os seguintes critérios de suspeição para predisposição germinativa para neoplasia mieloide:

- a) Diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) ou síndrome mielodisplásica (SMD) e familiares de primeiro grau ou segundo grau também com diagnóstico de LMA, SMD, leucemia linfóide aguda ou trombocitopenia
- b) Pacientes com história pessoal ou familiar de citopenias (definidas como contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$, neutrófilos $<1.5 \times 10^9/L$, Hemoglobina $<100g/L$) sem causa conhecida e/ou histórico de sangramento, linfedema ou infecções por micobactérias atípicas.

4.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes com diagnóstico prévio de neoplasia hematológica associada a síndromes de insuficiências medulares clássicas como anemia de Fanconi e disqueratose congênita.

4.2.3 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAAE: 36392014.2.0000.0068) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os pacientes e seus familiares em primeiro ou segundo grau eram submetidos à avaliação clínica e laboratorial. Caso o paciente ou seu familiar em primeiro grau fosse menor de idade, era obtido o Termo de Assentimento Específico conforme a faixa etária do paciente (entre 7 e 11 anos ou entre 12 e 17 anos), além de TCLE dos responsáveis legais. Crianças menores de 7 anos tinham apenas este último termo assinado pelos pais (Anexos 1-7).

4.2.4 Financiamento

Financiamento próprio e por meio de bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES/88881.188484/2018-01).

4.2.5 Avaliação clínica

Consistiu em histórico pessoal e familiar detalhado, de acordo com o questionário específico adaptado do questionário elaborado por Churpek e Godley⁽¹⁹⁾ (Anexo 8).

4.2.6 Testes laboratoriais iniciais

- a. Hemograma completo, contagem de reticulócitos e eletroforese de hemoglobina (Laboratório de Anemias do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HC-FMUSP);
- b. Sorologias para infecções virais (hepatite B, Hepatite C e HIV) que podem se associar a citopenias e funcionar como fator confundidor na análise dos dados (Laboratório Central do HC-FMUSP); e

- c. Teste de agregação e função plaquetária (Laboratório de Hemostasia do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HC-FMUSP) nos casos de plaquetopenia familiar.

4.2.7 Análise molecular e citogenética

4.2.7.1 Testes citogenéticos

Seguiram os protocolos de rotina clínica do Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia HC-FMUSP.

- a. Citogenética convencional para neoplasia hematológica: Cariótipo realizado utilizando amostras de medula óssea (cultura de 24 a 48 horas sem adição de agentes mitóticos), com bandamento GTW. Utilizado protocolo padrão da rotina clínica do laboratório de citogenética, previamente descrito⁹³. Resultado reportado de acordo com nomenclatura internacional “*International system for human cytogenomic nomenclature*” (ISCN 2016);
- b. Teste com Diepoxibutano (DEB Teste) em amostra de sangue periférico conforme padronizado no laboratório de Citogenética de Serviço de Hematologia HC-FMUSP para afastar fragilidade cromossômica e anemia de Fanconi. Método descrito em sua totalidade por Caputo⁹⁴;
- c. Hibridação *in situ* por fluorescência com o uso de sonda para o gene *RUNX1* para os pacientes com suspeita de plaquetopenia familiar com predisposição a neoplasia mieloide (*ETV6-RUNX1*, ES DC, Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA), conforme método de padronização previamente definido por Leal⁹³.

4.2.7.2 Testes moleculares

4.2.7.2.1 Tecido de origem de material genômico

Os testes moleculares foram realizados em amostras de DNA genômico, obtidos de sangue periférico (SP), medula óssea (MO) ou swab de mucosa oral.

4.2.7.2.2 Extração de DNA

a. Sangue periférico (SP) e medula óssea (MO)

O material genético dos indivíduos foi extraído a partir dos leucócitos por meio do QIAamp® DNA *Blood Mini Kit* (250) (Qiagen®) conforme protocolo do fabricante com algumas modificações.

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram misturados 20 µL de Protease com 200 µL de sangue periférico total. A seguir, a mistura era homogeneizada e eram adicionados 200 µL do *Buffer AL*.

O tubo era vortexado por 15 segundos, incubado a 56°C durante 10 minutos, para lise da membrana celular e nuclear, e centrifugado brevemente. A seguir, eram adicionados 200 µL de etanol absoluto e novamente homogeneizado no vórtex e centrifugado.

A mistura era então aplicada na coluna de extração e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto, para ligação do DNA à membrana da coluna. Terminada a centrifugação, o tubo contendo o filtrado era descartado e a coluna transferida para um novo tubo de 2 mL.

No novo tubo contendo a coluna, eram adicionados 500 µL de tampão de lavagem *Buffer AW2* e o tubo centrifugado a 14000 rpm durante 3 minutos. A coluna era transferida novamente para um novo tubo de 1,5 mL e eram adicionados 100 µL de *Buffer AE*, para eluição do DNA. O tubo era incubado durante 5 minutos, centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto e a coluna era descartada.

A qualidade e concentração das amostras de DNA foram determinadas por meio do gel de eletroforese a 1,5% e pela leitura da absorbância no espectrofotômetro *NanoVue*® (GE *Healthcare Life Sciences*) e as alíquotas de DNA eram armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento dos experimentos.

b. Swab de mucosa oral

Material de mucosa oral era coletada sob supervisão utilizando o kit ORAGENE® DISCOVER 575/ OGR utilizando o protocolo de precipitação de DNA com etanol e o reagente preIT®•L2P conforme protocolo do fabricante com algumas modificações.

As amostras armazenadas no tubo do kit DNA Genotek foram homogeneizadas invertendo algumas vezes o tubo. A seguir, foram colocadas em uma estufa a 50°C por pelo menos 2 horas. O conteúdo de cada tubo foi distribuído em até 6 tubos Eppendorf de 1,5mL (cada um contendo 500 µL da amostra) devidamente rotulados com identificação. Foi então adicionado 20 µL de PT L2P a cada tubo de eppendorf e o mesmo foi invertido algumas vezes. A amostra foi incubada no gelo por 10 min. Após a incubação, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente (22-25°C) durante 5 min a 15.000g ($g = rcf$) e mantido em temperatura ambiente após a rotação. Usando ponteiras largas (“wide”), o sobrenadante claro foi cuidadosamente transferido para um tubo Eppendorf novo. Os tubos contendo o precipitado foram descartados. Em sequência foram adicionados 500 µL de etanol a 100% a cada tubo de Eppendorf com o sobrenadante claro, os tubos foram invertidos suavemente pelo menos 10 vezes para garantir a mistura dos conteúdos. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min para garantir precipitação completa do DNA e novamente colocados em centrífuga em uma orientação conhecida em temperatura ambiente por 5 min e rotação de 15.000g (rcf). O *pellet* formado foi preservado e o sobrenadante descartado. Adicionado novamente 250 µL de etanol a 70% ou 75% para lavar o sedimento e centrifugado a 15.000g (rcf) por 1 min. A seguir foi removido o máximo de etanol usando a pipeta, sem perturbar o *pellet*, que foi deixado em temperatura ambiente para secar por pelo menos 10 min ou o tempo necessário para que estivesse completamente seco. Por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 50-100 µL de TE 10mM (pH 7,5-8,0) e incubado em temperatura ambiente durante a noite e armazenado a -20°C.

2.7.2.3 Técnicas

a. **Hibridação Genômica Comparativa** (“Comparative Genomic Hybridization on microarrays – CGHarray”): foi realizada em amostras de DNA obtidas de material de medula óssea e sangue periférico, utilizando plataforma customizada 180K (OGT Technologies), contendo 618 genes associados a câncer. Pool comercial de indivíduos saudáveis foi utilizado como DNA referência (Promega, Madison, WI, EUA). Purificação, hibridação e lavagem foram realizadas

de acordo com as normas do fabricante. As imagens dos arrays foram processadas usando *o feature extraction software* (v9.1) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). (Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências).

b. **“Single Nucleotide Polymorphism microarray”** (SNP array): foi realizado em amostra de DNA de sangue periférico de paciente, utilizando Cytoscan[®] array 750K que detecta a variação do número de cópias (CNV) no genoma por meio de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). O kit contém cerca de 750 mil sondas capazes de avaliar marcadores polimórficos (avaliam SNP e perda de heterozigosidade) e não polimórficos (avaliam variações de número de cópias). Com esta metodologia, foram consideradas perdas acima de 150 kb, e para deleções em genes sabidamente associados à NMPG, todas as alterações foram consideradas independente de seu tamanho. A técnica foi realizada conforme descrita pelo fabricante. O resultado foi descrito de acordo com a nomenclatura internacional *“International system for human cytogenomic nomenclature”* (ISCN 2016). (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (Laboratório de citogenômica- Hospital Israelita Albert Einstein).

c. **MLPA (“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”)** para SMD familiar: realizados em amostras de DNA de material de sangue periférico ou mucosa oral. O kit SALSA MLPA P437 Familiar MDS-AML probemix (MRC-Amsterdam, Holland) contém um total de 42 sondas para a detecção das aberrações do número de cópia dos genes *GATA2* (3q21.3), *TERC* (3q26.2), *TERT* (5p15.33), *CEBPA* (19q13.11) e *RUNX1* (21q22.12) e duas sondas específicas de mutação pontuais para *GATA2* (1061C > T e 1192C > T) e 13 sondas de referência que detectam 13 diferentes localizações cromossômicas autossômicas, que são relativamente estáveis em amostras de portadores de SMD e LMA. O método que é particularmente útil na detecção de variação do número de cópias, foi realizado conforme protocolo do laboratório de citogenômica previamente descrito por Zanardo⁽⁹⁵⁾. De modo resumido, a técnica consiste em amplificação de sondas ligadas ao DNA alvo, denaturação do DNA e hibridação das sondas às regiões complementares do DNA, reação de ligação entre parte das sondas, reação de PCR, separação por

eletroforese capilar dos produtos amplificados e posterior análise dos dados. (Laboratório de Citogenômica do LIM 03 FMUSP).

d. **Sequenciamento direto** (Sanger) pela técnica de terminação da cadeia (Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP, Laboratório de Imuno-hematologia avançada do HC-FMUSP, Godley Laboratory University of Chicago). Esta técnica foi utilizada para busca inicial de mutações do gene *RUNX1* e *GATA2* em pacientes com fenótipo suspeito de plaquetopenia familiar e neoplasia mieloide e síndrome de deficiência do GATA2 e para confirmar achados suspeitos identificados em sequenciamento de exoma inteiro ou “Whole Exome Sequencing” (WES). Inicialmente foram utilizados os primers para sequenciamento do *RUNX1* éxons 3-8, conforme descrito por Preudhomme et al.⁴¹. (Quadro 3) e para o *GATA2* conforme descrito por Hsu et al (Quadros 4 e 5)⁵⁸. Demais primers foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-Blast⁹⁶ de acordo com a região gênica estudada ou haviam sido descritos previamente (Quadro 6).

Para a análise comparativa com a sequência consenso foram utilizados os softwares Geneious (Copyright 2005-2017 Biomatters Limited), Sequencher versão 5.4.6 (DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) e 4Peaks (Nucleobytes BV, Amsterdam Holanda). Os resultados do sequenciamento do *GATA2* obtidos foram cruzados com os sites MutationTaster (mutationtaster.org) e Provean (provean.jvci.org) e Varsome (varsome.com).

Para reação de cadeia de polimerase foi utilizada a seguinte sequência:

I - Confeção de uma mistura de:

Quadro 1 - Mistura (Master Mix) para realização de PCR

Componente	Quantidade(µL)
10x High Fidelity PCR buffer	2.5
50mM MgSO ₄	1.0
4mM dNTP	1.25
10mM Forward Primer	0.5
10mM Reverse Primer	0.5
Amostra de DNA (template)	1.0
Platinum® Taq DNA polimerase, High Fidelity	0.1
Água destilada	18.15
Volume final para 1 amostra	25

II - Ciclo de PCR

Quadro 2 - Ciclo de PCR. Número de ciclos total de 35 (repetição de passos 2-4)

Passo	Descrição	Temperatura(°C)	Tempo
1	Denaturação inicial	95	2min
2	Denaturação	94	30 s
3	Anelamento	58-65*	30s
4	Extensão	68	1min
5	Extensão final	68	7min
6	Espera	4	indefinido

*Temperatura de anelamento determinada por PCR gradiente, com temperaturas de 58-65°C usando DNA de placenta

III - Após a reação polimerase em cadeia, foi definida se a reação foi bem-sucedida, após avaliação de tamanho de banda esperada em gel de agarose a 1,5%, utilizando 10 µL de amostra.

IV - Os 15 µL de reação bem-sucedida foram então submetidos a um processo de purificação com o GeneElute™ PCR cleanup, conforme as instruções do fabricante.

V - Amostras e primers foram enviados para sequenciamento Sanger. Resumidamente, os amplicons foram submetidos a duas reações de sequenciamento (forward e reverse), com o uso de um mix de reação (bigdye) contendo nucleotídeos normais e nucleotídeos modificados (dideoxynucleotídeos acoplados a fluoróforos) que permitem a parada da cadeia em todas as posições do amplicon. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados, desnaturados e submetidos à eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500, resultando em eletroferogramas que permitem a detecção dos picos de fluorescência em cada posição de nucleotídeo da região analisada.

VI - Os dados resultantes do sequenciamento (arquivo.ab1) foram analisados utilizando softwares, conforme descrito acima.

Quadro 3 - Primers para sequenciamento do gene *RUNX1* exons 3-8 (Preudhomme et al, 2009)

Gene/Exon	Forward	Reverse
RUNX1/Exon3	5'-AGCTGCTTGCTGAAGATCCG-3'	5'-GCCTGTCCTCCCACCACCCTCTC-3'
RUNX1 Exon4	5'-CATCCCTGATGTCTGCATTTGTCC-3'	5'-GTGGGTTTGTGCCATGAAACG-3'
RUNX1 Exon5	5'-TG TTCAGGCCACCAACCTCATTC-3'	5'-CCCAAGGAATCTGAGACATGGTCC-3'
RUNX1 Exon6	5'-CCTGCTCCCCACAATAG-3'	5'-GGTGCAGGAGAGCGGGCAG-3'
RUNX1 Exon7	5'-AATCCCACCCACTTTACAT-3'	5'-CTCAGCTGCAAAGAATGTGT-3'
RUNX1 Exon8	5'-TCCGTTCTCTTGCCCGC-3'	5'-GGCCTGGCGCCTCAGTA-3'

Quadro 4 - Primers para amplificação do gene *GATA2* Exons 1-7 (Hsu et al, 2011)

Gene/exon	Forward	Reverse
Iso 2 ex1a	GAGAGGGTGGGAGCGGCCTGGAGTGTGGATGC	CAAGCCCGCGGCGGCCCATTTCTTATTGAA
x1-2a	GTGCGCCCGGCCACACGAACCATAGAGC	CCCCCGCCCGGTAGACAAACACATGAACACAG
x3-4a	GCTGAACCCCTCCCCCGCCTTCCTTTTCGTTTTG	GCGGGGGCTGGGGCTGGGGACCAAGTTG
x5a	AAGACGGGGTGGGGCAGACACAGTTGGGTAGAAAG	GGCCCCAAAGCAGGGAACGATTTAAGCCTCATA
x6-7a	AGGGGGACCAAGCCGGCTCAGCCTCAGGAT	AAGGCCCTCCCCACCCCAGCTTTCATAC
3'UTRa12796F	CACGCTGTGGCGGGTGGGAGGAATGTTGC	GAGAAACCACGGCTCCCTGCACCTCCCCAGTATC

Quadro 5 - Primers para sequenciamento do gene *GATA2* Exons 1-7 (Hsu et al, 2011)

Exon	Primer
iso2 ex1s1574R	GCGGGGGTGCTTTGCGAGGCTCTGGGAATG
x1s 6031R	CCGACCCCTGCAGCCCCCTTTGCGAACACTC
x2s 6132F	GGGTCAGTCCCGGAGTCCAGCGGTTTCG
x3s 7022F	GGGGCTCCGTGGCGTGCGGGACACCTC
x4s 8621R	ACCCGGGGTCTCAAACATCTGCTGGGGGCTATTA
x4s 7684F	ATGTTTCTGGCTTTCTTTGGGAGGGGATGACTGC
x5s 10106F	TGCTTTCCTGCCCTGGACTCCCTCCCAGAACTTG
x6s 12451R	GTGGCTGGGGCCTCTTGCTGGCAGCACAAA
x7s 12690F	GCCAGAACCCGCCCTTCCTGGAATGGTAGCCATCT
UTRs 12950F	GAAAGGGGCGGAGTGCTTCGAGGAGCTGTCAAAGT
UTRs 14940R	GGGGAGGAGCCTCGGGACGTCAGTGGCAAATCAG

Quadro 6 - Primers utilizados para confirmação de resultado de WES ou busca de alteração em familiares de primeiro grau. *GATA2* (NM_032638); *TERT* (NM_001193376), *AKRD26* (NM_014915), *RUNX1* (NM_001754.4); *BLM* (NM_000057); *SAMD9* (NM_001193307); *DKC1* (NM_001142463)

Gene/region	Forward	Reverse
ANKRD26/5'UTR	CATGGAGCACACTTGACCAC	TACTCCAGTGGCACTCAGTC
GATA2/Intron4	CATGGAGTCACCTATACTGTGTATTT	AGAAGGGACAGAGGGACTG
RUNX1/exon4	TGTTGTGATGCGTATCCCCG	CAAGCTAGGAAGACCGACCC
TERT/exon3	GGGTTGGCTGTGTTCCGGCC	TGGAGACAGGCGCATGCTGA
BLM/exon10*	CCTTTGATAGGTTTGATATGTG	CTGGAGTGACATATAGAAGT
SAMD9/exon2	GATCCCAGACAGTATTGCCGT	GCGTACTCCACAGTAGTTCCC
DKC1/exon15**	CGAGTGCCTTTAGTGCTTCC	CAGACAGCTGCGGACAGTTA

*Primer conforme descrito por Li et al., 1998⁽⁹⁷⁾. ** Primer conforme descrito por Parry et al., 2011⁽⁹⁸⁾

e. Sequenciamento de exoma completo (WES) – Sequenciamento de exoma inteiro, utilizando DNA genômico extraído de amostras de sangue periférico ou medula óssea dos probandos de famílias com suspeita de propensão germinativa à neoplasia mieloide.

Duzentos e cinquenta nanogramas de DNA genômico foram enviados para sequenciamento de nova geração no Yale Center for Genome Analysis (YCGA) para confecção de biblioteca que foi enriquecida de acordo com protocolo Illumina e, posteriormente, sequenciados usando tecnologia Illumina Novaseq, leitura “paired end”, de 2x100 bp (Illumina, San Diego, CA, USA).

Resumidamente, o DNA genômico é fragmentado mecanicamente por um ultrassonicador e, posteriormente, as pontas dos fragmentos de DNA são reparadas e adeniladas, para permitir a ligação de adaptadores com index. Índexes são sequências de DNA artificiais únicos que deverão ser atribuídos individualmente para cada paciente (por exemplo, index 01 para o paciente 01, e index 02 para paciente 02, desta forma, identificando os fragmentos de DNA oriundos de cada paciente). Fragmentos com adaptadores nas duas extremidades são enriquecidos e, então, submetidos à hibridização com sondas, seguidos de captura dos fragmentos hibridizados. Após um segundo ciclo de hibridização e captura, os fragmentos de

interesse são purificados, amplificados por PCR e purificados novamente. A biblioteca de DNA pronta é, então, quantificada para o preparo de um pool equimolar de bibliotecas para serem desnaturadas e colocadas no sequenciador Illumina Novaseq. Dentro do equipamento, cada fragmento de DNA posiciona-se na flow cell, e é submetido a uma reação de clusterização, que visa a fazer cópias clonais de cada fragmento de DNA, permitindo a detecção de fluorescência na etapa de sequenciamento.

Após o sequenciamento, os arquivos contendo os dados brutos (arquivo.bcl) foram processados com auxílio de ferramentas de bioinformática com intuito de obter arquivos VCF (Variant Calling Format) individual de cada paciente, contemplando as variantes identificadas. Para isto, foi utilizado *pipeline* desenvolvido pela Universidade de Chicago que se baseia na ferramenta Genome Analysis Toolkit (GATK) do Broad Institute ⁹⁹. Sumariamente, o arquivo bruto (.bcl), oriundo do sequenciador, foi demultiplexado gerando um arquivo FASTQ por paciente, que contempla todas as sequências por amostra. Posteriormente, a leitura foi alinhada com o genoma humano de referência hg38/CRCh38 por meio do algoritmo BWA-MEM ¹⁰⁰, gerando o arquivo mapeado BAM, e variações em relação ao genoma referência foram identificadas, usando-se o GATK versão 4.1. Por fim, as anotações funcionais das variantes foram obtidas pela ferramenta de informática ANNOVAR que tem como função anotar alterações de nucleotídeos e inserções e deleções, assim como definir a consequência funcional no gene ¹⁰¹.

Uma vez completado o processamento de bioinformática, os arquivos de variantes VCF foram individualmente avaliados utilizando-se o programa STATA 15.1 (StataCorp. 2017. *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC). O programa IGV (versão 2.2.14) foi utilizado para revisão visual do alinhamento das leituras e variantes. As variantes de interesse encontradas foram então analisadas com auxílio da ferramenta online de classificação de variante, Varsome ¹⁰² que contempla os critérios do Colégio Americano de Genética Médica (ACMG) ¹⁰³, sendo aplicados para avaliar o grau de patogenicidade ou benignidade da variante encontrada. A classificação ACMG utiliza-se da seguinte nomenclatura: Patogênica (P), provavelmente patogênica (LP), variante de significado clínico incerto (VUS), provavelmente benigna (LB) e benigna (B) e leva em consideração a

combinação de critérios associados a dados populacionais, previsões de bioinformática, estudos funcionais e segregação. Para fim deste estudo apenas as variantes que se enquadraram nas categorias patogênica, provavelmente patogênica e variante de significado incerto foram consideradas para investigação. A tabela com os critérios e combinação dos mesmos determinantes para classificação encontra-se no Anexo 9.

A seguinte ordem de triagem de variantes suspeitas foi usada:

1. Análise de todas as variantes encontradas em genes previamente descritos associados ao fenótipo do paciente;
2. Análise de variantes encontradas na lista de 79 genes incluídos no painel de LMA hereditária e insuficiência medular hereditária do Genetic Services Laboratory da Universidade de Chicago (Quadro 7);
3. Análise de variantes com alto potencial de levar a perda funcional (mutações *frameshift* e *nonsense*); e
4. Análise de mutações pontuais (SNV) não sinônimas com frequência do alelo alternativo menor que 0,001 (0,1%) no genome aggregation data base (gnomAD) que reúne dados de sequenciamento de genoma de mais de 71702 genomas de indivíduos de diversas ancestralidades¹⁰⁴.

Quadro 7 - Lista de genes utilizados para a triagem de variantes gênicas e evolução clonal

Lista	Genes
Plaquetopenia familiar	<i>RUNX1, ETV6, ANKRD26, DDX41, PTPRJ</i>
Universidade de Chicago Painel de neoplasia mieloide e insuficiência medular hereditária	<p><i>ACD, ALAS2, ANKRD26, ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CBL, CEBPA, CHEK2, CSF3R, CTC1, CXCR4, DDX41, DKC1, DNAJC21, ELANE, ERCC4, ETV6, FANCA, FANCb, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, G6PC3, GATA1, GATA2, GFII, HAX1, IKZF1, MLH1, MPL, MSH2, MSH6, NAF1, NBN, NF1, NHP2, NOP10, PALB2, PARN, PAX5, PMS2, POT1, PTPN11, RAD51, RAD51C, RBM8A, RPL11, RPL15, RPL26, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS19, RPS24, RPS26, RPS7, RTELI, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SBDS, SBF2, SLX4, SRP72, TERC, TERT, TINF2, TP53, UBE2T, USB1, VPS45, WAS, WRAP53</i></p>
Genes relevantes para evolução clonal	<p><i>ABL1, ARID1A, ASXL1, ATM, BCL10, BCL11B, BCL6, BCOR, BCORL1, BIRC3, BRAF, BRCC3, BTG1, BTG2, CALR, CARD11, CBL, CBLB, CCND3, CD58, CD70, CD79A, CD79B, CDKN2A, CEBPA, CHD2, CNOT3, CREBBP, CRLF2, CSF1R, CSF3R, CTCF, CTNBN1, CUX1, CXCR4, DDX3X, DDX41, DIS3, DNMT3A, DNMT3B, EBF1, EED, EGFR, EP300, ETV6, EZH2, EZR, FAM46C, FANCL, FAS, FBXO11, FBXW7, FLT3, FOXP1, FYN, GATA1, GATA3, GNA13, GNAS, GNB1, HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E, HIST1H3B, ID3, IDH1, IDH2, IKBKB, INTS12, IRF4, IRF8, IKZF1, IKZF2, IKZF3, IL7R, JAK1, JAK2, JAK3, JARID2, KDM6A, KIT, KLHL6, KRAS, LEF1, LRRK2, LTB, LUC7L2, MALT1, MAP2K1, MAP3K14, MED12, MEF2B, MLL, MLL2, MXRA5, MPL, MYD88, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NPM1, NRAS, NT5C2, P2RY8, PAPD5, PDSS2, PAX5, PDGFRA, PDS5B, PHF6, PIGA, PIK3CA, PIMI, POT1, POU2AF1, POU2F2, PRDM1, PRPF40B, PRPF8, PTEN, PTPNI, PTPN11, RAD21, RBBP4, RET, RHOA, RIT1, RPL5, RPL10, RPS15, RPS2, RUNX1, SETBP1, SETD2, SF3A1, SF3B1, SFRS2, SGK1, SMC1A, SMC3, SOCS1, SPRY4, STAG1, STAG2, STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6, SUZ12, SWAP70, TBL1XR1, TCF3, TET1, TET2, TMEM30A, TNF, TNFAIP3, TNFRSF14, TP53, TRAF3, TYW1, U2AF1, U2AF2, UBR5, WT1, XBP1, XPO1, ZNF471, ZRSR2</i></p>

4.2.7.2.4 Fluxograma de Análise

Os casos do ambulatório de citopenias do HC-FMUSP foram subdivididos em três grupos de análise e os testes moleculares realizados, conforme o fenótipo clínico (Figura 2).

- a) Trombocitopenia e história familiar ou pessoal de neoplasia mieloide ou linfoide
Foi realizado sequenciamento direto por técnica de reação de cadeia polimerase Sanger dos éxons 3-8 do gene *RUNXI*, conforme descrito por Preudhomme ⁴¹. Não sendo identificada mutação, a amostra de probando foi encaminhada para sequenciamento de exoma. Se a mutação suspeita foi identificada, foi realizado sequenciamento para confirmação. Se não se identificasse a mutação, era investigada a deleção *RUNXI* por meio de CGH ou MLPA para identificar possível perda de material genético no gene *RUNXI*;
- b) Histórico de infecções, linfedema ou síndrome MonoMac. Inicialmente, foi realizado sequenciamento do gene *GATA2*, conforme descrito por Hsu ⁵⁸. Nos casos onde não foi encontrada mutação, foi realizada pesquisa de mutação do intron 4 do gene *GATA2*. Não sendo localizada a mutação, foi realizada pesquisa de perda de material genético e, posteriormente, exoma;
- c) Em pacientes com outros fenótipos a amostra foi encaminhada sequenciamento de exoma, e as mutações suspeitas foram confirmadas pela técnica de Sanger;

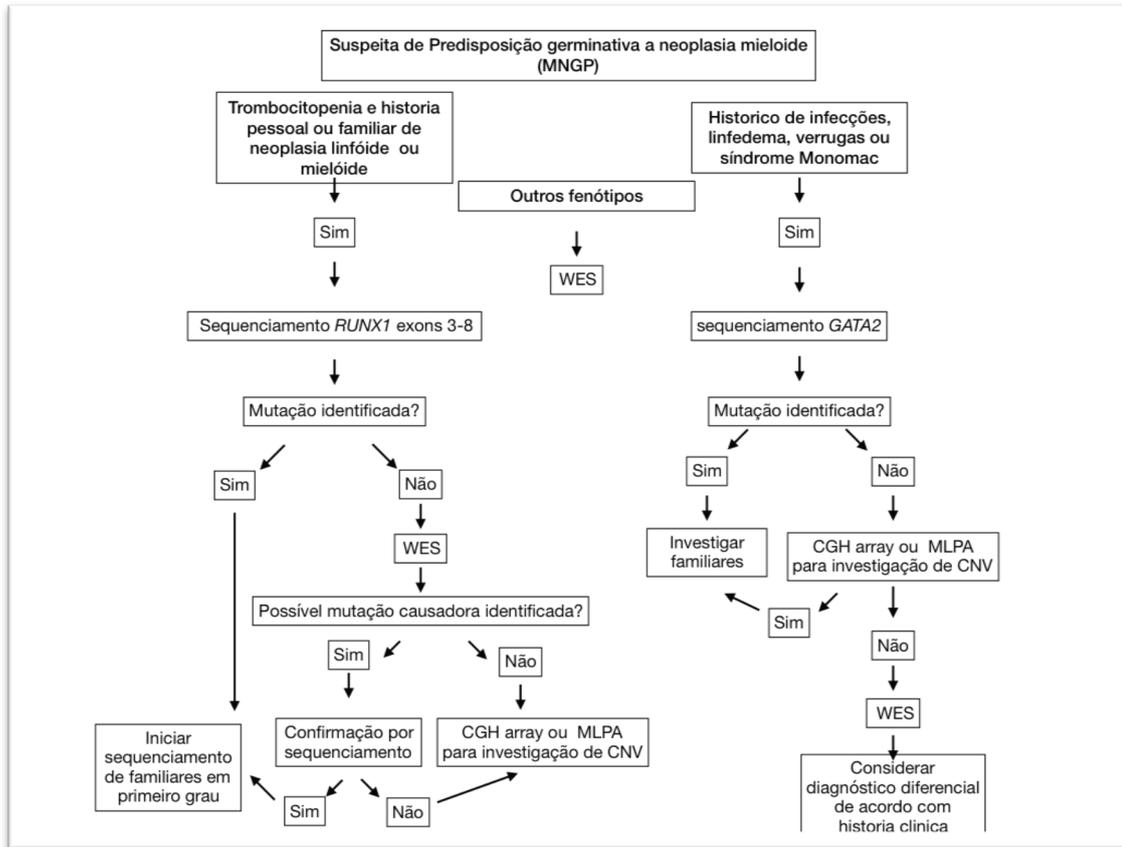


Figura 2 - Fluxograma de investigação molecular dos casos suspeitos de predisposição germinativa à neoplasia mielóide

- d) Uma vez que a mutação suspeita de predisposição germinativa foi confirmada no probando, seus familiares foram testados para a mesma mutação, utilizando a técnica de Sanger. Os casos positivos para a mesma mutação, foram enviados para sequenciamento de exoma quando possível, com intuito de identificar a possível evolução clonal na amostra de sangue periférico. Para triar os genes suspeitos de evolução clonal, foi utilizada lista de 175 genes. Todas as frequências alélicas foram consideradas nesta avaliação.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Tamanho da população estudada e triagem dos casos

O ambulatório de citopenias do HC-FMUSP é responsável pela investigação dos casos de citopenias em geral. No ambulatório, são cadastrados os pacientes com diagnóstico de síndromes mielodisplásicas, leucemia mielomonocítica crônica, insuficiências medulares com evolução clonal definida por estudo citogenético (anemia de Fanconi e anemia aplástica), neoplasia mieloide relacionada à terapêutica e, desde 2010, os casos suspeitos de predisposição germinativa à neoplasia mieloide.

Foram cadastrados 806 pacientes, desde 1987. Para fins deste estudo, foram triados os pacientes cadastrados entre 01/01/2010 e 31/12/2018 que totalizaram 322, dos quais 30 pacientes (9,3%) apresentavam suspeita de NMPG. Destes, 6 (20%) foram excluídos por apresentarem teste de diepoxibutano positivo e diagnóstico confirmado de anemia de Fanconi. Sete (7) pacientes foram excluídos da análise por dificuldades de contato e por não terem assinado o TCLE.

Entre os pacientes cadastrados no ambulatório de citopenias com idade inferior a 40 anos (considerados jovens para o desenvolvimento de neoplasias mieloides), 20 (37,7%) apresentavam suspeita de NMPG não relacionada à anemia de Fanconi.

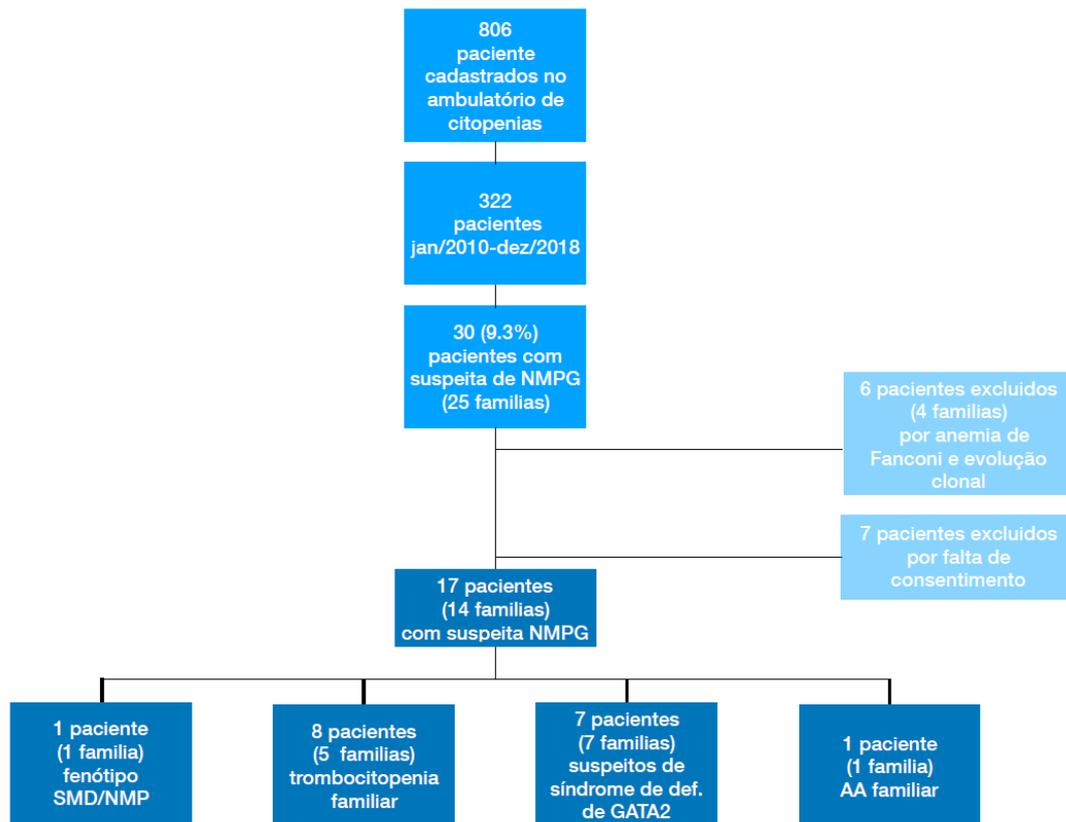


Figura 3 - Distribuição dos pacientes do ambulatório de citopenias com suspeita de propensão germinativa à neoplasia mieloide. AA: Anemia Aplástica

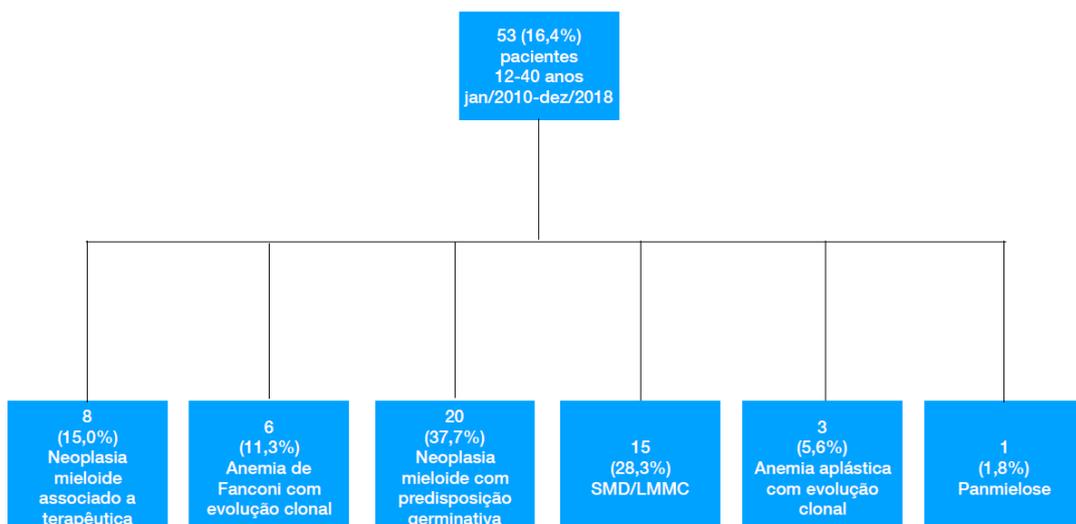


Figura 4 - Distribuição conforme com suspeita clínica/diagnóstico dos pacientes com idade igual ou inferior a 40 anos do ambulatório de citopenias diagnosticados de janeiro/2010 a dezembro/2018. Para maior clareza, os casos de predisposição germinativa à neoplasia mieloide decorrentes de anemia de Fanconi foram listados separadamente

Dos 17 pacientes (14 famílias não relacionadas) que assinaram TCLE houve discreta preponderância do sexo feminino (nove casos, 52,9%). A mediana de idade foi de 29 anos (16-75 anos). O motivo para suspeita de NMPG foi distribuído da seguinte maneira: oito (47,06%) casos apresentavam história pessoal ou familiar de plaquetopenia, seis (35,29%) casos apresentavam história pessoal ou em familiar de primeiro grau de linfedema, um caso (5,88%) apresentava imunodeficiência e verrugas de repetição, um (5,88%) com familiar de primeiro grau com diagnóstico de anemia aplástica e um (5,88%) com familiar de primeiro grau com diagnóstico de mielofibrose primária. Três pacientes (17,65%) apresentavam histórico de tratamento quimioterápico para neoplasia (dois por diagnóstico de LMA e um por LLA).

Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com suspeita de NMPG

Características	N= 17
Sexo feminino	9 (52,94%)
Idade (mediana, variação)	29 (16-75)
Fenótipo	
Plaquetopenia familiar	8 (47,06%)
Linfedema (pessoal ou familiar)	6 (35,29%)
Imunodeficiência	1 (5,88%)
SMD/SMP	1 (5,88%)
Anemia aplástica familiar	1 (5,88%)
Hemoglobina g/L (variação)	116 (45-172)
Leucócitos x10 ⁹ /L média/mediana (variação)	5,41/5,9 (1,71-10,6)
Neutrófilos x10 ⁹ /L média/mediana (variação)	3,09/2,9 (0,6-6,5)
Plaquetas x10 ⁹ /L média/mediana (variação)	89,8/80,0 (14-327)
Histórico de tratamento quimioterápico	3 (17,65%)
Histórico familiar de neoplasia hematológica	9 (52,94)

Um total de 24 familiares de pacientes (primeiro ou segundo grau) participaram da pesquisa e tiveram amostras coletadas de sangue periférico ou saliva.

Avaliação quanto à aquisição de mutações somáticas (evolução clonal) foi realizada em 17 dos 31 probandos e familiares onde mutação suspeita foi identificada. Dois casos sem evolução clonal molecular se destacam: um com progressão para leucemia mieloide aguda, e o outro com evolução clonal cariotípica sem evidência de evolução clonal molecular pelo método empregado.

Os dados da Tabela 5 reúnem os achados clínicos, citogenéticos e moleculares dos pacientes com suspeita de NMPG.

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes e familiares portadores de predisposição germinativa a neoplasia mieloide

Paciente	Sexo	Idade	Fenótipo	Hemoglobina (g/L)	VCM(fL)	Leucócito/Neutrófilo (x10 ⁹ /L)	Plaqueta (x10 ⁹ /L)	Neoplasia hematológica	Medula óssea (Celularidade/%CD34+)	Cariótipo/FISH/array	Mutação suspeita	ACMG	Evolução clonal (gene/VAF)
AIII-2	M	25	Plaquetopenia familiar	155	76,1	10,6/ 5,45	89	LMA	Nomrocélular (75%)/ Blastos: 2,7% . Megacariócitos hipolobulados e micro megacariócitos.	46, XY[20]/ deleção 2,6Mb no braço longo do cromossomo 12	del exons 1 e 2 RUNX1	P	PHF6 (0.79)
AIII-6	M	23	Plaquetopenia familiar	124	69,4	6,97/2,9	32	Linfoma Linfoblástico T -> LMA	Normocélular (85%)/ CD34+:9% displasia trilinear, megacariócitos hiperlobulados, hipolobulados e micromegacariócitos	46,XY[20]	del exons 1 e 2 RUNX1	P	TET2 (0.61) MLL (0.40) BCOR (0.90)
AIII-8	M	21	Plaquetopenia familiar	175	86,5	7,0/ 4,7	116	Não	NR	NR	del exons 1 e 2 RUNX1	P	Não
AIII-10	M	20	Plaquetopenia familiar	172	84	6,89/ 4,5	91	Não	Hipocélular (40-50%), 0,4% mieloblastos. Linhagem megacariocítica normal	46,XY[20]	del exons 1 e 2 RUNX1	P	Não
AIV-2	M	2	Plaquetopenia familiar	125	74,7	7,82/3,51	188	Não	NR	NR	del exons 1 e 2 RUNX1	P	Não
AIV-5	M	1	Plaquetopenia familiar	111	71,1	9,19/ 3,41	276	Não	NR	NR	del exons 1 e 2 RUNX1	P	Não
BII-10	F	51	Plaquetopenia familiar	140	91,2	9,72/6,0	46,5	Não	Hipercélular (65%)/ dismegacariopoiese/ 3%	46,XX[20]	ANKRD26: c.-128G>A	P*	NR
BII-12	F	48	Plaquetopenia familiar	77	90	32/10,8	5	SMD->LMA	Hipercélular, 23% de células imaturas. Hipocelularidade da série megacariocítica	46,XX,-6, del(7)(q11.2),+mar [20]	ANKRD26: c.-128G>A	P*	RUNX1 (0.55) FLT3 (0.18) CBL (0.88) CUX1 (0.92) TET2 (0.41)

continua

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes e familiares portadores de predisposição germinativa a neoplasia mieloide (continuação)

Paciente	Sexo	Idade	Fenótipo	Hemoglobina (g/L)	VCN(fL)	Leucocito/Neutrofilo (x10 ⁹ /L)	Plaqueta (x10 ⁹ /L)	Neoplasia hematológica	Medula óssea (Celularidade/%CD34+)	Cariótipo/FISH/array	Mutação suspeita	ACMG	Evolução clonal (gene/VAF)
BIII-14	M	22	Plaquetopenia familiar	146	84,3	5,95/3,8	25,3	Não	Hipocelular (35%) / dismegacariopoiese / <1%	46,XY[5]	ANKRD26: c.-128G>A	P*	Não
BIII-16	F	8	Plaquetopenia familiar	147	82,1	12,75/8,5	24	Não	NR	NR	ANKRD26: c.-128G>A	P*	Não
CII-13	M	50	Plaquetopenia familiar	119	107	1,7/1,2	27,4	Não	hipocelular (35%) / <1%	46,XY[20]	TERT: c.1610G>A p.Arg537His	VUS	NR
CIII-1	M	24	Plaquetopenia familiar	133	92,5	1,3/4,0	188	Não	NR	NR	TERT: c.1610G>A p.Arg537His	VUS	NR
CIII-2	F	21	Plaquetopenia familiar	130	96,8	7,5/5,2	201	Não	NR	NR	TERT: c.1610G>A p.Arg537His	VUS	NR
DII-4	M	68	Plaquetopenia familiar	127	96,5	4,3/2,0	70	Não	NR	NR	RUNX1: c.320G>C p.Arg107Pro	LP	BCOR (0.18)
DIII-1	M	40	Plaquetopenia familiar	134	89	4,3/3,68	81	Não	NR	NR	RUNX1: c.320G>C p.Arg107Pro	LP	BCOR (0.41)
DIII-3	F	35	Plaquetopenia familiar	116	103	3,13/1,3	29,5	LMA	Mielograma normocelular, 8% de blastos	46,XX[6]	RUNX1: c.320G>C p.Arg107Pro	LP	Não
DIV-1	M	5	Plaquetopenia familiar	133	77,3	11/4,6	164	Não	NR	NR	RUNX1: c.320G>C p.Arg107Pro	LP	Não
DIV-2	F	4	Plaquetopenia familiar	116	78,7	8,32/2,49	75	Não	NR	NR	RUNX1: c.320G>C p.Arg107Pro	LP	Não

continua

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes e familiares portadores de predisposição germinativa a neoplasia mieloide (continuação)

Paciente	Sexo	Idade	Fenótipo	Hemoglobina (g/L)	VCM (fL)	Leucócito/Neutrófilo (x10 ⁹ /L)	Plaqueta (x10 ⁹ /L)	Neoplasia hematológica	Medula óssea (Celularidade/%CD34+)	Cariótipo/FISH/array	Mutação suspeita	ACMG	Evolução clonal (gene/VAF)
E	F	16	Linfedema	71	81,9	2,12/0,6	36	SMD	Hipocelular (55%)/ CD34+ em 7%/reticulogenese grau 2	45, XX,-7[13]	GATA2: c.630_643del p.Lys212ThrfsTer65	LP	ASXL1(0.19) ETV6 (0.24) KRAS (0.21)
F III-1	M	22	Imunodeficiência	159	86,4	2,0/1,5	103	Não	Hipocelular (30%)<1%/ megacariócitos hipolobados	46, XY, der(21)t(1;21)(q12;p12)[12]/92,XXYY,der(21)t(1;21)(q12;p12)x2 [4]/46, XY[4]	Não identificado	-	NR
GI-1	F	49	Linfedema	132	89,3	2,08/1,01	136	Não	NR	NR	GATA2:c.1034_1035 insTCTTCTTGTGGCG GCTCTTCTGGCGG p.Ala345_Gly346insLeuLeuValAlaAlaLeuLeuAlaAla	VUS	Não
GII-1	F	29	Linfedema	75	98	4,49/1,5	80	Não	Hipercelular (80%)/ megacariócitos multinucleados/ <1%	47, XX, +1der(1;15)(q10;q10), +8[20]	GATA2:c.1034_1035 insTCTTCTTGTGGCG GCTCTTCTGGCGG p.Ala345_Gly346insLeuLeuValAlaAlaLeuLeuAlaAla	VUS	Não
H IV-1	F	19	Linfedema	100	92,5	9,37/6,5	176	Não	hipercelular (85%)/ <1%	46,XX[20]	Não identificado	-	NR
I	M	29	Linfedema	105	96,4	2,58/2,0	104	Não	Hipocelular (40%),1%/ megacariócitos multinucleados	46,XY[35]	GATA2: c.708delG p.Gly237AlafsTer89	LP	NR
J	M	33	Linfedema	106	79,6	7,75/5,5	327	Não	Hipercelular (85%)/ <1%/ Megaloblastoide	46,XY[8]	Não identificado	.	NR

ontinua

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes e familiares portadores de predisposição germinativa a neoplasia mieloide (conclusão)

Paciente	Sexo	Idade	Fenótipo	Hemoglobina (g/L)	VCM (fl.)	Leucócito/Neutrófilo (x10 ⁹ /L)	Plaqueta (x10 ⁹ /L)	Neoplasia hematológica	Medula óssea (Celularidade/%CD34+)	Cariótipo/FISH/array	Mutação suspeita	ACMG	Evolução clonal (gene/VAF)
K I-1	F	75	Linfedema familiar	113	106	3,65/1,06	14	SMD	hiper 45%/ <1%/ sem megacariócitos	46,XX[20]	Não identificada	-	NR
K II-2	F	55	Linfedema	95	61	4,9/3,2	378	Não	NR	NR	Não identificada	.	NR
L II-3	F	40	anemia aplástica	104	86,9	6,6/4,6	84	Não	Hipocelular (15%)/<1% CD34/ megacariócitos mononucleados	46,XX[20]	Não identificada	-	NR
M III-6	M	35	SMD/SMP	61	87,1	4,8/3,3	103	SMD/SMP	Hipercelular (100%)/CD34<1%/reticulogenese grau 4	Sem metáfases /FISH para cromosomos 5, 7 e 8 normal	BLM: c.2207_2212delATCTG AinsTAGATTC p.Tyr736LeufsTer5	LP	NR
M III-7	M	33	SMD/SMP	45	83,1	2,59/1,2	200	SMD/SMP	Hipercelular (68,3%)/ <1% ret grau 2 ? megacariócitos multinucleados/ mastocitose	Sem metáfases /FISH para cromosomos 5, 7 e 8 normal	BLM: c.2207_2212delATCTG AinsTAGATTC p.Tyr736LeufsTer5	LP	NR
N	F	16	Plaquetopenia familiar	121	94	5,9/2,96	62	Não	Hipocelular (40%)/ CD34+<1%/ megacariócitos pequenos e hipolobados	46, XX[11]	arr 22q11.21 (18919477_21800471)x 1	P	NR

VUS: variante de significado incerto, LP: provavelmente patogênica, P: patogênica. NR: não realizado * Pelo menos 8 famílias com trombocitopenia 2 e mutação semelhante foram descritas na literatura

5.2 Casos e famílias indicados, conforme fenótipo

Família A

Paciente de 25 anos, masculino, com diagnóstico de LMA aos 10 anos, irmão com histórico de linfoma linfoblástico T também aos 10 anos. Ambos apresentavam plaquetopenia, e mais dois irmãos com histórico de plaquetopenia isolada (Figura 5). Não havia relato de consanguinidade parental. Apresentava história familiar de irmã paterna falecida por leucemia. Pai e mãe do paciente estavam vivos e hígidos, porém o pai não estava disponível para histórico completo.

A Tabela 6 reúne as características clínicas do probando, seu irmão também com diagnóstico de neoplasia hematológica e familiares.

Inicialmente, foi realizado sequenciamento direto por Sanger (éxons 3-8) do gene RUNX1, não foi encontrada mutação suspeita. O estudo por CGH-array identificou microdeleção de 163kb, envolvendo os éxons 1 e 2 do gene RUNX1. A deleção foi confirmada por MLPA e considerada patogênica de acordo com os critérios ACMG (PSV1, PP1 e PP5). O probando apresentava ainda uma deleção de 2,6Mb no braço longo do cromossomo 12 identificada em amostra de sangue periférico, mas não em amostra de mucosa oral. Do total de oito familiares testados, quatro apresentavam a microdeleção encontrada no probando por MLPA.

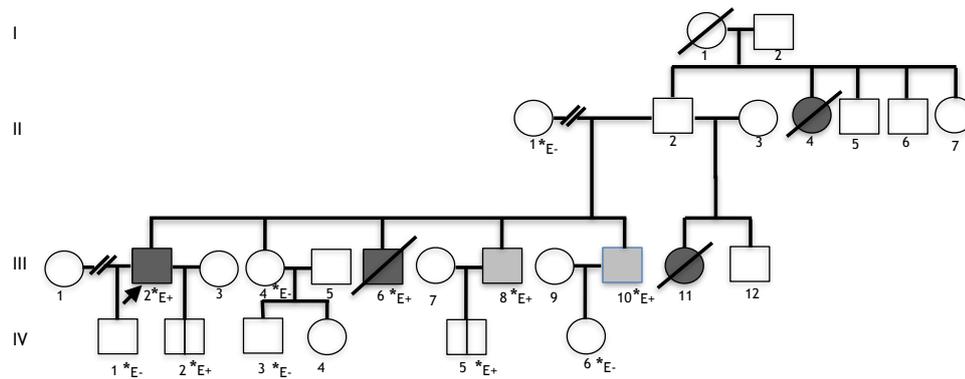


Figura 5 - Heredograma da família A. Símbolos brancos representam parentes não afetados; símbolos cheios (cinza-escuro) representam indivíduos com neoplasias hematológicas; símbolos cinza-claros representam indivíduos com trombocitopenia, (*) representa indivíduos avaliados diretamente; E representa a avaliação das microdeleções dos éxons 1 e 2 do *RUNX1*. E +: microdeleção de éxons 1 e 2 do *RUNX1* detectados; E -: microdeleção de éxons 1 e 2 do *RUNX1* não detectados. Símbolos cruzados por uma linha vertical representam indivíduos assintomáticos que testaram positivo para microdeleção dos éxons 1 e 2 do gene *RUNX1*

Tabela 6 - Características clínicas laboratoriais dos pacientes e familiares de primeiro grau da família A

Paciente	História de sangramento	Trombocitopenia	Agregação Plaquetária	Hb (g/L)	VCM (fL)	Leucocito/Neutrofilo (x10 ⁹ /L)	Hb Fetal(%)	Neoplasia hematológica	Medula óssea (Celularidade/%blastos/displasia)	Cariótipo	Idade ao diagnóstico de neoplasia (anos)	Del éxons 1 e 2 do gene RUNX1	Status
II-2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Não	NR	NR	-	NR	Vivo
II-4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Leucemia	NR	NR	2	NR	Faleceu
III-2	Não	Sim (89 x10 ⁹ /L)	contagem plaquetaria insuficiente	155	76,1	10,6/ 5,45	17	LMA	Normocelular/ Blastos: 2,7% / . Megacariócitos hipolobulados e micro megacariócitos. ALIPs	46,XY[20]	10	Sim	em remissão e vivo (idade 26)
III-4	Não	Não (275x10 ⁹ /L)	Hipoagregante em ADR, ADP, COL, AA.	145	83,1	5,68/3,6	0,8	Não	NR	NR	-	Não	vivo (idade 25)
III-6	Não	Sim (32x10 ⁹ /L)	AA ausente, ADP hipoagregante, SPT, negativa, ADR, ausente, COL: ausente	124	69,4	6,97/ 2,9	14,3	Linfoma Linfoblastico T -> LMA	Normocelular/ 9% mieloblastos/ displasia trilinear, megacariócitos hiperlobulados, hipolobulados e micromegacariócitos,	46,XY[20]	10	Sim	Falecido (idade 23) por LMA
III-8	Não	Sim (116x10 ⁹ /L)	Ausente em AA, hipoagregante com ADP,ADR, COL; hipoagregante COL (16%), ADR (50%) normal com AA e ADP	175	86,5	7,0 / 4,7	1	Não	NR	NR	-	Sim	Vivo (idade 22)
III-10	Não	Sim (91x10 ⁹ /L)	Ausente AA, COL, ADR. hipoagregante ADP	172	84	6,89/4,5	1,2	Não	Hipocelular (40-50%)/ 0,4% mieloblastos/ Linhagem megacariocítica normal	46,XY[20]	-	Sim	Vivo (idade 21)
III-11	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NA	Leucemia	NR	NR	NA	NR	Falecido (aos 5)
IV-2	Não	Não (188x10 ⁹ /L)	NR	125	74,7	7,82/3,51	NA	Não	NR	NR	-	Sim	Vivo (idade 3)
IV-5	Não	Não (276x10 ⁹ /L)	NR	111	71,1	9,19/3,41	NA	Não	NR	NR	-	Sim	Vivo (idade 2)

NA: não disponível, NR: não realizado, AA: ácido aracdônico, COL: colágeno, SPT: espontâneo; ADP: di-fosfato de adenina

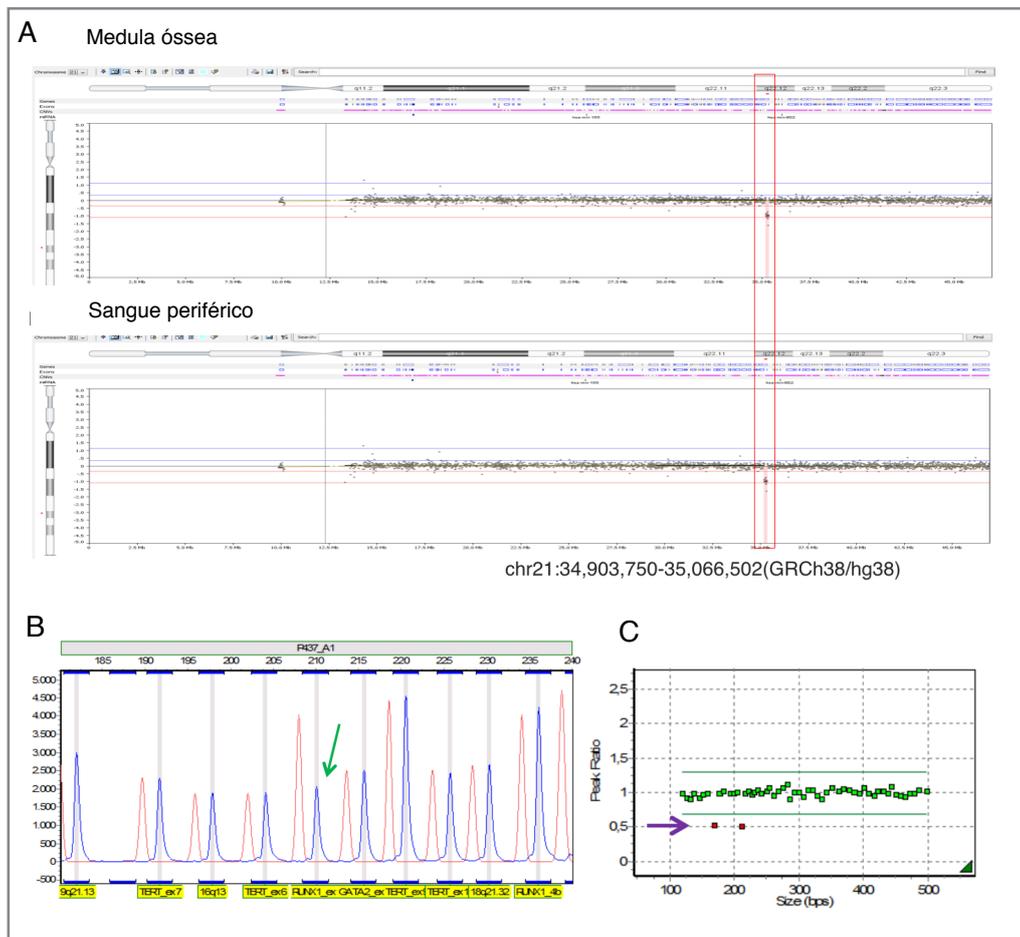


Figura 6 - A. CGH-array do probando da família A mostrando microdeleção de 163kb no cromossomo 21 em sangue periférico e medula óssea. B e C Multiplex dependent Probe Amplification (MLPA) mostrando deleção no gene *RUNX1*. B. Seta verde indica pico de amostra (azul) menor que o controle (vermelho). C. Deleção das sondas dos éxons 1 e 2 do gene *RUNX1* (seta roxa)

Paciente B

Paciente de 50 anos, sexo feminino, plaquetopenia identificada desde a menarca por episódios de metrorragia. Apresentava diagnóstico prévio de púrpura trombocitopênica imunológica sem resposta ao uso de corticoide. Irmã com diagnóstico de SMD aos 45 anos, faleceu 3 anos após diagnóstico por progressão para leucemia mieloide aguda. Tem dois filhos e uma neta com plaquetopenia e dois sobrinhos (filhos da irmã com diagnóstico de LMA) também com plaquetopenia. (Figura 7).

A paciente apresentava em primeira avaliação hemograma cuja única alteração era plaquetopenia de $46 \times 10^9/L$. Medula óssea mostrava-se hipercelular (65% de celularidade), reticulogênese grau I (OMS). A série megacariocítica apresentava-se displástica com megacariócitos pequenos, hipolobados e mononucleados. Apresentava ainda 3% de células CD34+ em biópsia de medula óssea.

Foi realizado WES em probando e identificada mutação na região UTR do gene *ANKRD26:c.-128G>A*, e foi confirmada por sequenciamento por Sanger.

Amostra de sangue periférico do probando, sua irmã e dois sobrinhos com plaquetopenia foram coletadas (Figura 5). WES identificou mutação no gene *ANKRD26: c.-128G>A* (NM_14915.2) localizado na região 5'UTR no probando, confirmada por técnica de Sanger e também encontrada em familiares com plaquetopenia. Seguindo critérios do ACMG esta variante é classificada como patogênica (PS1, PS4, PM2, PP1). Nos familiares da geração III pesquisados, também foi identificada segunda mutação nesta região *ANKRD26:c.-140C>G* que apresenta frequência alélica de 0,064 na plataforma gnomAD e classificada pelos critérios ACMG como benigna (BA1, BP4 e BP6).

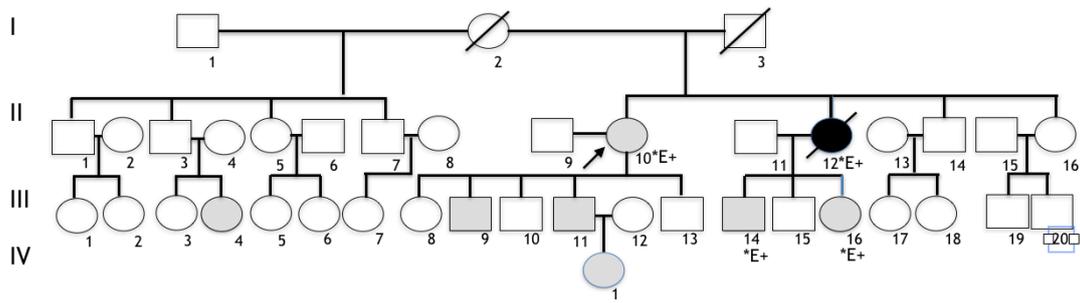


Figura 7 - Heredograma da paciente B. Símbolos brancos representam familiares não afetados, símbolos em cinza representam familiares com relato de plaquetopenia, símbolo preto representa paciente com diagnóstico de neoplasia hematológica. (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores, E+ indivíduos positivos para a mutação *ANKRD26*

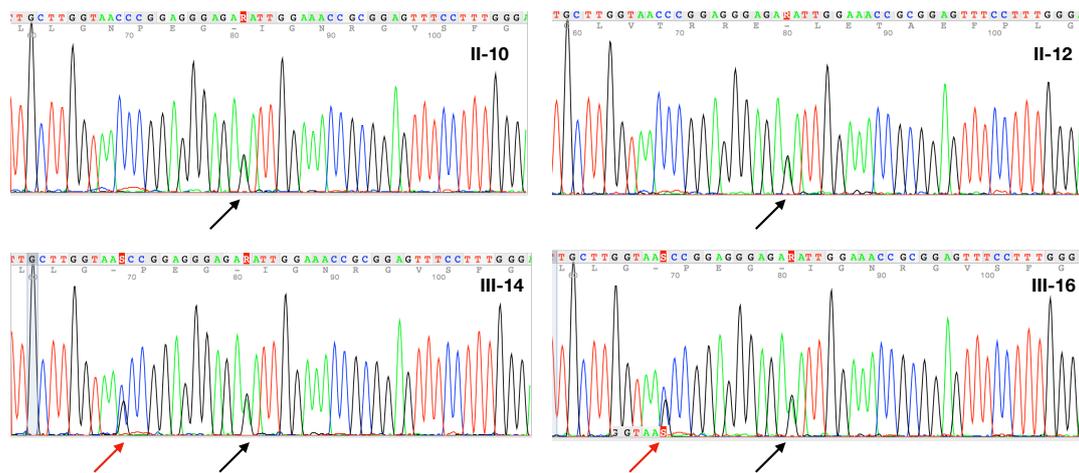


Figura 8 - Sequenciamento por técnica de Sanger da região 5'UTR do gene *ANKRD26*, confirmando presença de mutação c.-128G>A em heterozigose (seta preta) identificada em WES do probando e presença de segunda mutação c.-140C>G nos indivíduos testados da geração 3 (seta vermelha), não encontrada previamente

Paciente C

Paciente, 50 anos, sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de hematologia com diagnóstico de síndrome mielodisplásica. Apresentava relato de plaquetopenia identificada há 3 anos em exames de rotina, epistaxe recorrente, porém autolimitada sem nenhum outro sangramento. Pais consanguíneos, têm histórico de três irmãos falecidos por diagnóstico de leucemia (relata idade média de 18 anos ao falecimento).

Exames ao diagnóstico:

Hb: 120 g/L VCM: 106 fL Leucócitos: $1,89 \times 10^9/L$ Neutrófilos: $1,40 \times 10^9/L$ Linfócitos: $0,4 \times 10^9/L$ Plaquetas: $25,9 \times 10^9/L$. Sorologias para hepatites B e C e HIV negativas.

Cariótipo de medula óssea: 46,XY[20]

Comprimento telomérico: curto para a idade (entre percentis 1 e 10)

Medula óssea hipocelular (20%) às custas das séries megacariocítica e granulocítica com hiperplasia relativa de série eritroide, série megacariocítica pequena com elementos hipolobados. Imuno-histoquímica com contagem de células CD34+ menor que 1%. Tomografia computadorizada de abdome revelou ainda sinais de hepatopatia crônica e hipertensão portal.

Identificada mutação no exon 3 do gene *TERT*:c.1610G>A (p.R537H) por meio de WES (NM_001193376). Esta mutação apresenta categoria de variante de significado indeterminado pela ACMG (critérios PM2, PP3).

A pesquisa da mutação do gene *TERT* foi positiva em dois dos três filhos do paciente testados. Os mesmos são assintomáticos e apresentam pesquisa de comprimento telomérico normal.

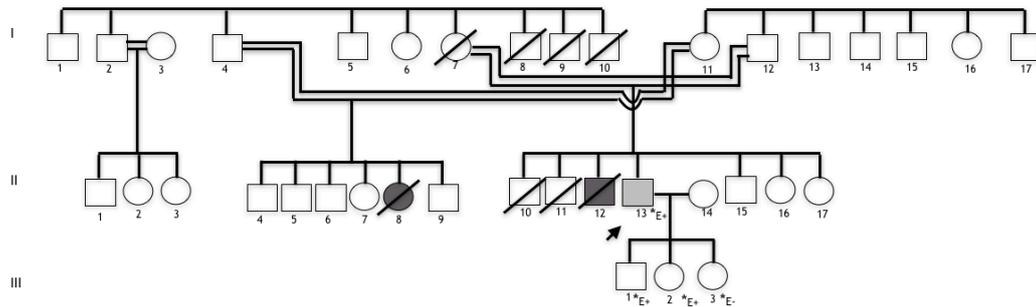


Figura 9 - Heredograma da família C. Símbolos brancos representam familiares não afetados, símbolos em cinza representam indivíduos com citopenia, símbolo preto representa paciente com diagnóstico de neoplasia hematológica. (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores, E+ indivíduos positivos para a mutação *TERT*:c.1610G>A.

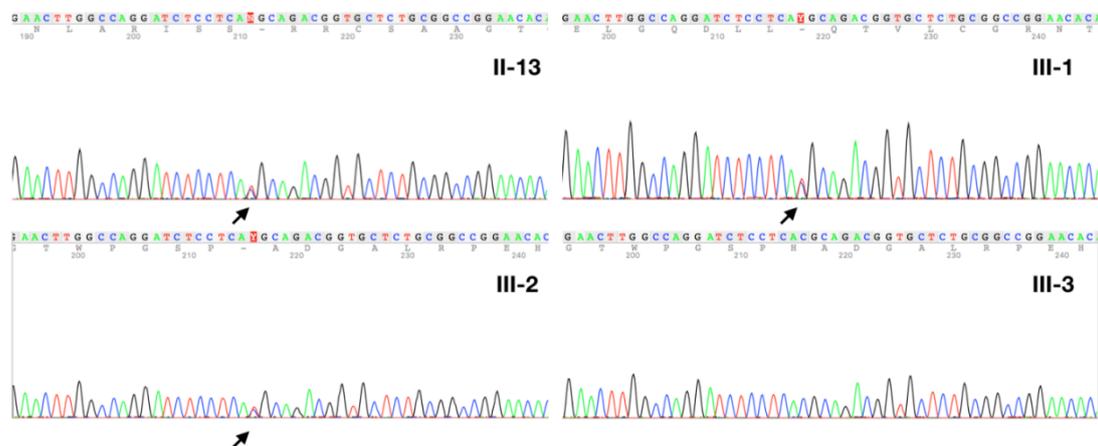


Figura 10 - Sequenciamento por técnica de Sanger da região do éxon 3 do gene *TERT* mostrando presença de mutação c. 1610G>A em heterozigose (seta preta). Sequenciamento realizado em sentido 3'-5' (fita reversa)

Paciente D

Paciente do sexo feminino, 36 anos, com história pessoal de leucemia mieloide aguda diagnosticada há 15 meses e em resposta parcial após quimioterapia de resgate de primeira recaída. Sem histórico familiar de neoplasia mieloide ou linfoide na família e com histórico familiar de plaquetopenia (pai, irmão e dois sobrinhos). Encaminhada ao ambulatório para investigação de plaquetopenia familiar associada à neoplasia mieloide.

Hemograma ao encaminhamento: Hb: 116 g/L VCM:103 fL Leucócitos: $3,13 \times 10^9/L$ Linfócitos: $1,2 \times 10^9/L$ Plaquetas: $29,5 \times 10^9/L$

Mielograma: normocelular com 8% de blastos mieloides

Cariótipo: 46,XX[6]

Teste de DEB: negativo para anemia de Fanconi.

Paciente já apresentava diagnóstico de mutação do gene *RUNX1* identificada por sequenciamento: *RUNX1*:c.320G>C (p.Arg107Pro). Foi realizada pesquisa de mutação nos familiares de primeiro grau e dois sobrinhos da paciente, que também se mostraram positivos para presença de mutação do gene *RUNX1* (Figura 11). A mutação encontrada é considerada provavelmente patogênica de acordo com critérios ACMG (PM1, PM2, PM5, PP3, PP2)

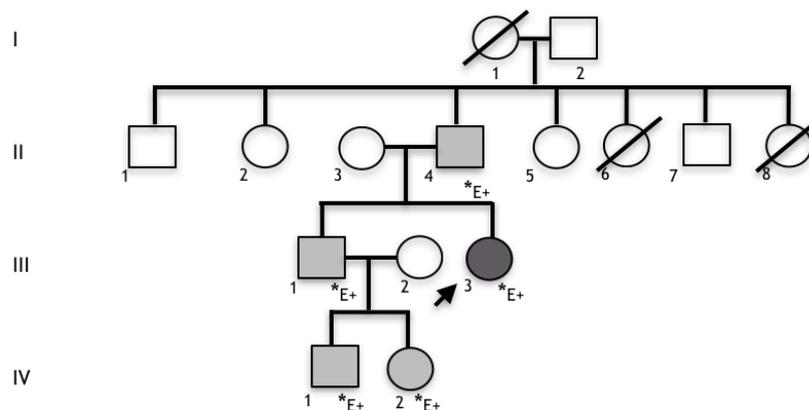


Figura 11 - Heredograma da família D. Símbolos brancos representam parentes não afetados; símbolos cinza-escuros representam indivíduos com neoplasias hematológicas; símbolos cinza-claros representam indivíduos com trombocitopenia, (*) representa indivíduos avaliados diretamente pelos pesquisadores; E representa a avaliação da mutação *RUNX1* c.320G>C p.Arg107Pro. E +: mutação c.320G>C detectada

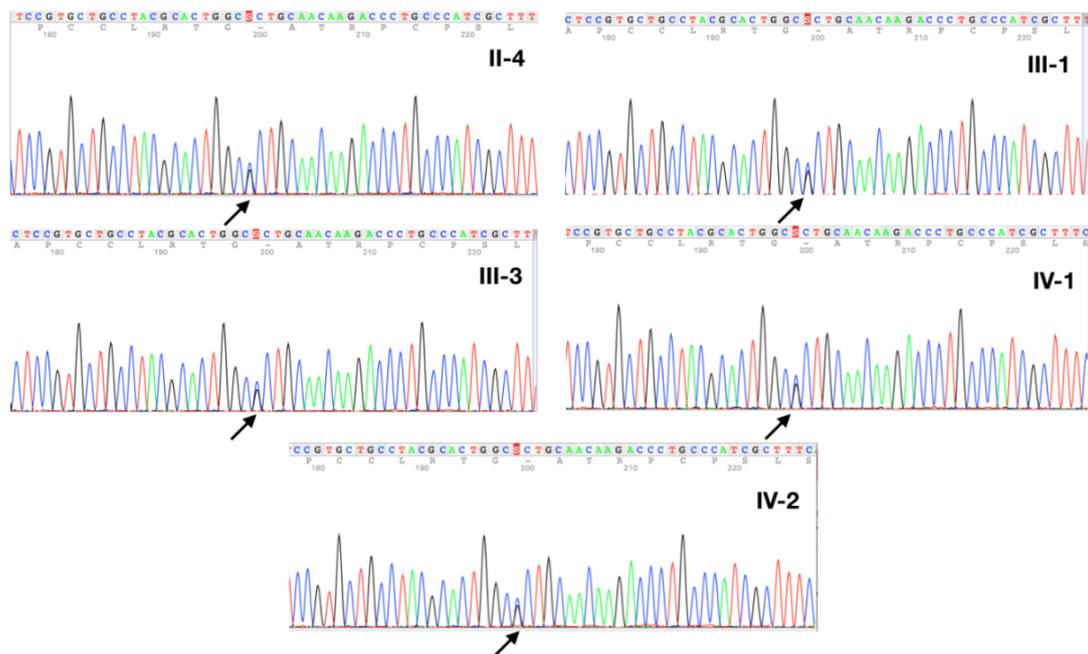


Figura 12 - Família D. Sequenciamento por técnica de Sanger de região do éxon 4 do gene *RUNX1* mostrando presença de mutação c. 320G>C em heterozigose (seta preta). Sequências numeradas de acordo com posição no heredograma

Paciente E

Paciente de 16 anos, sexo feminino, com diagnóstico de linfedema bilateral congênito e erisipela de repetição. Negava presença de verrugas ou infecção pulmonar. Há cerca de 1 ano evoluindo com pancitopenia e necessidade transfusional. Não apresentava histórico familiar de neoplasia hematológica nem consanguinidade.

Hemograma apresentava pancitopenia. Medula óssea era hipocelular (55% de celularidade) com reticulogênese grau 2 (OMS) e 7% de células CD34+. Cariótipo de medula óssea demonstrava evolução clonal, com monossomia 7 em todas as 13 metáfases analisadas. Sem doador aparentado, recebeu tratamento com hipometilante (azacitidina), porém faleceu por complicações infecciosas.

Sequenciamento do gene *GATA2* identificou deleção de 14 pares de base no éxon 3 (NM_032638). Mutação *GATA2*: c.630_643del; potencialmente causando *frameshift* e terminação precoce da proteína (p.Lys212ThrfsTer65). Esta mutação não foi descrita previamente e é classificada como provavelmente patogênica pelos critérios de ACMG (critérios PVS1, PM2). Pesquisa de genitores da paciente foi negativa, sugerindo mutação *de novo*.

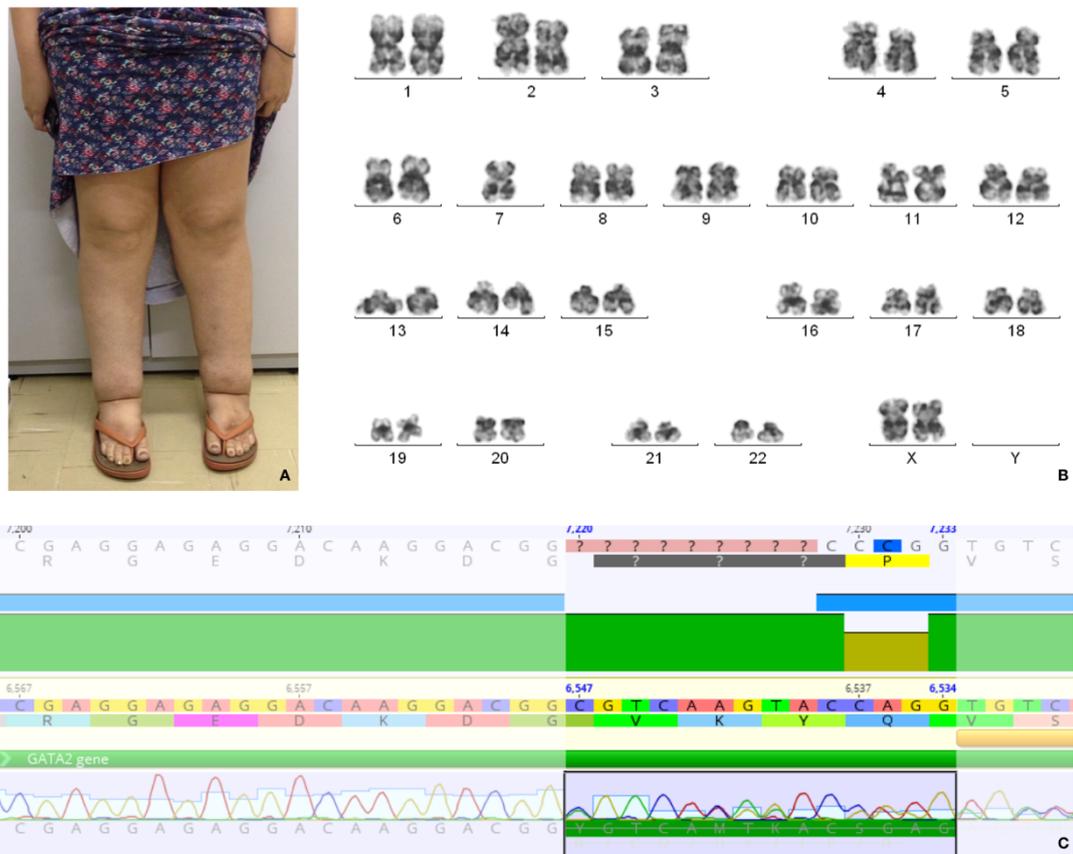


Figura 13 - Paciente E. A: Linfedema bilateral. B: Cariótipo de medula óssea com técnica de banda G mostrando monossomia do cromossomo 7. C: Sequenciamento por Sanger do éxon 3 mostrando deleção de 14 aminoácidos e frameshift de sequenciamento.

Paciente F

Paciente, 21 anos, sexo masculino em seguimento com imunologia com histórico de verrugas cutâneas desde os 3 anos de idade e infecções de repetição. Não apresentava linfedema. Teve infecções pulmonares de repetição e pneumocistose diagnosticada em 2015. Encaminhado ao ambulatório para investigação de plaquetopenia. Negava consanguinidade na família ou histórico de neoplasia hematológica e relatava tia paterna com diagnóstico de plaquetopenia.

Hemograma apresentava monocitopenia importante e plaquetopenia leve ($103 \times 10^9/L$). Biópsia de medula óssea revelou hipocelularidade (aproximadamente 30%) com predomínio de série eritroide e dismorfismo megacariocítico caracterizado por formas hipolobadas. Cariótipo de medula óssea mostrou evolução clonal com clone apresentando derivativo do cromossomo 1 e clone hiperdiploide apresentando duplicação do mesmo derivativo ($46,XY,der(21)t(1;21)(q12;p12)[12]/92,XXYY,der(21)t(1;21)(q12;p12)x2[4]/46,XY[4]$). Teste de fragilidade cromossômica do diepoxibutano foi negativo.

Paciente fez uso de imunoglobulina mensal, com hemograma estável apesar de evolução clonal. Teve o transplante de medula óssea contra-indicado por doença pulmonar grave e faleceu em razão de intercorrências infecciosas.

Sequenciamento do gene *GATA2* não identificou mutações. Em análise por WES, foi encontrada variante no éxon 2 c.15C>G, com alta prevalência populacional pelo gnomAD e considerada benigna quando utilizados critérios do ACMG (BA1, BP7, BP6). MLPA não identificou deleção do gene. Sequenciamento de “hotspot” de intron 4 (NM_032638), conforme descrito por Hsu⁽¹⁰⁵⁾ também não identificou mutação.

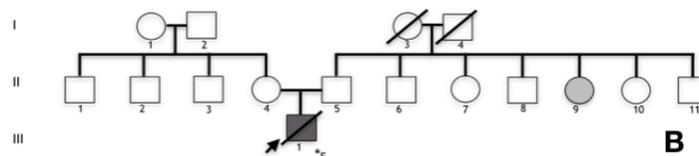


Figura 14 - Paciente F. A: Mão de paciente com verrugas e sequelas de crioterapia. B: Heredograma da família F, símbolo cinza-claro representam individuo com plaquetopenia, símbolo cinza-escuro representa paciente com suspeita de síndrome de deficiência de GATA2

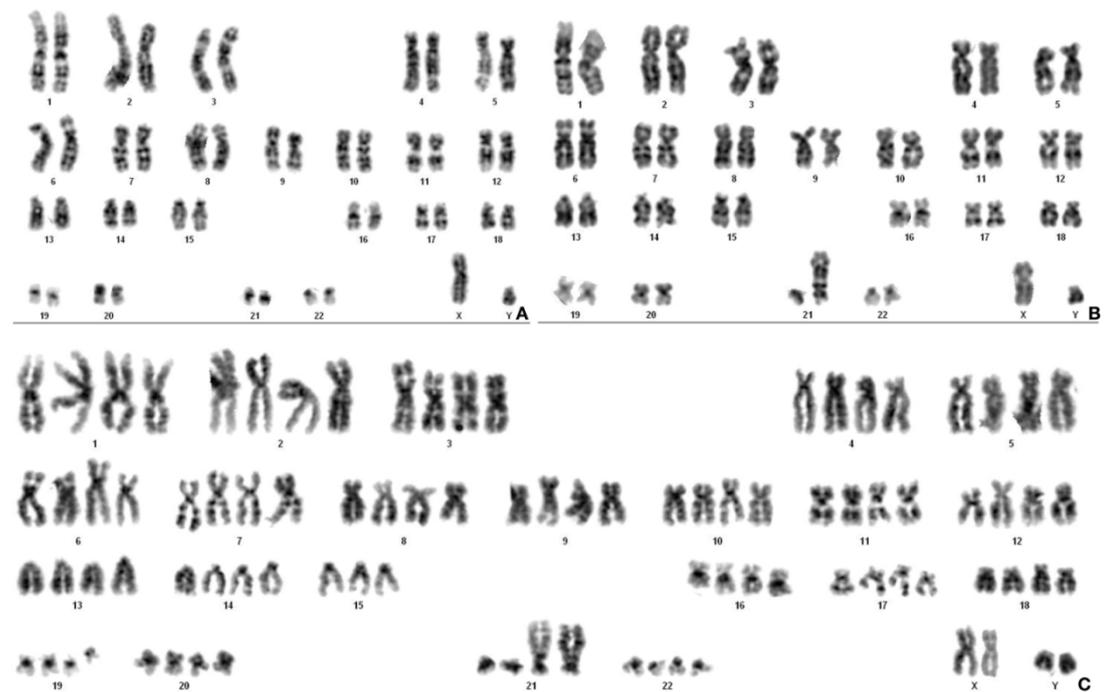


Figura 15 - Cariótipo de medula óssea do paciente F realizado em medula óssea com técnica de Banda G mostrando em A clone normal, em B clone com $\text{der}(21)\text{t}(1;21)(\text{q}12;\text{p}12)$ e em C clone hiperdiploide com duplicação do $\text{der}(21)\text{t}(1;21)(\text{q}12;\text{p}12)$

Paciente G

Paciente, 29 anos, de sexo feminino, com histórico de linfedema bilateral identificado aos 8 anos de idade, com surgimento de verrugas cutâneas aos 13. Iniciou seguimento com dermatologia devido à infecção cutânea de repetição e verrugas. Informava transfusão sanguínea esporádica desde os 17 anos. Não tinha histórico de infecção pulmonar de repetição. Negava pais com consanguinidade e histórico familiar de neoplasia hematológica, porém relatava tia paterna com diagnóstico de neoplasia de mama e avô materno com diagnóstico de neoplasia intestinal.

Hemograma revelava anemia normocítica com tendência à macrocitose (VCM: 98fL), com plaquetopenia ($80 \times 10^9/L$). Biópsia de medula óssea era hiper celular às custas da série granulocítica sem displasia. Cariótipo de medula óssea mostrou a presença de der(1;15), resultando em trissomia 1q e trissomia do 8 em todas as metáfases analisadas (47, XX,+1,der(1;15)(q10;q10),+ 8[20])

O sequenciamento inicial do gene *GATA2* não identificou mutações.

Realizado WES que identificou inserção *inframe* de sequência de 27 nucleotídeos no éxon 5, confirmada, posteriormente, por novo PCR pela técnica de Sanger: *GATA2*:1034_1035 insTCTTCTTGTGGCGGCTCTTCTGGCGGC p.A345delinsALLVAALLAA. Esta mutação não foi descrita previamente e conforme os critérios de ACMG (PM2 e PM4) é classificada como variante de significado incerto (VUS) e também foi identificada em sua mãe, que é assintomática, porém apresentava monocitopenia hemograma ($0,041 \times 10^9/L$).

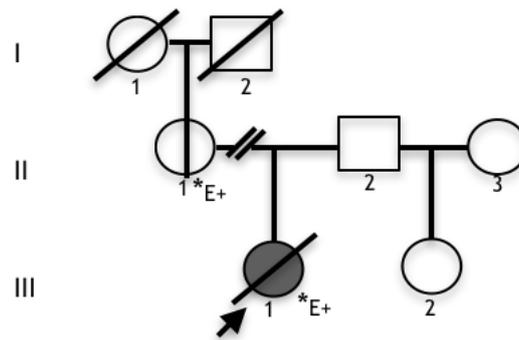


Figura 16 - Heredograma família G. Símbolo cinza escuro representa indivíduo com linfedema; símbolo cruzado por linha vertical representa indivíduo positivo para a mutação do gene *GATA2*, porém, sem linfedema ou fenótipo sugestivo. (*) representa indivíduo avaliado pelos investigadores. (E) representa indivíduo testado para mutação do gene *GATA2*, (+) representa teste positivo para a mutação.

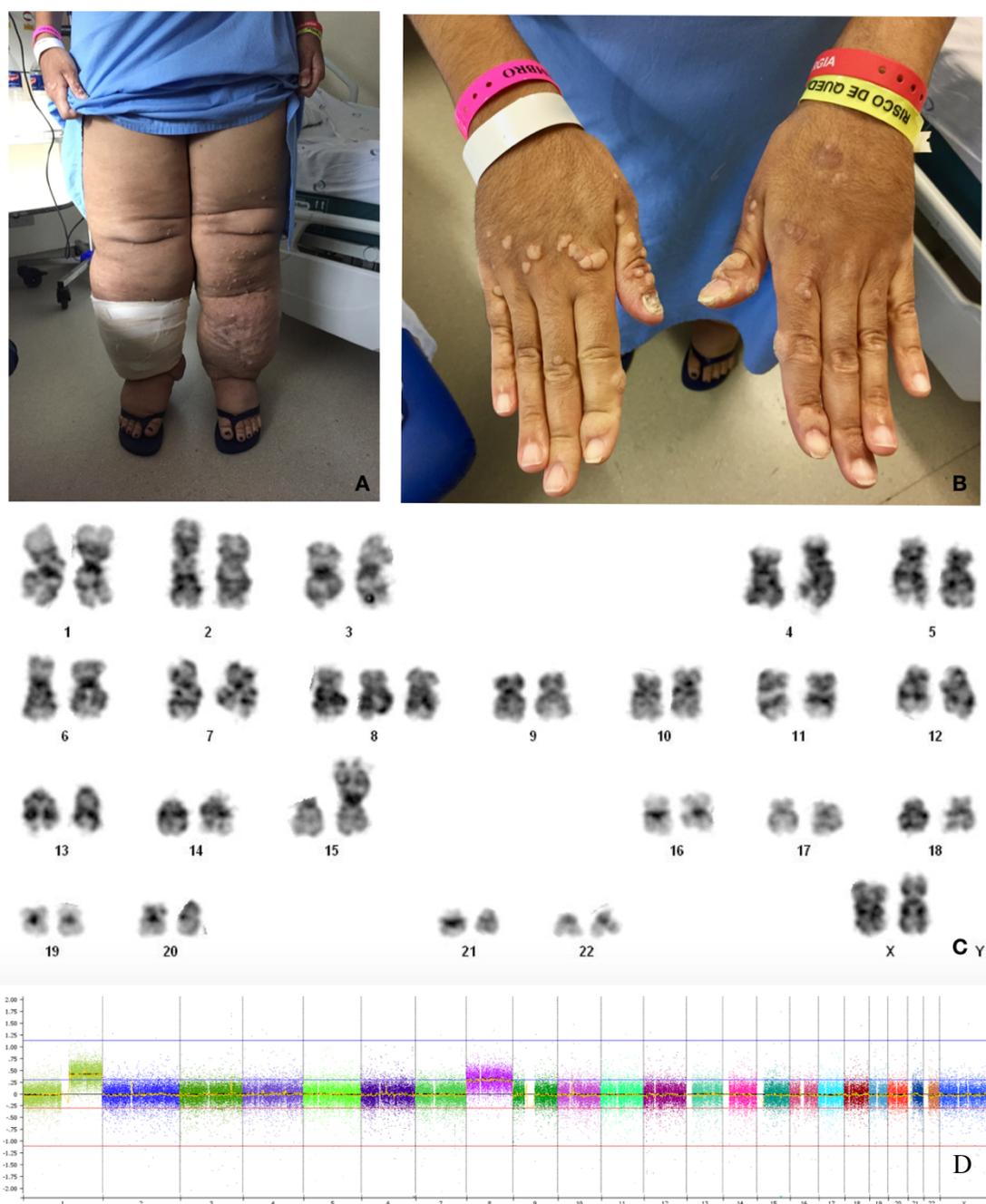


Figura 17 - Paciente G. A: Linfedema bilateral de membros inferiores, B: Verrugas em mãos, C: Cariótipo mostrando evolução clonal com der(1;15) e trissomia do cromossomo 8, achado confirmado por CGH array (D).

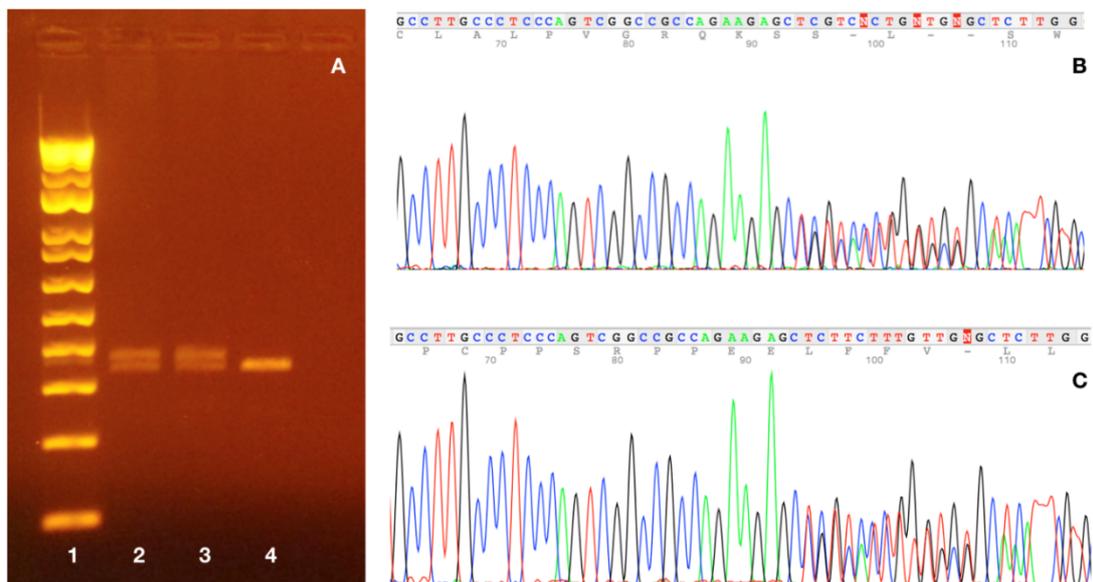


Figura 18 - Paciente G. A: Gel de agarose a 1,5% mostrando heterozigose em sequenciamento de éxon 5 do gene *GATA2* em paciente (2), sua mãe (3), escala e controle (1 e 4, respectivamente). B: sequenciamento por técnica de Sanger, mostrando *frameshift* de sequenciamento do éxon 5 na amostra de paciente F. C: sequenciamento de amostra de mãe de probando apresentando mesma inserção

Paciente H

Paciente, 19 anos, sexo feminino, com história de anemia macrocítica associada à edema bilateral de membros inferiores, desde os 3 meses de idade. Apresentou internação por infecção pulmonar e derrame pleural, sem evidência de infecção por bactéria atípica. Informou que avô e avó paternos eram primos. Negava histórico de neoplasia na família, porém prima de segundo grau paterna com anemia e necessidade transfusional, além de edema de membros inferiores. Pai com diagnóstico prévio de esferocitose hereditária não confirmada.

O hemograma mostrava Hb de 100g/L, VCM normal (92,5fL), sem neutropenia ou monocitopenia ($0,38 \times 10^9/L$). Medula óssea hiperclular, sem displasia e cariótipo de medula óssea normal.

O sequenciamento por Sanger não identificou variantes, assim como também não foram identificadas variantes do gene *GATA2* em WES da paciente. Realizado CGH-array com cobertura para o gene *GATA2* não sendo identificadas deleções. MLPA também não identificou deleção do gene *GATA2*.

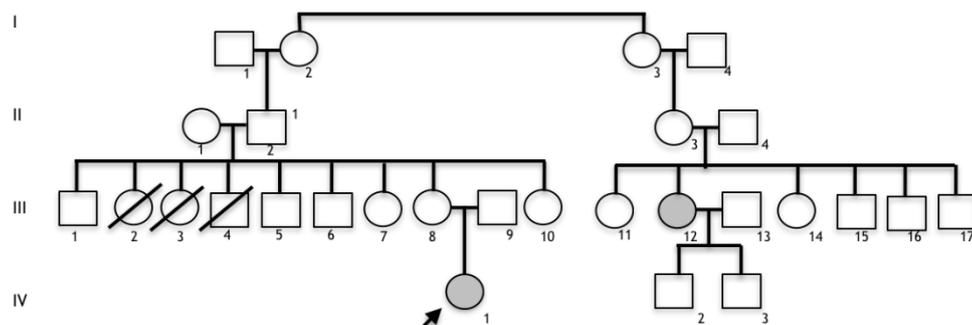


Figura 19 - Heredograma da família H. Símbolos brancos representam parentes não afetados, símbolos cinza representam indivíduos com suspeita de linfedema

Paciente I

Paciente, 29 anos, com histórico de linfedema unilateral em membro inferior esquerdo desde os 13 anos. Negava verrugas, mas relatava infecções de repetição desde os 10 anos de idade. Foi internado por estafilococemia aos 18 anos, aos 26 teve infecção por herpes vírus disseminado. Na ocasião, foi identificada monocitopenia. Em 2016, foi tratado por micobacteriose atípica. Submetido a TMO haploidêntico em 2017. Não tem histórico de consanguinidade na família, avô paterno faleceu em decorrência de linfoma aos 76 anos.

Exames hematológicos antes da realização de TMO alogênico demonstravam bicitopenia (anemia e plaquetopenia discretos), monocitopenia importante com medula óssea hipocelular com displasia megacariocítica e cariótipo normal (Tabela 8).

Sequenciamento do gene *GATA2* identificou mutação *GATA2:c. 708delG* que leva à *stop codon* precoce (p.Gly237AlafsTer89). Mutação provavelmente patogênica de acordo com os critérios ACMG (PVS1, PM2).

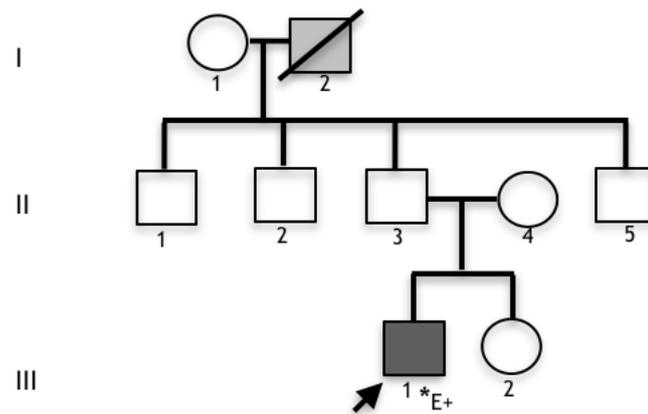


Figura 20 - Heredograma família I. Símbolo cinza-claro representa neoplasia hematológica. Símbolo cinza-escuro representa presença de linfedema

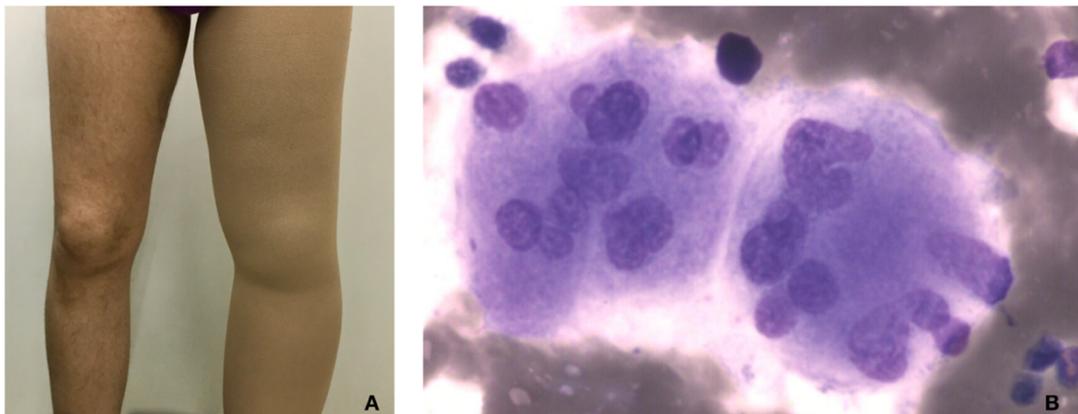


Figura 21 - Paciente I. A: Foto de membros inferiores do paciente I evidenciando linfedema de membro inferior esquerdo (paciente em uso de meia compressiva). B: displasia de megacariócitos caracterizada por elementos multinucleados

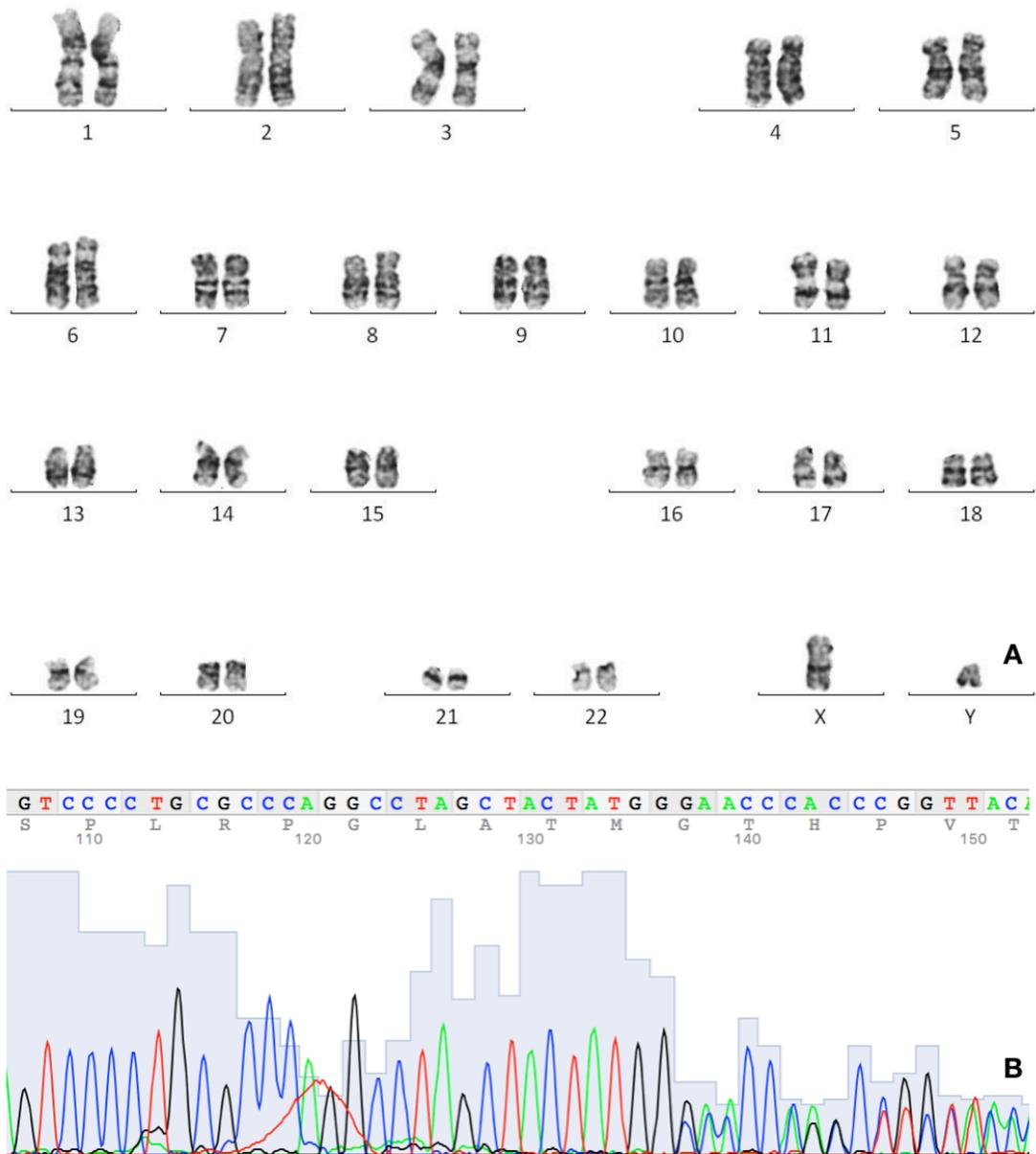


Figura 22 - Paciente I. A: Cariótipo de medula óssea masculino normal. B: sequenciamento por técnica de Sanger mostrando *frameshift* de sequenciamento do éxon 3 na amostra de paciente I

Paciente J

Paciente, 33 anos, sexo masculino, encaminhado pela imunologia ao ambulatório de hematologia com histórico de linfedema congênito em seguimento desde os 2 anos de idade com infecções cutâneas de repetição. Desde os 18 anos, apresenta condiloma acuminado gigante perineal que resultou em colectomia e colostomia há cerca de 3 anos. Não tem histórico de casamento consanguíneo, neoplasia familiar ou plaquetopenia. Suas duas irmãs são híginas.

Hemograma sem citopenias ou monocitopenia, DEB teste foi inconclusivo em duas amostras. Medula óssea apresentava-se hiperclular para a idade às custas das séries granulocítica e megacariocítica, sem aumento de células CD34+. O cariótipo não mostrou anormalidades clonais em oito metáfases.

Com suspeita de síndrome de deficiência de GATA2, foi realizado WES diretamente de amostra de sangue periférico. Foram encontradas cinco variantes de alta frequência na população (Tabela 8) com classificação pelo ACMG de, provavelmente benigna e benigna. MLPA realizado também não detectou deleções neste gene.



Figura 23 - Paciente J. A: Foto de membros inferiores do paciente evidenciando linfedema bilateral, mais proeminente à direita. B: Condiloma acuminado em nádega de paciente J

Paciente K

Paciente, 75 anos, feminina, encaminhada para primeira avaliação da hematologia aos 71 anos com anemia macrocítica e plaquetopenia. Fazia seguimento por lúpus eritematoso com apresentação exclusivamente cutânea, HAS e úlcera em membro inferior esquerdo em seguimento com cirurgia plástica. História familiar não apresentava histórico de neoplasia hematológica ou tumor sólido, mas apresentava filha com histórico de linfedema em dimídio esquerdo (membro superior e inferior).

Hemograma ao diagnóstico mostrava pancitopenia (Hb 96 g/L VCM: 106 fL Leucócitos $4,68 \times 10^9/L$ Neutrófilos $1,2 \times 10^9/L$ Linfócitos: $2,8 \times 10^9/L$ Monócitos $0,55 \times 10^9/L$ Plaquetas $43 \times 10^9/L$). Biópsia de medula óssea com 15% de celularidade, relação G/E preservada, hipocelularidade da série megacariocítica e reticulogênese grau 2. Cariótipo de medula óssea sem anormalidades clonais. Aos 76 anos foi realizada nova avaliação medular que não mostrou evolução citogenética clonal, havendo ganho de celularidade (45%) global, hipocelularidade importante de série megacariocítica, sem aumento de células CD34+. Probando faleceu aos 78 anos. WES identificou mutações de alta frequência populacional na região intrônica do gene GATA2 (vide Tabela 7).

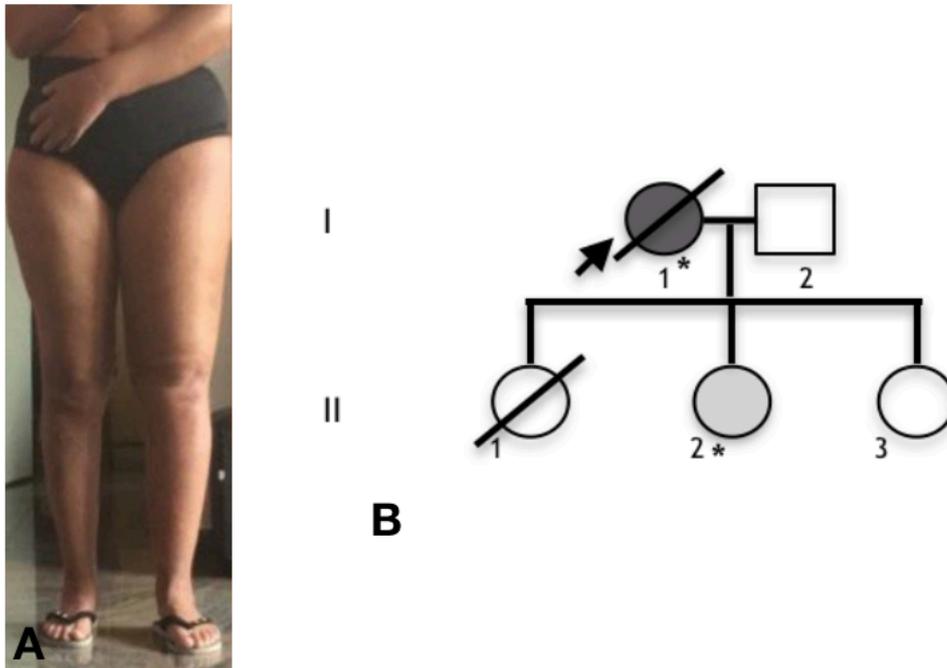


Figura 24 - Família K. A: Foto de indivíduo II-2 evidenciando linfedema em membro superior e inferior esquerdo. B: Heredograma de duas gerações, símbolo em cinza-escuro representa indivíduo acometido por síndrome mielodisplásica. Símbolo cinza-claro representa paciente com linfedema. (*) representa indivíduo diretamente avaliado pelos pesquisadores

Paciente L

Paciente, 40 anos, com diagnóstico de anemia aplástica não grave desde os 26 anos. Sem histórico transfusional, relatava diagnóstico quando iniciou avaliação para possível doador de células tronco-hematopoiéticas para seu irmão. Não apresentava pais consanguíneos, irmão foi diagnosticado com anemia aplástica grave aos 31 anos e submetido a TMO alogênico. Faleceu 5 anos após o transplante em razão de infarto agudo do miocárdio. Irmão fez seguimento na gastroenterologia por pancreatite aguda de repetição.

Paciente apresenta hipercolesterolemia familiar sem mutação identificada. Hemograma com Hb 109g/L VCM 87 fL leucócitos $4.21 \times 10^9/L$ neutrófilos $2.8 \times 10^9/L$ Linfócitos: $0.4 \times 10^9/L$ Plaquetas $62 \times 10^9/L$. Investigação medular revelou medula óssea hipocelular (15%) às custas das 3 séries, reticulogênese grau I (OMS). Teste de DEB negativo, pesquisa de mutação *JAK2* V617F negativa. Comprimento telomérico dentro da normalidade. Mantém hemograma estável desde então.

WES identificou mutação *DKC1* c.1477_1479del. Prevista como deleção *inframe*. Esta mutação apresenta baixa frequência alélica no gnomAD genomes (0.00096) e foi classificada como VUS pelo ACMG (critérios PM2, PM4). Mas, o sequenciamento por Sanger não confirmou a presença de mutação. Nenhuma outra mutação suspeita foi identificada

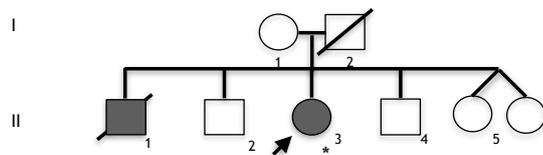


Figura 25 - Família L. Heredograma de duas gerações, símbolos em cinza-escuro representam indivíduos com insuficiência medular. (*) representa indivíduo diretamente avaliado pelos pesquisadores

Paciente M

Paciente, 33 anos, masculino encaminhado para investigação de anemia normocítica com necessidade transfusional iniciada há 2 meses. Negava comorbidades prévias. Relatava irmão também com anemia e necessidade transfusional em seguimento no ambulatório de citopenias e pai falecido aos 65 anos com diagnóstico de neoplasia gástrica. Exame físico sem dismorfismo, porém apresentava manchas café com leite (Figura 27). Mielograma com aspirado seco e biópsia de medula óssea hiper celular (90% de celularidade), reticulogênese grau III (OMS), com predomínio de série eritroide e displasia megacariocítica e eritroide (maturação presente), sem aumento de células CD34+ (<1%). Teste de DEB foi negativo para fragilidade cromossômica. Mantém seguimento há 4 anos, com necessidade transfusional mensal de duas unidades de concentrado de hemácias.

O irmão do probando havia iniciado seguimento no ambulatório 3 anos antes, com primeira consulta aos 32 anos por anemia também com necessidade transfusional e plaquetopenia leve (121 mil). Diagnóstico inicial de mielofibrose primária em razão da medula óssea hiper celular, às custas sobretudo da série granulocítica, com 100% de celularidade. Pesquisa de mutação *JAK2V617F* e calreticulina foram negativos e ausência de fusão gênica BCR-ABL1. Mantinha seguimento irregular e necessidade transfusional mensal de, pelo menos, duas unidades de concentrados de hemácias.

Foi realizado o sequenciamento de exoma completo, mutação no éxon 10 do gene BLM: c.2207_2212delATCTGAinsTAGATTC, classificada com patogênica de acordo com critérios ACMG (PVS1, PM1, PM2, PP3, PP5) e confirmada pela técnica de Sanger.

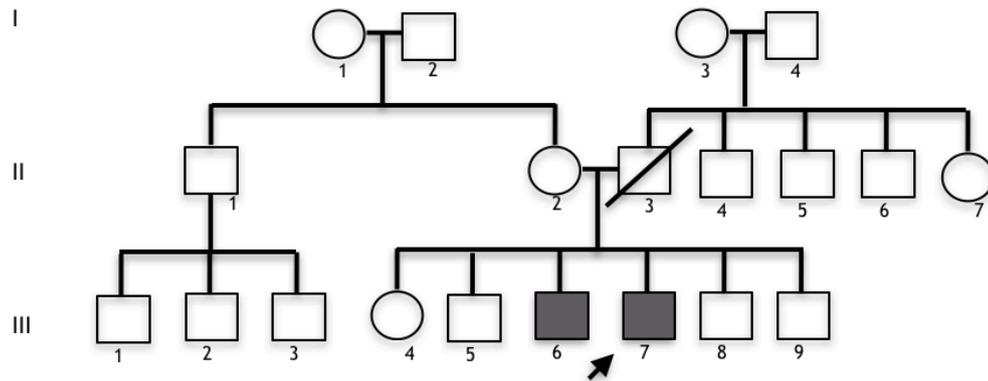


Figura 26 - Heredograma família M. Símbolos em cinza-escuro representam pacientes com anemia e alta necessidade transfusional e reticulogênese acentuada em medula óssea



Figura 27 - Manchas café com leite em probando da família M. A: joelho direito e B: antebraço direito

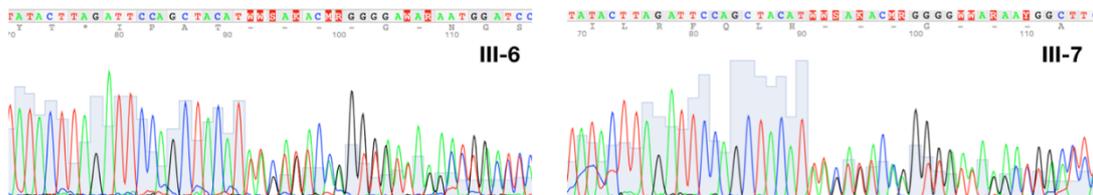


Figura 28 - Família M. sequenciamento por técnica de Sanger, mostrando *frameshift* de sequenciamento do éxon 10 do gene *BLM* na amostra dos pacientes III-6 e III-7

Paciente N

Paciente, sexo feminino, 18 anos, encaminhada do ambulatório de hematologia pediátrica ao ambulatório de hemostasia de pacientes adultos com diagnóstico de púrpura trombocitopênica imune crônica, sem necessidade de tratamento. Mãe relatava plaquetopenia desde 1 ano de idade e como fenômeno hemorrágico apenas aumento de fluxo menstrual e epistaxes esporádicas autolimitadas. Paciente também fazia seguimento no ambulatório de genética médica de outro serviço devido a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor sem diagnóstico. Paciente tinha duas irmãs híginas, pai falecido por consequência de trauma cranioencefálico e relato de tio paterno falecido no HC-FMUSP serviço aos 37 anos em decorrência de LLA pré-B com cariótipo complexo e segundo tio paterno com histórico de plaquetopenia (não foi possível confirmar informação). Ao exame físico, apresenta estatura normal, sem dismorfismo evidente. Em razão do histórico de neoplasia hematológica na família, foi transferida do ambulatório de hemostasia ao de citopenias para investigação. Hemograma revelou plaquetopenia leve ($109 \times 10^9/L$) sem outras citopenias, medula óssea normocelular e normomaturativo, cariótipo sem anormalidades clonais em 20 metáfases e biópsia mostrando hipocelularidade de medula óssea (40%) com presença de displasia megacariocítica com elementos pequenos, hipolobados ou mononucleados.

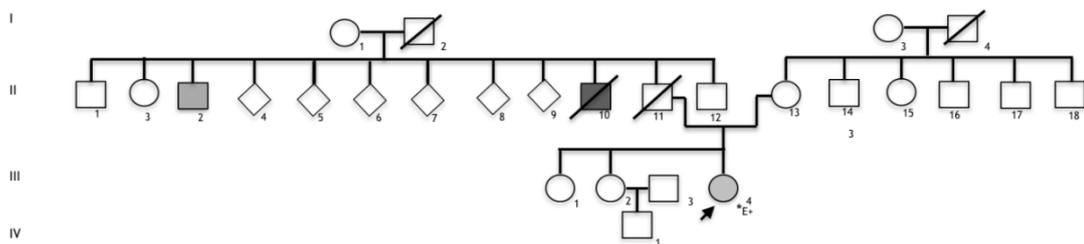


Figura 29 - Heredograma da família da paciente N. Símbolos escuros representam neoplasia hematológica, símbolos cinza-claro representam plaquetopenia; E representa indivíduo avaliado pelos examinadores, + representa deleção de 2.88 Mb em braço longo do cromossomo 22

Realizado WES, como primeira triagem em genes associados à plaquetopenia familiar e predisposição à neoplasia mieloide, sem achado suspeito de mutação patogênica. Realizado SNP-array que identificou deleção de 2.88 Mb no braço longo cromossomo 22 (arr[GRCh37]22q11.21 (18919477_21800471)x1).



Figura 30 - SNP array Cytoscan[®] 750k do probando da família N mostrando presença de deleção de 2.88 Mb no braço longo do cromossomo 22

Tabela 7 - Achados em exoma do gene *GATA2* em pacientes com fenótipo suspeito para síndrome de deficiência de *GATA2*

Paciente	Fenótipo	Variante	Proteína	Exon	Intron	ACMG	gnomAD*
F III-1	Verrugas e imunodeficiência	c.1143+128C>T	.	.	5	B	0,416
		c.1143+203A>G	.	.	5	B	0,67
		c.872-158C>A	.	.	3	B	0,576
		c.872-187T>C	.	.	3	B	0,595
		c.15C>G	P5= (p.Pro5=)	2	.	B	0,664
G II-1	Linfedema e verrugas	1034_1035insTCTTCTTGTGGCGGCTCTTCTGGCGGC	p.A345delinsALLVAALLAA	5	.	VUS	NR
		c.1018-19C>T posição 1897 of 1915	.	.	4	B	0,15
H IV-1	Linfedema? Infecção pulmonar	Nenhuma Variante
J	Linfedema e verrugas	c.872-158C>A	.	.	3	B	0,567
		c.*200C>T	.	.	6	LB	0,221
		c.1143+203A>G	.	.	5	B	0,676
		c.15C>G	P5= (p.Pro5=)	2	.	B	0,664
		c.1018-19C>T posição 1897 of 1915 (intrônico)	.	.	4	B	0,15
L	Linfedema	c.1018-19C>T intron 4 of 5 posição 1897 of 1915 (intrônico)	.	.	4	B	0,15
		c.872-187T>C intron 3 of 5 posição 1535 of 1721 (intrônico)	.	.	3	B	0,595
		c.15C>G	P5= (p.Pro5=)	2	.	B	0,664
		c.1233G>A	(p.Ala411=)	6	.	LB	0,021
K I-1	AA	c.1143+128C>T	.	.	5	B	0,416
		c.15C>G	P5= (p.Pro5=)	2	.	B	0,664
K II-2	Linfedema	c.1018-19C>T	.	.	4	B	0,15
		c.15C>G	P5= (p.Pro5=)	2	.	B	0,664
		c.872-158C>A 1564 of 1721 (intrônico)	.	.	3	B	0,576

*Frequência alélica na plataforma gnomAD

Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes suspeitos de mutação do gene *GATA2*

Paciente	Idade início de seguimento (anos)	Consanguinidade	História familiar de doença hematológica	História familiar de neoplasia	Retardo mental, baixa estatura ou estigma	Verrugas	Linfedema	Infecção	micobacteriose	Hb (g/L)	VCM (fL)	Leucócitos (x10 ⁹ /L)	Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	Linfócitos (x10 ⁹ /L)	Monócitos (x10 ⁹ /L)	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	Blastos em sangue periférico (%)	Mielograma	Blastos em medula óssea (%)	Celularidade Medula Óssea	Fibrose medular	CD34	Cariótipo/ FISH	ImunofenotipagemSP (Linf CD4/ LinT CD8 /LinfB/ LinNK cel/mm ³)	DEB/telomero	Mutação <i>GATA2</i>
E	15	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Erisipela de repetição	Não	71	81	2,12	0,636	0,763	0,382	36	6%	Hipocelularidade acentuada. Hemodiluição acentuada	3,6%	Hipocelular (30%)	MF2	<5%	45, XX, -7 [13]	NR	Negativo / NR	Presente
F	3	Não	Sim tia e primo paternos com plaquetopenia)	Não	Não	Sim	Não	Sim - pneumocistose	Sim	159	86,4	2,04	1,50	0,30	0	103	0	Hipocelular RGE: 0,6:1	0,4	Hipocelular (30%)	MF0	<1%	46, XY, der(21)(1:21)(q12;p12)[12]/ 92, XXYY, der(21)(1:21)(q12;p12)x2 [4]/46, XY[4]	33 /77 /1 /1	Sem metafases percentil 1%	Ausente
G II-1	29	Não	Mãe (anemia)	Sim Tia paterna (mãe) Avô materno (intestino)	Não	Sim	Sim	Sim - pele	Não	75	98	4,49	1,50	1,40	1,60	80	0	Normocelular RGE: 3,4:1 Ferro medular presente Diseritropoiese leve, megas multinucleados e monolobados .	1,2%	Hiperclular (80%)	MF0	<1%	47, XX, +1der(1;15)(q10;q10), + 8[20].	185/ 238/ 21/ 14	Negativo / percentil 1%	Presente
H IV-1	19	Sim	Sim (pai com estercocitose)	Sim Bisavô materno possível neo de pulmão	Não	Não	Sim	Sim - pneumonia com derrame	Não	100	92,5	9,37	6,50	2,100	0,600	176	0	Hiperclular, RGE: 1,6/1., ferro medular presente (++/4+)	0,8	Hiperclular (85%)	MF0	<1%	46,XX[20]	466 /301 /65/ 80	Negativo	Ausente

continua

Tabela 8 - Características clínicas dos pacientes suspeitos de mutação do gene *GATA2* (conclusão)

Paciente	Idade início de seguimento(anos)	Consanguinidade	História familiar de doença hematológica	História familiar de neoplasia	Retardo mental, baixa estatura ou estigma	Verrugas	Linfedema	Infecção	micobacteriose	Hb (g/L)	VCM (fL)	Leucocitos (x10 ⁹ /L)	Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	Linfócitos (x10 ⁹ /L)	Monócitos (x10 ⁹ /L)	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	Blastos em sangue periférico (%)	Mielograma	Blastos em medula óssea (%)	Celularidade Medula Óssea	Fibrose medular	CD34	Carótipo/ FISH	ImunofenotipagemSP (LinfT CD4/ LinfT CD8 /LinfB/ LinfNK cel/mm ³)	DEB/telomero	Mutação <i>GATA2</i>
I	29	Não	Sim (Avô paterno falecido com linfoma)	Sim Avô paterno Linfoma	Não	Não	Sim - unilateral	Sim- pele, pulmonar	Sim	105	96,4	2,58	2,00	0,539	0	104	0	normocelular, normomaturativa, com hipoplasia granulocítica, disgranulopoese e alteração morfológica dos megacariócitos.	0	Hipocelular (40%)	MF1	<1%	46,XY [20]	285 /319 / 34 /4	NR	Presente
KI-1	71	Nao	Não	Não	Não	N	Nao	Nao	Nao	113	106	3,65	1,06	2,14	0,2	14	0	Hipocelular ,avaliação prejudicada	0	Hiperclular (45%)	MF1	<1%	46,XX[20]	NR	NR	Ausente
J	33	Nao	Não	Não	Nao	Sim	Sim	Nao	Não	106	79,6	7,75	5,5	1,6	0,4	327	0	Normocelular 4% de linfócitos, sem displasia	0,8	Hiperclular (85%)	MF0	<1%	46,XY[8]	125 / 164 /162 /162	Duvidoso	Ausente

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Dos 17 pacientes, em 14 famílias não relacionadas, foi possível determinar gene associado ao fenótipo em sete famílias e genes suspeitos em duas famílias, totalizando nove (64%) das famílias. Esta taxa é mais alta em relação à descrita na literatura (variação entre 11% e 48%)^{11, 13-15, 106-108}, o que, provavelmente, seja decorrente da seleção de pacientes com fenótipos altamente suspeitos e referenciamento dos pacientes. A maioria dos estudos em busca de mutações gênicas em predisposição germinativa ocorre em populações de crianças e adultos jovens. Em estudo avaliando 59 pacientes de 17 famílias com, pelo menos, dois casos de doença hematológica (insuficiência medular, SMD ou LMA); mutação genética patogênica foi identificada em cinco famílias (29%)¹⁰⁸. Outro levantamento da Universidade de Chicago em casos adultos e pediátricos encaminhados ao laboratório de genética clínica para pesquisa de predisposição à SMD/LMA, usando painel de Next Generation Sequencing em um período de 21 meses, apresentou taxa de identificação molecular de, aproximadamente, 19%¹³. A mais alta taxa de identificação de genes patogênicos é de grupo francês ao analisar 179 pacientes de 173 famílias com insuficiência medular com identificação de gene causal ou provavelmente causal em 48% dos casos¹⁰⁹.

A maior atenção aos casos suspeitos de propensão germinativa teve claro impacto no número de famílias incluídas no estudo. Ao iniciar este projeto, em 2015, havia sido identificadas apenas três famílias suspeitas. Ao se concluir a inclusão de pacientes em 2018, este número passou para 21 famílias (anemia de Fanconi foi excluída), das quais 14 consentiram participar. A inclusão da categoria neoplasia mieloide com predisposição germinativa em 2016 pela Organização Mundial de Saúde⁷ também contribuiu para maior visibilidade destes casos aumentando os encaminhamentos para avaliação.

Entre casos cujo fenótipo era compatível com plaquetopenia familiar com, pelo menos, um caso de neoplasia hematológica na família (cinco famílias), mutações do gene *RUNXI* foram associadas ao fenótipo em duas (família A e família D), firmando diagnóstico pela OMS de plaquetopenia familiar e predisposição à neoplasia mieloide associada ao gene *RUNXI*.

O *RUNXI* é um fator de transcrição essencial nos estágios embrionários da hematopoiese para formação da célula tronco-hematopoiética e na hematopoiese adulta participam da maturação dos megacariócitos, linfócitos B e T. Nesta fase, sua ausência compromete a expansão das células progenitoras hematopoiéticas provavelmente, em razão do bloqueio de maturação^{36,110}. O *RUNXI* é composto por dois domínios principais: o domínio RUNT e o de transativação, a maioria das mutações descritas estão presentes nestes dois domínios³⁹. Com exceção de uma translocação *de novo*, envolvendo o intron 1¹¹¹, todas as deleções descritas até o momento envolvem porções maiores do gene^{22,41,112} ou comprometem o éxon 5¹¹³. A família A é o primeiro caso publicado⁴⁶, cuja microdeleção de 163 kb proximal ao domínio RUNT envolve apenas os éxons 1 e 2 e está associado ao fenótipo clássico de plaquetopenia familiar associado à neoplasia mieloide.

As neoplasias mieloides (leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas) são a apresentação mais habitual, seguida de leucemia linfóide aguda T (as duas neoplasias hematológicas são presentes na família A). Entre os nove casos descritos com diagnóstico de leucemia linfoblástica T/linfoma linfoblástico T publicados^{41,45,114-116}, quase a metade (4/9) apresentou subsequente evolução para leucemia mieloide aguda, como observado no paciente AIII-6.

Do ponto de vista clínico, esta família chama a atenção pelo fato das crianças (AIV-2 e AIV-5) portadoras da deleção não apresentarem plaquetopenia, fenômeno também já descrito previamente^{38,45,47}, pela aparente boa resposta às terapias de indução a que foram submetidas no diagnóstico de neoplasia hematológica com remissão de duração de, pelo menos, 15 anos para o paciente AIII-2 e, aproximadamente, 9 anos para o paciente AIII-6 e pela dificuldade de classificação das alterações morfológicas de medula óssea.

A adequada classificação das alterações medulares dos portadores com suspeita de plaquetopenia familiar com predisposição ao desenvolvimento de

neoplasias mieloides (FPD/MN) é um desafio. A presença de displasia unilinhagem de série megacariocítica não parece ser uma boa definidora de evolução para a síndrome mielodisplásica neste grupo de pacientes^{22,117}. A mesma estava presente nos três casos da família A com avaliação medular, mesmo no paciente AIII-10, com história apenas de plaquetopenia leve. Os casos do pedigree A com histórico de neoplasia apresentavam celularidade aumentada na medula (Figura 31) em concordância com os achados de Kanagal-Shamanna que identificaram uma maior proporção de pacientes com medula óssea hiper celular nos portadores de mutação que desenvolveram neoplasia mieloide.

Mutações adicionais são consideradas importantes na progressão dos pacientes portadores de FPD/MN para neoplasia hematológica, mais de 80% dos pacientes portadores do gene *RUNX1* acima de 50 anos desenvolvem evolução clonal¹⁰⁸. Embora não tenha sido identificada anormalidade citogenética em cariótipo convencional, a presença de deleção de porção de braço longo do cromossomo 12 no caso AIII-2 não identificado em mucosa oral, sugeria evolução clonal, assim como a presença de mutação do gene *PHF6* em seqüenciamento de exoma. No paciente AIII-6, a presença de evolução clonal molecular com mutações somáticas do gene *MLL*, *BCOR* e *TET2* parece compatível com evolução clínica mais agressiva, e nos outros quatro portadores da microdeleção do *RUNX1* com plaquetopenia leve ou assintomática não foi evidenciada evolução clonal. Revisão sistemática realizada por Duarte et al¹¹⁸ revelou que as mutações somáticas adicionais nos genes *RUNX1*, *TET2*, *BCOR*, *PHF6* foram os eventos clonais mais frequentes identificados em pacientes com FPD/MN que desenvolveram neoplasia mieloide.

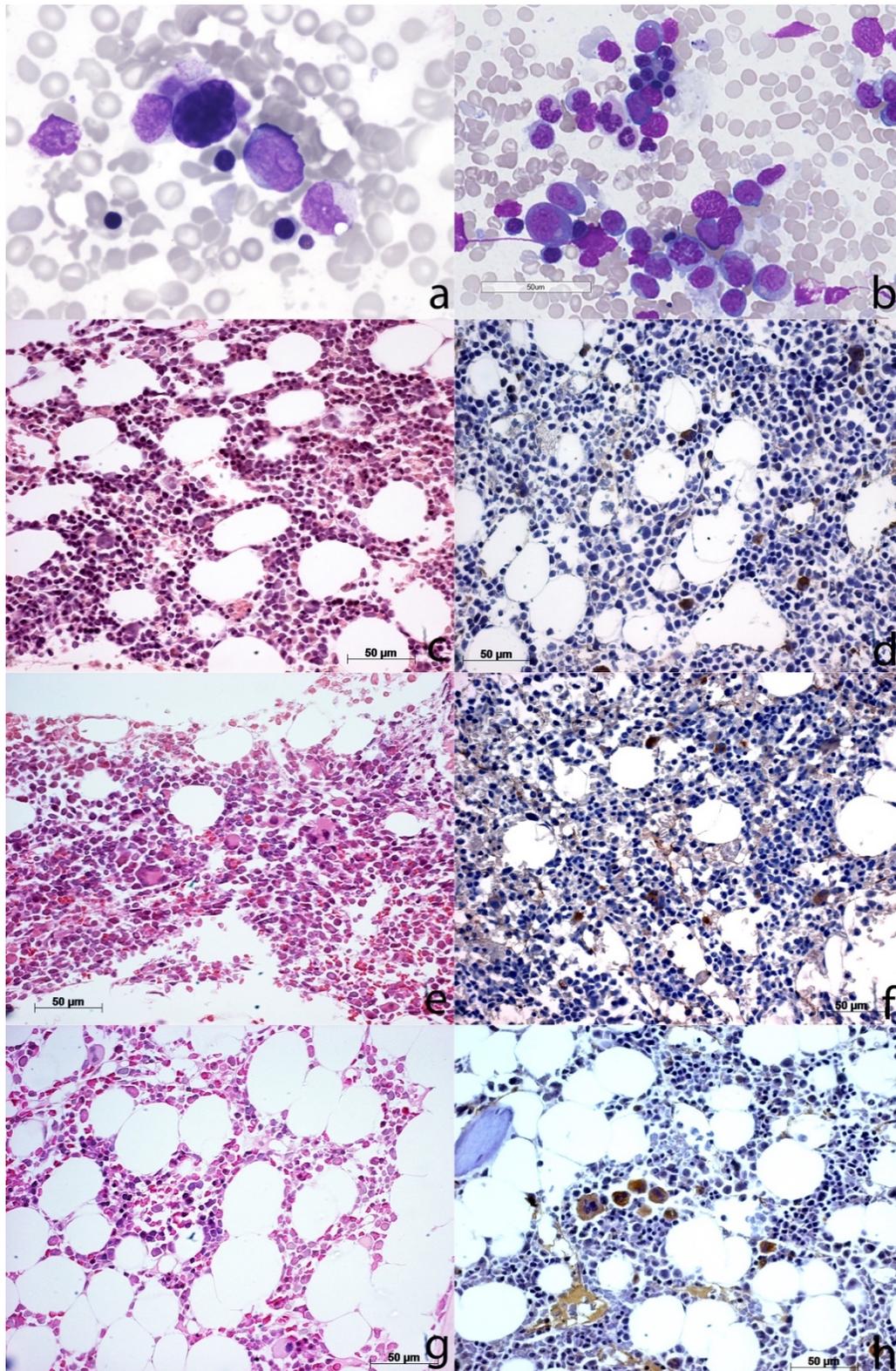


Figura 31 - Imagens de biópsia de medula óssea e mielograma dos pacientes III-2, III-6 e III-10 da família A. A: aspirado de medula óssea do probando III-2 mostrando mieloblasto e micromegacariócito (May-Grunwald-Giemsa x 1.000). B: Aspirado de medula óssea do paciente III-6 mostra blastos mieloides, ninhos de eritroblastos, figura de mitose e disgranulopoiese (May-Grunwald-Giemsa x 500) C, E e G:

biópsias dos pacientes III-2, III-6, e III-10 respectivamente, mostrando megacariócitos pequenos e hipolobados (Hematoxilina-eosina x 400). D, F e H: Imuno-histoquímica para o fator VIII dos pacientes III-2, III-6, III-10 respectivamente. Também é possível perceber uma menor celularidade na biópsia do paciente III-10 (sem histórico de neoplasia hematológica) em relação aos irmãos III-2 e III-6.

As duas famílias deste estudo identificadas com diagnóstico de FPD/MN apresentam algumas características clínicas distintas que merecem atenção e são ilustrativas da heterogeneidade de apresentação. O probando da família D foi o primeiro caso de neoplasia hematológica na família aos 35 anos e seu pai também portador da mutação RUNX1: c. 320G>C p.Arg107Pro, aos 68 anos apresenta apenas plaquetopenia moderada. Este caso exemplifica a idade variada de apresentação de neoplasia hematológica nesta entidade, que varia na literatura entre 6 e 72 anos^{37,40,42}. Não há descrição de FPD/MN associada a esta mutação, porém a mesma foi descrita como mutação somática patogênica em um caso de citopenia refratária com displasia multilineagem¹¹⁹ e apresenta classificação, provavelmente, patogênica quando os critérios ACMG são utilizados (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3).

Ao contrário do visto na família A, houve recaída de LMA com, aproximadamente, 12 meses do diagnóstico no probando da família D. Acredita-se que a heterogeneidade de apresentação possa ser decorrente não só da heterogeneidade das mutações encontradas (são raros casos de mesma mutação em famílias diferentes) como também de evolução clonal. Por exemplo, é possível que mutações que causem truncamento com perda de função da proteína e têm efeito dominante negativo, possam ter maior potencial para malignidade, decorrente da perda do efeito inibitório do domínio de transativação da proteína, mas ainda não é observada correlação fenótipo – genótipo consistente⁴⁵. Diferente do esperado, contudo, o probando da família D não apresenta nem mutação ocasionando *frameshift* de leitura, nem evolução clonal identificada, reforçando que os caminhos que levam ao desenvolvimento de neoplasia mieloide em doença que apresenta, aproximadamente, 40% de penetrância ainda não estão bem elucidados.

A trombocitopenia 2 faz parte das predisposições germinativas à neoplasia mieloide associada que cursam com plaquetopenia e tem associação com mutações

do gene *ANKRD26*⁷. Em 2011, sua associação com casos de plaquetopenia familiar¹²⁰ e a maior incidência de neoplasia hematológica⁵⁴ foram identificadas. O gene *ANKRD26* é expresso em diversos tecidos, em particular, em cérebro, testículo e pele¹²¹. No tecido hematopoiético, sua expressão é elevada em células CD34+ e vai decrescendo durante a maturação dos megacariócitos. O mecanismo pelo qual as mutações na região de 5'UTR levam à plaquetopenia não está completamente elucidado, mas, ao contrário de outros genes, nos quais se identifica haploinsuficiência ou perda de função, no caso de mutações *ANKRD26* o gene mantém a expressão elevada em megacariócitos^{120,122}, provavelmente pela incapacidade dos fatores de transcrição *RUNX1* e *FLP1* inibirem sua transcrição. Seu acúmulo leva à hiperativação da via ERK1/2 contribuindo para a plaquetopenia¹²². A família B apresenta mutação previamente descrita, em pelo menos, oito famílias¹²³, justificando o fenótipo de plaquetopenia moderada sem eventos hemorrágicos importantes. Em estudo analisando 222 portadores de mutação *ANKRD26*, 8,4% dos casos apresentavam diagnóstico de neoplasia mieloide (LMA, SMD, LMC)¹²³. Isto é compatível com a presença de apenas um caso de SMD com evolução para leucemia aguda e oito pacientes com plaquetopenia (supondo que todos sejam portadores de mutação), ou seja, 12,5% do total de potenciais portadores de mutação. Esta é uma incidência bem menor do que a vista em pacientes portadores de mutações germinativas do gene *RUNX1*. A presença de evolução clonal com mutações nos genes *RUNX1*, *TET2*, *FLT3*, *CBL* e *CUX1*, ausente nos demais pacientes testados desta família para evolução clonal, pode explicar a evolução desfavorável da paciente II-12.

Diferenciar trombocitopenias familiares com plaquetas de tamanho normal, apenas do ponto de vista clínico, não é possível, dado que, além das mutações nos genes *ANKRD26* e *RUNX1*, mutações em *ETV6* também fazem parte deste grupo de doenças definidos na classificação da OMS e apresentam-se como plaquetopenia de tamanho normal com sangramento leve a moderado^{7,19}. Diferenças entre penetrância e risco de desenvolvimento de neoplasia mieloide fazem com que o aconselhamento genético adequado seja possível apenas com as informações moleculares.

A sobreposição dos fenótipos é um desafio diagnóstico. O Paciente C, com histórico pessoal de plaquetopenia e familiar de leucemia, não apresentou mutações nos genes suspeitos para o fenótipo de plaquetopenia familiar em análise por exoma, nem deleção do gene *RUNXI* no MLPA, porém demonstrou mutação heterozigótica rara no gene *TERT*, classificada, como VUS pelos critérios do ACMG. O paciente apresenta telômero reduzido entre os percentis 1% e 10% do esperado para a idade, o que nos fez suspeitar que se poderia estar diante de um caso de disqueratose congênita (telomeropatia) críptica. Os casos de disqueratose congênita associados a mutações do *TERT* e *TERC* têm características clínicas menos proeminentes com risco de confusão com anemia aplástica adquirida e, na maioria das vezes, o diagnóstico é feito na fase adulta ⁷⁵. O risco de LMA chega a ser 196 vezes maior neste grupo de pacientes do que o esperado na população ¹²⁴. A investigação do paciente prosseguiu e apontou a presença de sinais de hepatopatia crônica e hipertensão portal ao exame de imagem, corroborando nossa suspeita do potencial patogênico desta VUS ser rara com frequência alélica menor (MAF) de 0,00000407 na plataforma gnomAD exomes ^{104, 125}. Dúvidas persistem no caso deste paciente: não foi possível caracterizar melhor as leucemias dos irmãos falecidos em razão da escassez de informações e registros médicos (os familiares moram no interior da Piauí e a família tem dificuldade de conversar sobre a morte dos filhos/irmãos), seus filhos portadores de mutação apresentam comprimento telomérico normal, as informações na literatura são conflitantes em relação à presença de redução do comprimento telomérico nos familiares assintomáticos e sua capacidade de identificar os portadores de mutação ^{126, 127}.

Por fim, nos parece que plaquetopenias, que cursam com retardo do desenvolvimento neuropsicomotor ou dismorfismos e histórico pessoal ou familiar de neoplasia hematológica, devam ser analisadas de forma independente com atenção redobrada para a perda de material genético. Um bom exemplo disso é o observado no caso da paciente N. Com histórico de retardo de desenvolvimento neuropsicomotor e familiar de segundo grau, falecido com diagnóstico de leucemia linfóide aguda, a hipótese inicial era de que poderia ser um caso de predisposição germinativa com perda de porção do gene *RUNXI*. Existem casos descritos na literatura de deleções do gene *RUNXI*, que tendem a ser *de novo*, associadas a

dismorfismo e/ou retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, provavelmente, pela deleção de genes adjacentes ao *RUNXI* ^{44,45,128}. A análise do WES não evidenciou mutação suspeita nos genes associados à plaquetopenia familiar e neoplasia mieloide, a deleção do gene *RUNXI* foi descartada por MLPA e com uso de SNP array foi possível identificar deleção 22q11.2. A síndrome de deleção 22q11.2 (22q11.2DS) é a microdeleção cromossômica mais comum, acometendo 1 a cada 3.000 a 6.000 nascidos vivos. Tem apresentação clínica variável e engloba a tríade clássica conhecida como síndrome de DiGeorge (aplasia tímica, hipoparatiroidismo e cardiopatia congênita), porém o termo Síndrome Di George ficou reservado aos pacientes que têm fenótipo compatível, mas onde não foi identificado a deleção 22q11.2 ¹²⁹.

A maioria dos casos apresenta-se como mutações *de novo* com uma predominância de origem materna ¹³⁰. Estudo analisando 30 casos de mutação herdada e identificada, após diagnóstico de familiar portador da mutação, mostrou fenótipo mais brando com menor incidência de alterações que chamariam atenção médica e não parece haver correlação entre o tamanho da deleção e o fenótipo ¹³¹.

Em nosso caso, não se conseguiu identificar se mutação era *de novo* ou não, uma vez que o material genético do pai e mãe não se encontrava disponível para análise. Há um aumento de incidência de plaquetopenia identificado nos portadores de 22q.11.2DS associado ao fenômeno que se acredita ser secundário à deleção do gene *GPIBB*, codificador da glicoproteína 1Bbeta que faz parte integral do receptor GPIb-IX-V. Em homozigose, alterações deste gene podem levar à síndrome de Bernard Soulier, porém existe outra entidade denominada macrotrombocitopenia autossômica dominante que cursa com macroplaquetas, diminuição da contagem plaquetária e risco aumentado de sangramento ¹³². Quanto à incidência de neoplasia, parece ser maior que a da população em geral ¹³² e, especialmente, maior nos casos de deleção distal do 22q11.2. ^{133,134} É importante notar que a paciente não apresenta a forma distal da deleção do gene.

A associação de mutações do gene *GATA2* com quadros de monocitopenia, infecções atípicas, imunodeficiência, síndrome mielodisplásica e leucemia foi descrita em 2011 por grupos independentes ^{58,135,136}. Desde então, múltiplas famílias foram relatadas com, pelo menos, 223 casos descritos ^{57,61,137,138}, fazendo com que

esta seja uma das predisposições germinativas mais estudadas. Ao mesmo tempo, a heterogeneidade na apresentação torna desafiador o manejo destes pacientes.

Em nossa série de casos, pacientes suspeitos de predisposição germinativa à neoplasia mielóide associada à mutação do gene *GATA2* constituíram o maior grupo fenotípico. Provavelmente, isto tenha decorrido da fácil identificação de sinais associados à síndrome (em particular, o linfedema e verrugas) mas também porque parece ser uma das propensões germinativas mais comuns, correspondendo entre 7% e 15% das crianças e adolescentes com SMD, 72% dos casos com monossomia 7 em crianças⁶¹ e ainda o terceiro maior número de casos em coorte de insuficiência medular, correspondendo a 3,9% dos 179 casos estudados, ficando atrás apenas dos genes *SAMD9L* (5,6%) e *TERC* (5,0%)¹⁰⁹. O motivo de encaminhamento e a origem dos pacientes foi variável, dentre eles, a imunologia e dermatologia por infecções por HPV de difícil controle ou pela própria hematologia por diagnóstico de insuficiência medular e suspeita de aplasia. Curiosamente, nenhum caso de linfedema congênito foi encaminhado pelo grupo de cirurgia vascular, apesar de linfedema pessoal ou familiar ser a característica mais encontrada neste grupo de pacientes (6/7), estando ausente apenas em um caso.

A confirmação molecular de suspeita clínica só ocorreu em 42% (3/7) dos casos. Dos pacientes onde não foi identificada mutação suspeita no gene *GATA2*, dois apresentavam infecção de difícil controle por HPV, destes, um era portador de linfedema e o segundo tinha histórico de micobacteriose atípica identificada por biópsia, além de evolução clonal em medula óssea com trissomia 1q (G e F, respectivamente). Os outros dois pacientes investigados apresentavam fenótipo menos característico, como no caso H, onde o linfedema era questionável e o quadro pulmonar inespecífico e no caso K, uma senhora de 75 anos que apresentava anemia aplástica e sua filha linfedema sem outros comemorativos.

Em estudo investigando pacientes com fenótipos compatíveis com a síndrome Monomac, que não apresentavam mutações previamente descritas, foi possível identificar mutação do intron 4 (NM_32638.5) ou intron 5 (NM_001145661.1) em cinco dos 22 casos e ainda ficaram sem explicação ainda dois casos (9%). Mesmo com extensa investigação, uso de MLPA para avaliação de deleção do gene *GATA2* e

investigação de “hotspot” no intron 4, até o momento não foi encontrada explicação molecular para o fenótipo dos pacientes F e J.

Dentre os três pacientes com mutação do gene *GATA2* identificados, todos apresentavam linfedema, contrapondo-se à frequência descrita na literatura, variando entre 15% e 39%^{61,137}. Dois (E e I) apresentavam mutações *de novo*, uma vez que não foi verificada mutação na investigação dos pais. Do ponto de vista hematológico, a evolução é claramente distinta na paciente E, que apresentava medula óssea hipocelular, pancitopenia com alta necessidade transfusional e monossomia 7 e idade de início de seguimento com hematologia menor (16 anos). Enquanto os pacientes G e I apresentavam citopenias sem necessidade transfusional e um histórico florido de infecções de repetição.

A síndrome de deficiência do *GATA2* tem apresentação clínica heterogênea bem reconhecida e, até o momento, não foi possível fazer uma correlação genótipo/fenótipo, com exceção de um risco aumentado de leucemia nos pacientes que apresentavam mutação missense, quando comparados aos portadores de mutação do tipo *frameshift* ou *nonsense*¹³⁷. Nos pacientes E e J a mutação *de novo* no éxon 3 causa *frameshift* de leitura e *stop códon* precoce, porém, do ponto de vista hematológico apresentaram evoluções clínicas bem distintas: a primeira, evoluindo com insuficiência medular grave com medula hipocelular excesso de blastos e monossomia 7, citopenias e infecções sistêmicas após evolução para neutropenia grave; a segunda, apresentando infecções recorrentes, sem necessidade transfusional ou citopenias graves com exceção de monocitopenia.

Por sua vez, a paciente G apresentava inserção de 27 nucleotídeos no éxon 5 proximal à região ZF2 (Zinc Finger 2), tinha imunodeficiência e complicações infecciosas, como principal característica clínica. A medula óssea não apresentava alterações displásicas, porém foi identificada evolução clonal citogenética com trissomias 8 e 1q. Na anemia de Fanconi, que costuma apresentar alterações cromossômicas não balanceadas, a trissomia 1q é a alteração citogenética mais comum^{139,140} e não está, necessariamente, associada a presença de SMD⁽¹³⁹⁾. Em coorte de crianças e adolescentes alemãs, a presença de alterações citogenéticas também foi identificada em portadores de mutação do gene *GATA2* onde a monossomia 7, seguida do der(1;7)(q10;p10) e trissomia oito foram as mais comuns

⁶¹. Isto corresponde ao que foi encontrado em nossos casos e mesmo no paciente F, com fenótipo altamente suspeito, porém sem confirmação molecular.

Foi possível realizar a investigação de evolução clonal por meio de WES na paciente G. Como surpresa, não foi verificada evidência de evolução clonal molecular apesar da evolução clonal citogenética. Neste caso, outra particularidade vem do fato de a mãe do probando, que também apresentava a mesma inserção, com exceção de monocitopenia identificada em hemograma e um relato de anemia esporádica, não apresentar histórico de infecções. Infelizmente, não foi possível aprofundar a investigação hematológica da mesma. Vários mecanismos podem estar envolvidos nestas diferentes apresentações, desde a evolução clonal até mecanismos epigenéticos, como no caso de irmãs gêmeas com mutação *de novo* do *GATA2* com apresentações clínicas diferentes, atribuídas à hipermetilação da região promotora do gene *GATA2* no probando com diagnóstico de SMD¹⁴¹.

Um pequeno estudo realizado em pacientes com diagnóstico de disqueratose congênita críptica sugere que podem haver outros mecanismos de progressão para SMD/LMA independente da aquisição de mutações somáticas. A presença de mutações somáticas clonais neste grupo parece ser evento raro, levantando a hipótese de que este não parece ser o principal mecanismo de progressão leucêmica neste grupo de pacientes¹⁴². Embora seja um estudo preliminar em um grupo de pacientes diferentes, parece-nos razoável, acreditar que mecanismos alternativos, como a instabilidade cromossômica favorecida pela presença de telômeros curtos (presentes no caso de nossa paciente) poderia contribuir no surgimento de neoplasias mieloides.

Por outro lado, a paciente E, com clara evolução para SMD de alto risco, apresentava evolução clonal citogenética com monossomia 7 e molecular com mutações dos genes *ASXLI*, *ETV6* e *KRAS*. Mutações somáticas do gene *ASXLI* já foram descritas em diversas neoplasias mieloides, incluindo LMA, e são consideradas fator de mau prognóstico em SMD primária e leucemia mielomonocítica crônica^{143,144}. Informações sobre a evolução clonal molecular em pacientes com síndrome de deleção do *GATA2* ainda é escassa, mas o gene *ASXLI* foi objeto de estudo e encontrado em, aproximadamente, 29% pacientes com SMD e LMMC e mutação do *GATA2*^{145,146}. Acredita-se que as mutações germinativas do *GATA2* e somática do *ASXLI* possam agir de forma sinérgica. Assim como o

GATA2, o ASXL1 parece interagir com fatores de transcrição ETS como o PU.1, cuja deleção ou redução de atividade promove neoplasias malignas¹⁴⁷.

A evolução catastrófica dos casos altamente suspeitos (F e J) e dos confirmados (E, G, I) de síndrome de deficiência do gene *GATA2* da presente série reforça a importância de identificação, diagnóstico precoce e avaliação dos familiares potenciais doadores. Apenas dois probandos (I e J) estão vivos. Um deles (I) foi submetido à TMO haploide do pai não portador de mutação. A penetrância é alta e o risco de desenvolvimento de neoplasia hematológica aumenta com a idade, mas a principal causa de morte continua sendo infecciosa, como foi visto na presente casuística¹³⁷.

Os irmãos da família M mantiveram-se sem causa molecular para o fenótipo, até o final deste estudo. A análise molecular por WES do probando NIII-7 revelou a presença de mutação heterozigota do gene *BLM*, confirmada por Sanger e presente também em sequenciamento direto de seu irmão. Este gene codifica helicase RecQL3, responsável por corrigir erros nos garfos de replicação de DNA¹⁴⁸, seu funcionamento adequado, portanto, faz parte da manutenção da estabilidade genômica. A síndrome de Bloom é uma doença autossômica recessiva associada a mutações do gene *BLM*, caracterizada por um aumento de risco de neoplasia maligna, além disso, apresenta distúrbios como baixa estatura e redução da gordura subcutânea, infertilidade masculina e subfertilidade feminina hipersensibilidade à exposição solar, manchas hipo e hiperpigmentadas^{148,149}. Mais comum em Judeus Ashkenazi, a frequência de mutação nesta população é pouco menor que 0,1% (1 em 107)⁹⁷. O paciente não relata ascendência judia e é portador de mutação classicamente encontrada neste grupo populacional e, provavelmente, patogênica.

O risco de desenvolvimento de neoplasia em pacientes heterozigotos para presença de mutações *BLM*, no entanto, não está claro. Estudos em modelos *in vitro* sugerem algumas mutações em heterozigose causem risco aumentado de carcinogênese¹⁵⁰ e os resultados de investigação de tumores sólidos, como neoplasia de mama e cólon é controverso¹⁵¹, uma vez que os estudos precisariam sequenciar um enorme número de casos e controles para obter poder estatístico suficiente para definir se portadores heterozigotos também estão em risco aumentado¹⁵². Na

plataforma COSMIC a descrição de mutação somática do gene *BLM* ocorre em 2 casos apenas.¹⁵³

À primeira vista pode parecer estranha a inclusão de uma família com dois irmãos com diagnóstico de anemia aplástica (família L) em investigação para predisposição germinativa à neoplasia mieloide em nossa série de casos, mas isto decorre de possíveis falhas ao diagnosticar algumas insuficiências medulares e telomeropatias, já que 2% - 5% dos casos com insuficiência medular podem apresentar a forma criptica da disqueratose congênita¹⁵⁴ e havia o potencial de erroneamente classificar estes dois irmãos com anemia aplástica adquirida.

O advento das técnicas de NGS e a progressiva queda nos custos revolucionou o entendimento das neoplasias como um todo e propiciou o descobrimento de novos genes implicados no aumento de risco para neoplasias mieloides. Neste estudo, a ordem inicial de investigação com técnica de sequenciamento direto por Sanger como primeira etapa foi subvertida em alguns casos em razão da disponibilidade e questões logísticas na realização de sequenciamento de exoma inteiro e os achados das mutações germinativas suspeitas foram sempre confirmados pela técnica de Sanger. Foram realizados sequenciamentos de exoma distintos para busca de mutações somáticas e germinativas, cuja diferença principal reside na profundidade de cobertura, que é maior para as mutações somáticas.

O tecido do qual o DNA é extraído, é relevante uma vez que amostras de sangue periférico e medula óssea são representativas das células de origem tumoral e além disso, podem apresentar hematopoese clonal. Este termo é utilizado para descrever a presença de clone derivado de célula progenitora hematopoiética que adquiriu mutações somáticas¹³⁴ e pode ser encontrado em cerca de 10% das pessoas acima de 65 anos e menos de 1% dos abaixo de 50 anos¹⁵⁵.

O ideal é fazer testes pareados de tecido acometido pela neoplasia (no caso sangue ou medula óssea) e tecido potencialmente representativo de origem germinativa¹⁰. A origem preferencial do DNA para pesquisa de mutações que induzem propensão germinativa para neoplasia hematológica, atualmente, é a cultura

de fibroblastos de pele. A cultura, ao contrário da extração direta do DNA da pele, diminui o risco de contaminação com sangue periférico¹⁹, mas o tempo de 3 a 4 semanas para obtenção de quantidade suficiente de DNA é um fator limitante. Há um pequeno estudo que sugere alternativas como o swab de mucosa oral otimizado para extração de células epiteliais e linfócitos T¹⁵⁶. Na casuística do ambulatório de citopenias HC-FMUSP, foi utilizado sangue periférico ou medula óssea para identificação de mutações suspeitas e a presença da mesma mutação em mais de um indivíduo na família, em particular de gerações diferentes, foi usado como indício forte de origem germinativa da mutação. Dois casos (E e I), apresentaram-se como mutações *de novo*, a primeira com evidência de linfedema, desde o nascimento, também elevando a suspeita de origem germinativa e o segundo também com sintomas desde a infância.

Além do exposto em relação à origem do DNA e ausência de comparação pareada de amostras, este estudo apresenta outras limitações que merecem destaque. A população foi selecionada por meio de revisão de cadastro no ambulatório e referenciamento para investigação, e as proporções encontradas de pacientes suspeitos e identificados de propensão germinativa podem estar superestimadas. Ao mesmo tempo, não foram incluídos nesta avaliação os pacientes com diagnóstico de leucemia ou neoplasia hematológica sem outros comemorativos, uma vez que esta avaliação se limitou apenas ao ambulatório de citopenias e não incluiu pacientes com leucemia aguda *de novo* (seguimento em ambulatório distinto). Além disto, propensões germinativas que apresentam idade de diagnóstico semelhante a de casos esporádicos como nos casos de mutação do *DDX41*³⁴, podem, inicialmente, não terem sido considerados suspeitos e história clínica no ambulatório ter sido menos aprofundada contribuindo, para que o grupo da OMS classificado como predisposição sem distúrbio prévio ou dismorfismo que inclui as mutações do *CEBPA* e *DDX41* não tivessem representantes na presente casuística.

Ainda faltam critérios claros para definir o quanto dos achados medulares estão associados à progressão da doença para síndrome mielodisplásica ou fazem parte do esperado em razão da presença da mutação. As mutações do gene *RUNX1* promovem displasia da série megacariocítica e isto não necessariamente está

relacionado à progressão para mielodisplasia^{22,117}. Mesmo com revisão anatomopatológica de todos os casos, houve dificuldade em classificar os achados medulares pelos critérios da OMS para mielodisplasia *de novo*.

Embora não tenha sido o objetivo deste estudo, se faz necessária a correlação entre as mutações encontradas, o fenótipo clínico e estudos funcionais em modelos *in vitro* e *in vivo* para melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de doenças que, mesmo com acometimento do mesmo gene, podem apresentar fenômenos hematológicos e imunológicos distintos. Mutações raras, sem relatos prévios na literatura ou estudos funcionais, são de difícil interpretação, mesmo quando são utilizamos os critérios do ACMG. Das nove mutações gênicas consideradas suspeitas nesta casuística, duas (22%) foram classificadas como variante de significado indeterminado e isto também é um problema que é facilmente transportado para a clínica. Em princípio, decisões clínicas não devem ser influenciadas pela presença de uma VUS, mas os resultados devem ser sempre revisitados de maneira sistemática para que novas informações e potenciais reclassificações de variantes não passem despercebidas¹⁰³.

Este é o primeiro estudo da América Latina que se tem conhecimento com foco específico em casos suspeitos de propensão germinativa para neoplasia mieloide e que avaliou múltiplos fenótipos. A colaboração com outros centros e grupos de pesquisa internacionais, em particular, o grupo de Dra Lucy Godley da Universidade de Chicago e o *RUNXI* database coordenado pelo grupo australiano, iniciados durante este estudo, poderão contribuir não apenas no avanço de pesquisa local, mas também no entendimento global de doenças consideradas raras, mas, que podem corresponder a cerca de 10% de todos os casos de neoplasias mieloides¹⁰.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Pacientes com suspeita de propensão germinativa correspondem a uma porção significativa daqueles em seguimento no ambulatório de citopenias, representando 9% do total de casos e 37,7% dos menores de 40 anos de idade.

Plaquetopenia familiar e suspeita de síndrome de deficiência do gene GATA2 foram os grupos fenotípicos mais prevalentes. Confirmação molecular da presença de mutações em genes altamente suspeitos ocorreu em 50% das 14 famílias.

Evolução clonal molecular não foi identificada em todos os casos de portadores de mutação germinativa, mesmo quando houve progressão para LMA ou havia evolução clonal em cariótipo, sugerindo que pode haver outros mecanismos para progressão associados ao processo de leucemogênese.

O diagnóstico preciso ainda é um desafio, mas os casos devem ser constantemente reavaliados não só clinicamente, mas também quanto à reclassificação das variantes gênicas.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JCY, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):118–29.
2. Zeidan AM, Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Rev*. 2019 Mar;34:1–15.
3. Churpek JE, Larson RA. The evolving challenge of therapy-related myeloid neoplasms. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013;26(4):309–17.
4. Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, et al. Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jan;54(1):28–35.
5. Goldin LR, Kristinsson SY, Liang XS, Derolf ÅR, Landgren O, Björkholm M. Familial aggregation of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(2):179–83.
6. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*. 2011 Oct 1;96(10):1536–42.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
8. Velloso EDRP, Chauffaille ML, Pelicario LM, Tanizawa RSS, Toledo SRC, Gaiolla RD, et al. Cytogenetic studies of Brazilian pediatric myelodysplastic syndrome cases: Challenges and difficulties in a large and emerging country.

- Brazilian J Med Biol Res. 2013;46(1):85–90.
9. Sud A, Chattopadhyay S, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, Houlston RS, et al. Analysis of 153 115 patients with hematological malignancies refines the spectrum of familial risk. *Blood*. 2019 Sep 19;134(12):960–9.
 10. Tawana K, Drazer MW, Churpek JE. Universal genetic testing for inherited susceptibility in children and adults with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia : are we there yet ? 2018;1482–92.
 11. Zhang MY, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, Watts AC, et al. Genomic analysis of bone marrow failure and myelodysplastic syndromes reveals phenotypic and diagnostic complexity. *Haematologica*. 2015 Jan 1;100(1):42–8.
 12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H TJ. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2. 2016.
 13. Guidugli L, Johnson AK, Alkorta-Aranburu G, Nelakuditi V, Arndt K, Churpek JE, et al. Clinical utility of gene panel-based testing for hereditary myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leukemia*. 2017;31(5):1226–9.
 14. Schwartz JR, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Wang S, Bryant V, et al. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–10.
 15. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018 Feb 15;131(7):717–32.
 16. Babushok D V, Bessler M, Olson TS. Genetic predisposition to

- myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leuk Lymphoma*. 2016 Mar 3;57(3):520–36.
17. Drazer MW, Kadri S, Sukhanova M, Patil SA, West AH, Feurstein S, et al. Prognostic tumor sequencing panels frequently identify germ line variants associated with hereditary hematopoietic malignancies. *Blood Adv*. 2018;2(2):146–50.
 18. Trottier AM, Cavalcante de Andrade Silva M, Li Z, Godley LA. Somatic mutation panels: Time to clear their names. *Cancer Genet*. 2019;235–236:84–92.
 19. Churpek JE, Godley LA. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(14):1800–13.
 20. Dias AR, de Andrade Silva MC, Carvalho FM, de Andrade Carvalho H, Esteves Diz MDP, Baracat EC, et al. Fanconi Anemia and Vaginal Squamous Cell Carcinoma. *Rare Tumors*. 2012 Mar 20;4(1):11–2.
 21. Peffault De Latour R, Peters C, Gibson B, Strahm B, Lankester A, De Heredia CD, et al. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(9):1168–72.
 22. Kanagal-Shamanna R, Loghavi S, Dinardo CD, Medeiros LJ, Garcia-Manero G, Jabbour E, et al. Bone marrow pathologic abnormalities in familial platelet disorder with propensity for myeloid malignancy and germline RUNX1 mutation. *Haematologica*. 2017;102(10):1661–70.
 23. Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, et al. Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):28–35.

24. Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: Management and surveillance. *Blood*. 2017;130(4):424–32.
25. Porter CC, Druley TE, Erez A, Kuiper RP, Onel K, Schiffman JD, et al. Recommendations for surveillance for children with leukemia-predisposing conditions. *Clin Cancer Res*. 2017;23(11):e14–22.
26. Mill CP, Fiskus W, DiNardo CD, Qian Y, Raina K, Rajapakshe K, et al. RUNX1-targeted therapy for AML expressing somatic or germline mutation in RUNX1. *Blood*. 2019;134(1):59–73.
27. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in Familial Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2403–7.
28. Avellino R, Delwel R. Expression and regulation of C/EBP α in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*. 2017;129(15):2083–91.
29. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bodor C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood*. 2015 Sep 3;126(10):1214–23.
30. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: Impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2739–47.
31. Cheah JJC, Hahn CN, Hiwase DK, Scott HS, Brown AL. Myeloid neoplasms with germline DDX41 mutation. *Int J Hematol*. 2017;106(2):163–74.
32. Quesada AE, Routbort MJ, DiNardo CD, Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, Khoury JD, et al. DDX41 mutations in myeloid neoplasms are associated with male gender, TP53 mutations and high-risk disease. *Am J*

- Hematol. 2019;94(7):757–66.
33. Sébert M, Passet M, Raimbault A, Rahmé R, Raffoux E, Sicre de Fontbrune F, et al. Germline DDX41 mutations define a significant entity within adult MDS/AML patients. *Blood*. 2019 Sep 4;33(0).
 34. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015 May;27(5):658–70.
 35. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, Phung C, Rafidi G, Lee MK, et al. Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood*. 2016;127(8):1017–23.
 36. Mangan JK, Speck NA. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1–2):77–91.
 37. Béri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(8):1014–8.
 38. Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, Bluteau D, Tomowiak C, Legrand C, et al. Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*. 2015 Feb 5;125(6):930–40.
 39. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017;129(15):blood-2016-10-687830.
 40. Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, et al. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to hematological malignancies: A nationwide survey

- in Japan. *Ann Oncol*. 2016;27(5):887–95.
41. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Boissel N, Dhedin N, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder Brief report High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. 2009;113(22):5583–7.
 42. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 2008;112(12):4639–45.
 43. Antony-Debré I, Duployez N, Bucci M, Geffroy S, Micol J-B, Renneville A, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia* . 2016 Apr 28;30(4):999–1002.
 44. Schlegelberger B, Heller PG. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin Hematol* . 2017;54(2):75–80.
 45. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, Baccini V, Alessi M-C, Ankri A, et al. Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):49.
 46. Cavalcante de Andrade Silva M, Krepischi ACV, Kulikowski LD, Zanardo EA, Nardinelli L, Leal AM, et al. Deletion of RUNX1 exons 1 and 2 associated with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet*. 2018;222–223:32–7.
 47. Ripperger T, Steinemann D, Göhring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, et

- al. A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia*. 2009;23(7):1364–6.
48. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*. 2015 Feb 12;47(2):180–5.
49. Feurstein S, Godley LA. Germline ETV6 mutations and predisposition to hematological malignancies. *Int J Hematol*. 2017;106(2):189–95.
50. Hock H, Shimamura A. ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition. *Semin Hematol*. 2017 Apr;54(2):98–104.
51. Hock H. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* . 2004 Sep 15;18(19):2336–41.
52. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, Callaghan M, Noris P, Savoia A, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2015 May 25;47(5):535–8.
53. Poggi M, Canault M, Favier M, Turro E, Saultier P, Ghalloussi D, et al. Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+progenitors. *Haematologica*. 2017;102(2):282–94.
54. Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6673–80.
55. Boutroux H, Petit A, Auvrignon A, Lapillonne H, Ballerini P, Favier R, et al.

- Childhood diagnosis of genetic thrombocytopenia with mutation in the ankyrine repeat domain 26 gene. *Eur J Pediatr.* 2015;174(10):1399–403.
56. Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kikuchi A, Goi K, Nakane T, Ikeno M, et al. Analyses of Genetic and Clinical Parameters for Screening Patients With Inherited Thrombocytopenia with Small or Normal-Sized Platelets. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Dec;62(12):2082–8.
57. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: A protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood.* 2014;123(6):809–21.
58. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood.* 2011;118(10):2653–5.
59. Wlodarski MW, Collin M, Horwitz MS. GATA2 deficiency and related myeloid neoplasms. *Semin Hematol.* 2017 Apr;54(2):81–6.
60. Crispino JD, Horwitz MS. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood.* 2017 Apr 13;129(15):2103–10.
61. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Stary J, Hasle H, Masetti R, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood.* 2016 Mar 17;127(11):1387–97.
62. Hirabayashi S, Wlodarski MW, Kozyra E, Niemeyer CM. Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms. *Int J Hematol.* 2017;106(2):175–82.
63. Nalepa G, Clapp DW. Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nat Rev Cancer.* 2018 Mar 29;18(3):168–85.

64. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 2010 May;24(3):101–22.
65. Peffault de Latour R, Soulier J. How I treat MDS and AML in Fanconi anemia. *Blood.* 2016 Jun 16;127(24):2971–9.
66. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Prim.* 2017 Dec 8;3(1):17032. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201732>
67. Xia J, Bolyard AA, Rodger E, Stein S, Aprikyan AA, Dale DC, et al. Prevalence of mutations in ELANE, GFI1, HAX1, SBDS, WAS and G6PC3 in patients with severe congenital neutropenia. *Br J Haematol.* 2009;147(4):535–42.
68. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol.* 2010 July;150(2):196-199.
69. Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE, Zeidler C, Klimenkova O, Klimiankou M, et al. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia: A unique pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood.* 2014;123(14):2229–37.
70. Nelson AS, Myers KC. Diagnosis, Treatment, and Molecular Pathology of Shwachman-Diamond Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018 Aug;32(4):687–700.
71. Tummala H, Walne AJ, Williams M, Bockett N, Collopy L, Cardoso S, et al. DNAJC21 Mutations Link a Cancer-Prone Bone Marrow Failure Syndrome to Corruption in 60S Ribosome Subunit Maturation. *Am J Hum Genet.* 2016;99(1):115–24.

72. Klar J, Khalfallah A, Arzoo PS, Gazda HT, Dahl N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* . 2014 Sep;166(6):949–51.
73. Lipton JM. Diamond Blackfan Anemia: New Paradigms for a “Not So Pure” Inherited Red Cell Aplasia. *Semin Hematol* . 2006 Jul;43(3):167–77.
74. Vlachos A, Rosenberg PS, Kang J, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Myelodysplastic Syndrome and Gastrointestinal Carcinomas Characterize the Cancer Risk in Diamond Blackfan Anemia: A Report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* . 2016 Dec 2;128(22):333–333.
75. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*. 2015;124(18):2775–84.
76. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet*. 2004;36(5):447–9.
77. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* . 2001 Sep 27;413(6854):432–5.
78. Yamaguchi H. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* . 2003 Apr 3;102(3):916–8.
79. Niemeyer CM, Flotho C. Juvenile myelomonocytic leukemia: who’s the driver at the wheel? *Blood* . 2019 Mar 7;133(10):1060–70.
80. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H TJ. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. .

- International Agency for Research in Cancer (IARC); 2017. 585 p.
81. Strullu M, Caye A, Lachenaud J, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *J Med Genet* . 2014 Oct;51(10):689–97.
 82. Cantor AB. Myeloid proliferations associated with Down syndrome. *J Hematop* . 2015 Sep 14;8(3):169–76.
 83. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, Velangi M, Ho A, Hossain U, et al. Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2012;90(5):888–92.
 84. Tesi B, Davidsson J, Voss M, Rahikkala E, Holmes TD, Chiang SCC, et al. Gain-of-function SAMD9L mutations cause a syndrome of cytopenia, immunodeficiency, MDS, and neurological symptoms. *Blood*. 2017;129(16):2266–79.
 85. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet*. 2016;48(7):792–7.
 86. Schwartz JR, Wang S, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Song G, et al. Germline SAMD9 mutation in siblings with monosomy 7 and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* . 2017 Aug 23;31(8):1827–30.
 87. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2015;47(10):1131–40.
 88. Babushok D V., Stanley NL, Morrissette JJD, Lieberman DB, Olson TS, Chou ST, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP genes is not required for the familial myeloid malignancy syndrome associated with the duplication

- of chromosome 14q32. *Leukemia* . 2018 Dec 7;32(12):2720–3.
89. Germeshausen M, Ancliff P, Estrada J, Metzler M, Ponstingl E, Rüttschle H, et al. MECOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Adv* . 2018 Mar 27;2(6):586–96.
90. Ripperger T, Hofmann W, Koch JC, Shirneshan K, Haase D, Wulf G, et al. MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM): a novel candidate gene for hereditary hematological malignancies. *Haematologica* . 2018 Feb;103(2):e55–8.
91. Bansidhar BJ. Extracolonic manifestations of lynch syndrome. *Clin Colon Rectal Surg*. 2012;25(2):103–10.
92. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, Mcgrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM. Ataxia telangiectasia Orphanet Journal of Rare Diseases. *Orphanet J Rare Dis* . 2016;11(159):1–21.
93. Leal AM. Avaliação citogenética convencional e molecular em portadores de leucemia promielocítica aguda no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
94. Caputo LZ. Implantação da técnica de quebras cromossômicas com diepoxibutano (DEB) em laboratório de citogenética: estudo de 148 casos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
95. Zanardo EA. Évelin Aline Zanardo Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor São Paulo Évelin Aline Zanardo Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes c. 2014.

96. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* . 2012 Dec 18;13(1):134.
97. Li L, Eng C, Desnick RJ, German J, Ellis NA. Carrier Frequency of the Bloom Syndrome *blm* Ash Mutation in the Ashkenazi Jewish Population. *Mol Genet Metab* . 1998 Aug;64(4):286–90.
98. Parry EM, Alder JK, Lee SS, Phillips JA, Loyd JE, Duggal P, et al. Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. *J Med Genet* . 2011 May 1;48(5):327–33.
99. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: *Current Protocols in Bioinformatics* . Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 11.10.1-11.10.33.
100. Li H. Aligning sequence reads , clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013;00(00):1–3.
101. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):1–7.
102. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. Wren J, editor. *Bioinformatics* . 2019 Jun 1;35(11):1978–80.
103. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24.

-
104. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* . 2019;531210.
 105. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, Sanalkumar R, Sanchez L, Hickstein DD, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood*. 2013;121(19):3830–7.
 106. Keel SB, Scott A, Sanchez-Bonilla M, Ho PA, Gulsuner S, Pritchard CC, et al. Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica* . 2016 Nov;101(11):1343–50.
 107. DiNardo CD, Bannon SA, Routbort M, Franklin A, Mork M, Armanios M, et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2016;16(7):417-428.e2.
 108. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi K, Shao J, Koboldt D, Miller CA, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia / acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(22):2484–91.
 109. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, De Latour RP, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018;131(7):717–32.
 110. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*. 2004;10(3):299–304.
 111. Buijs a, Poot M, van der Crabben S, van der Zwaag B, van Binsbergen E, van Roosmalen MJ, et al. Elucidation of a novel pathogenomic mechanism using

- genome-wide long mate-pair sequencing of a congenital t(16;21) in a series of three RUNX1-mutated FPD/AML pedigrees. *Leukemia*. 2012;26(9):2151–4.
112. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999;23(2):166–75.
113. Jongmans MCJ, Kuiper RP, Carmichael CL, Wilkins EJ, Dors N, Carmagnac A, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia*. 2010;24(1):242–6.
114. Nishimoto N, Imai Y, Ueda K, Nakagawa M, Shinohara A, Ichikawa M, et al. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol*. 2010;92(1):194–7.
115. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, Antony-Debré I, James C, Debili N, et al. Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;118(24):6310–20.
116. Antony-Debré I, Duployez N, Bucci M, Geffroy S, Micol J-B, Renneville A, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;(August 2015):999–1002.
117. Chisholm KM, Denton C, Keel S, Geddis AE, Xu M, Appel BE, et al. Bone Marrow Morphology Associated With Germline RUNX1 Mutations in Patients With Familial Platelet Disorder With Associated Myeloid Malignancy. *Pediatr Dev Pathol*. 2019 Jul 2;22(4):315–28.
118. Duarte BKL, Yamaguti-Hayakawa GG, Medina SS, Siqueira LH, Snetsinger

- B, Costa FF, et al. Longitudinal sequencing of RUNX1 familial platelet disorder: new insights into genetic mechanisms of transformation to myeloid malignancies. *Br J Haematol.* 2019;(May):724–34.
119. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013 Nov 21;122(22):3616–27.
120. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro G, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the Ankirin Repeat Domain 26 Gene, Cause an Autosomal-Dominant Form of Inherited Thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet.* 2011 Jan;88(1):115–20.
121. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397–406.
122. Bluteau D, Balduini A, Balayn N, Currao M, Nurden P, Deswarte C, et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest.* 2014;124(2):580–91.
123. Noris P, Favier R, Alessi M-C, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 2013 Sep 12;122(11):1987–9.
124. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6549–57.
125. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285–91.

126. Du H-Y, Pumbo E, Ivanovich J, An P, Maziarz RT, Reiss UM, et al. TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood* . 2009 Jan 8;113(2):309–16.
127. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the Gene for Telomerase Reverse Transcriptase, in Aplastic Anemia. *N Engl J Med* . 2005 Apr 7;352(14):1413–24.
128. van der Crabben S, van Binsbergen E, Ausems M, Poot M, Bierings M, Buijs A. Constitutional RUNX1 deletion presenting as non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia: 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation. *Leuk Res*. 2010;34(1):8–12.
129. McDonald-mcginn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, et al. The eponymous description of DiGeorge syndrome —. *Nat Rev Dis Prim* . 2015 Dec 19;1(November):15071.
130. Delio M, Guo T, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Herman S, Kaminetzky M, et al. Enhanced Maternal Origin of the 22q11.2 Deletion in Velocardiofacial and DiGeorge Syndromes. *Am J Hum Genet* . 2013 Mar;92(3):439–47.
131. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: Cast a wide FISHing net! *Genet Med* . 2001 Feb;3(1):23–9.
132. Lambert MP, Arulselvan A, Schott A, Markham SJ, Crowley TB, Zackai EH, et al. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. *Am J Med Genet Part A* . 2018 Oct;176(10):2121–7.

133. Stevens T, van der Werff ten Bosch J, De Rademaeker M, Van Den Bogaert A, van den Akker M. Risk of malignancy in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Case Reports* . 2017 Apr;5(4):486–90.
134. Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell* . 2018 Feb;22(2):157–70.
135. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li X-C, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* . 2011;43(10):1012–7.
136. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* . 2011 Oct 4;43(10):929–31.
137. Donadieu J, Lamant M, Fieschi C, Sicre de Fontbrune F, Caye A, Ouachee M, et al. Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. *Haematologica* . 2018;haematol.2017.181909.
138. Dickinson RE, Milne P, Jardine L, Zandi S, Swierczek SI, McGovern N, et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood* . 2014 Feb 6;123(6):863–74.
139. Mehta PA, Harris RE, Davies SM, Kim M-O, Mueller R, Lampkin B, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome–acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet* . 2010 Dec;203(2):180–6.
140. Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome Among a Cohort of 119 Patients With Fanconi Anemia. *Am J Clin Pathol* . 2010 Jan 1;133(1):92–100.

141. Kim N, Choi S, Kim S-M, Lee AC, Im K, Park HS, et al. Monozygotic twins with shared de novo GATA2 mutation but dissimilar phenotypes due to differential promoter methylation. *Leuk Lymphoma* . 2019 Mar 21;60(4):1053–61.
142. Kirschner M, Maurer A, Wlodarski MW, Ventura Ferreira MS, Bouillon A-S, Halfmeyer I, et al. Recurrent somatic mutations are rare in patients with cryptic dyskeratosis congenita. *Leukemia* . 2018 Aug 2;32(8):1762–7.
143. Mangaonkar AA, Gangat N, Al-Kali A, Elliott MA, Begna KH, Hanson CA, et al. Prognostic impact of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes and multilineage dysplasia with or without ring sideroblasts. *Leuk Res*. 2018;71(July):60–2.
144. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* . 2014 Nov 3;28(11):2206–12.
145. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica*. 2014;99(2):276–81.
146. Perez Botero J, Ho TP, Hogan WJ, Kenderian S, Gangat N, Tefferi A, et al. Clinical spectrum and clonal evolution in germline syndromes with predisposition to myeloid neoplasms. *Br J Haematol*. 2018;182(1):141–5.
147. Micol J-B, Abdel-Wahab O. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. *Haematologica* . 2014 Feb 1;99(2):201–3.
148. Arora H, Chacon AH, Choudhary S, Mcleod MP, Meshkov L, Nouri K, et al.

- Bloom syndrome. *Int J Dermatol*. 2014;53(7):798–802.
149. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995;83(4):655–66.
 150. Mirzaei H, Schmidt KH. Non-Bloom syndrome-associated partial and total loss-of-function variants of BLM helicase. *Proc Natl Acad Sci* . 2012 Nov 20;109(47):19357–62.
 151. Cleary SP, Zhang W, Di Nicola N, Aronson M, Aube J, Steinman A, et al. Heterozygosity for the BLMash mutation and cancer risk. *Cancer Res*. 2003;63(8):1769–71.
 152. Ellis NA, Offit K. Heterozygous Mutations in DNA Repair Genes and Hereditary Breast Cancer: A Question of Power. Horwitz MS, editor. *PLoS Genet* . 2012 Sep 27;8(9):e1003008.
 153. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC : the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. 2019;47(October 2018):941–7.
 154. Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, et al. Clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. *Int J Hematol* . 2015 Nov 2;102(5):544–52.
 155. Lindberg J, Ph D, Rose SA, Bakhoun SF, Ph D, Chambert K, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. 2014;2477–87.
 156. Padron E, Ball MC, Teer JK, Painter JS, Yoder SJ, Zhang C, et al. Germ line tissues for optimal detection of somatic variants in myelodysplastic

syndromes. *Blood* . 2018;131(21):2402–5.

8 Anexos

8 ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento

NOME DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. Objetivo da pesquisa

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico por ter suspeita de ser portador da doença síndrome mielodisplásica familiar. Este estudo visa caracterizar as alterações encontradas em seu sangue (diminuição da quantidade de células do sangue), as alterações hematológicas da medula óssea (local de produção das células do sangue) e também se existem alterações semelhantes em sua família. Tem como objetivo também identificar possíveis causas genéticas destas alterações. Os genes estudados nesta pesquisa estão relacionados à produção das células do sangue e surgimento de câncer. Se nenhuma alteração for identificada nestes genes, poderá ser empregada técnica para estudar toda a sequência de seus genes.

2. Testes e procedimentos

A coleta de exames de sangue e medula óssea já é necessária para a sua avaliação médica de rotina, independente da pesquisa. Estes exames têm como objetivo a avaliação da alteração da quantidade de células, alteração de sua função e composição. Caso deseje participar desta pesquisa será necessário responder a um curto questionário sobre doenças em sua família (cerca de 5 minutos), ser submetido a algumas fotografias e coletar uma maior quantidade de sangue e material de medula óssea, quando for

realizar seu exame de rotina. Este material adicional será utilizado para realização de testes genéticos mais detalhados.

A coleta de sangue será realizada por meio de agulha em veia do antebraço no momento de coleta de exames para a sua consulta de rotina. Serão coletados cerca de 15mL (3 colheres de sobremesa) a mais do que o habitual.

A coleta de material de medula óssea é um procedimento no qual, após anestesia local, uma agulha é introduzida em osso de quadril e a medula óssea (cujo aspecto se assemelha ao sangue) é aspirado. Este exame já faz parte de sua rotina médica e haverá apenas a coleta de material adicional (cerca de 10mL ou 2 colheres de sobremesa), para os testes genéticos desta pesquisa.

As técnicas de laboratório utilizadas para identificar possíveis alterações genéticas são várias como, cariótipo (estuda todos os cromossomos), Hibridação Genômica Comparativa (estuda vários genes), reação de polimerase em cadeia e hibridação *in situ* por fluorescência (para avaliar um único tipo de gene) e exoma (para avaliar todo o seu conjunto de genes).

3. Riscos e inconveniências

Essas coletas serão feitas apenas para este estudo, mas não vão curar sua doença. Não vão causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue), sendo o desconforto semelhante ao da punção habitual para coleta de exames ou da rotina para a consulta. No caso da coleta de material de medula óssea poderá haver desconforto momentâneo no lugar da punção. Apesar dos cuidados que serão tomados em relação a manter seu anonimato, existe um risco mínimo de suas informações e imagens serem divulgadas, podendo interferir na sua rotina e ocorrer discriminação.

4. Benefícios

De imediato, não há benefício direto em participar do estudo, o tratamento seguirá de forma habitual. Somente no final do estudo se poderá concluir sobre a influência das alterações genéticas (caso sejam encontradas) em sua doença. Poderá haver algum benefício para você e para seus familiares, caso os exames tragam alguma informação relevante.

5. Custo da participação

Não existe custo ou despesa para participar desta pesquisa. Exames, consultas (acompanhamento clínico) e aconselhamento genético serão realizados e também não terão custo para você. Você não será pago para participar da pesquisa, mas caso tenha despesas diretamente e exclusivamente relacionadas a sua participação como, por exemplo, transporte ao local de consulta e alimentação, você será ressarcido, bem como seu o acompanhante.

Será garantido seu direito a indenização e assistência integral e gratuita caso você sofra algum dano ou prejuízo imediato ou tardio, direto ou indireto, decorrente de sua participação nesta pesquisa. Jamais será exigido de você que renuncie a este direito.

6. Retirada do consentimento para participar do estudo

É garantida a sua liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, com validade a partir da data da comunicação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você poderá retirar o seu consentimento de armazenamento do material genético. Para isso basta solicitar por escrito que não deseja mais participar da pesquisa e assinar.

7. Armazenamento de amostras

O material colhido será armazenado até a finalização desta pesquisa após o qual poderá ser descartado. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para

esta pesquisa. Caso o pesquisador queira fazer outra pesquisa, ele pedirá sua autorização por escrito (novo TCLE) e explicará a nova pesquisa.

Sua amostra de material genético poderá ser encaminhada a ao laboratório da Universidade de Chicago (Estados Unidos da America) como parte desta pesquisa, com o objetivo de aprofundar a análise de possíveis alterações genéticas. Sendo armazenada pelo período apenas de duração da pesquisa.

8. Algumas perguntas

a. Caso tenham sido coletadas amostras de sangue ou medula para estudos rotineiros de avaliação de sua doença e os mesmos estejam armazenados (devido à rotina laboratorial) antes do início desta pesquisa estes poderão ser analisados como parte desta pesquisa?

SIM, autorizo a utilização destas amostras para estudos de genéticos caso seja pertinente para a pesquisa.

NÃO autorizo a utilização destas amostras.

b. Caso tenham sido tiradas fotografias:

SIM, concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.

NÃO concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

c. Você autoriza que os pesquisadores associados a esta pesquisa tenham acesso aos dados de seu prontuário médico?

SIM, autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.

NÃO autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.

d. Caso deseje, poderá tomar conhecimento dos resultados parciais da pesquisa, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

SIM, desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

e. Entendo que a autorização de coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano (sangue, medula óssea, células da mucosa oral) para pesquisa científica é uma decisão voluntária, portanto:

SIM, autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano.

NÃO autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano.

9. Confidencialidade

As informações obtidas farão parte apenas desta pesquisa e serão analisadas em conjunto com outros participantes da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante da pesquisa. Portanto seu sigilo e privacidade de seus dados pessoais serão garantidos. Se você autorizou o uso de fotografias, tarjas pretas serão utilizadas para evitar a sua identificação.

Caso deseje tomar conhecimento dos resultados da pesquisa, você será informado sobre os resultados dos testes genéticos e qual o significado desses resultados para você e sua família.

10. Dúvidas

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora responsável é a Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso que pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 horário comercial e (11) 99990-3279 (24 horas).

Se você tiver dúvidas sobre os seus direitos como um participante de um estudo clínico, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética responsável pelo estudo nesta instituição ou com a CONEP.

O Comitê de Ética é um órgão responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante de pesquisa. A CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) é um órgão vinculado ao Conselho Nacional de Saúde que examina os aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos, fazendo e atualizando as regras para a proteção dos participantes de pesquisa, além de coordenar a rede de Comitês de Ética das instituições.

Nome do CEP: CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

Endereço: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar do Prédio da Administração - Cerqueira César, 05403-010, São Paulo/SP.

Telefone: (11) 2661-7585 / (11) 2661-1548 / (11) 2661-1549.

Email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Horário de Funcionamento: De segunda a sexta-feira das 07h às 16h.

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Telefone para contato: (61) 3315-5877 ou (61) 3315-5878

Email: conep@saude.gov.br

Endereço: SRTV 701, SRTVN, Edifício PO 700 - Brasília, DF, SRTVN - Asa Norte, Brasília - DF, 70723-040

Horário de Funcionamento: De segunda à sexta-feira, das 8h às 18h

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ESTUDO MOLECULAR E CITOGÊNÉTICO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”. Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este documento terá duas vias. Caso concorde em participar da pesquisa, ele deverá ser assinado tanto por você quanto pelo pesquisador. Uma via ficará com você e a outra com o pesquisador.

Nome do (a) Participante da Pesquisa

Assinatura do (a) Participante da Pesquisa

Data

Nome da Testemunha (se aplicável)

Assinatura da Testemunha (se aplicável)

Data

(Somente para o pesquisador) - Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante da pesquisa para a participação neste estudo.

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

Anexo 2. TCLE Versão Familiares

NOME DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. Objetivo da pesquisa

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico **porque seu familiar tem** diminuição da quantidade e alterações nas células sanguíneas e existe a suspeita de que estas alterações possam ter um caráter familiar (síndrome mielodisplásica familiar). Este estudo tem como objetivo avaliar e caracterizar estas alterações, avaliar se outros familiares também as apresentam e identificar possíveis causas genéticas destas alterações. Os genes estudados nesta pesquisa estão relacionados à produção das células do sangue e surgimento de câncer. Se nenhuma alteração for identificada nestes genes, poderá ser empregada técnica para estudar toda a sequência de seus genes.

2. Testes e procedimentos

A coleta de exames de sangue e medula óssea já é necessária para a avaliação médica de rotina, independente da pesquisa. Estes exames têm como objetivo a avaliação da alteração da quantidade de células, alteração de sua função e composição. Caso deseje participar desta pesquisa será necessário responder a um curto questionário sobre doenças em sua família (cerca de 5 minutos), ser submetido a algumas fotografias e coletar uma maior quantidade de sangue e material de medula óssea, quando for realizar seu exame de rotina. Este material adicional será utilizado para realização de testes genéticos mais detalhados.

A coleta de sangue será realizada por meio de agulha em veia do antebraço no momento de coleta de exames para a sua consulta de rotina. Serão coletados cerca de 15mL (3 colheres de sobremesa) a mais do que o habitual.

A coleta de material de medula óssea é um procedimento no qual, após anestesia local, uma agulha é introduzida em osso de quadril e a medula óssea (cujo aspecto se assemelha ao sangue) é aspirado. Este exame já faz parte de sua rotina médica e haverá apenas a coleta de material adicional (cerca de 10mL ou 2 colheres de sobremesa), para os testes genéticos desta pesquisa.

As técnicas de laboratório utilizadas para identificar possíveis alterações genéticas são várias como cariótipo (estuda todos os cromossomos), Hibridação Genômica Comparativa (estuda vários genes), reação de polimerase em cadeia e hibridação in situ por fluorescência (para avaliar um único tipo de gene) e exoma (para avaliar todo o seu conjunto de genes).

3. Riscos e inconveniências

Essas coletas serão feitas apenas para este estudo, mas não vão curar a doença. Não vão causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue), sendo o desconforto semelhante ao da punção habitual para coleta de exames ou da rotina para a consulta. No caso da coleta de material de medula óssea poderá haver desconforto momentâneo no lugar da punção. Apesar dos cuidados que serão tomados em relação a manter seu anonimato, existe um risco mínimo de suas informações e imagens poderem ser divulgadas, podendo interferir na sua rotina e ocorrer discriminação.

4. Benefícios

De imediato, não há benefício direto em participar do estudo. Somente no final do estudo se poderá concluir sobre a influência das alterações genéticas (caso sejam encontradas) no seu familiar ou em você. Poderá haver algum benefício para você ou para seus familiares caso os exames tragam alguma informação relevante para o médico assistente.

5. Custo da participação

Não existe custo ou despesa para participar desta pesquisa. Exames, consultas (acompanhamento clínico) e aconselhamento genético serão realizados e também não terão custo para você. Você não será pago para participar da pesquisa, mas caso tenha despesas diretamente e exclusivamente relacionadas a sua participação como, por exemplo, transporte ao local de consulta e alimentação, você será ressarcido, bem como seu acompanhante.

Será garantido seu direito a indenização e assistência integral e gratuita caso você sofra algum dano ou prejuízo imediato ou tardio, direto ou indireto, decorrente de sua participação nesta pesquisa. Jamais será exigido de você que renuncie a este direito.

6. Retirada do consentimento para participar do estudo

É garantida a sua liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, com validade a partir da data da comunicação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você poderá retirar o seu consentimento de armazenamento do material genético. Para isso basta solicitar por escrito que não deseja mais participar da pesquisa e assinar.

7. Armazenamento de amostras

O material colhido será armazenado até a finalização desta pesquisa após o qual poderá ser descartado. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Caso o pesquisador queira fazer outra pesquisa, ele pedirá sua autorização por escrito (novo TCLE) e explicará a nova pesquisa.

Sua amostra de material genético poderá ser encaminhada a ao laboratório da Universidade de Chicago (Estados Unidos da America) como parte desta pesquisa, com o objetivo de aprofundar a análise de possíveis alterações genéticas. Sendo armazenada pelo período apenas de duração da pesquisa.

8. Algumas perguntas

- e. Caso tenham sido coletadas amostras de sangue ou medula para estudos rotineiros de avaliação de sua doença e os mesmos estejam armazenados (devido à rotina laboratorial) antes do início desta pesquisa estes poderão ser analisados como parte desta pesquisa?
- () SIM, autorizo a utilização destas amostras para estudos de genéticos caso seja pertinente para a pesquisa.
- () NÃO autorizo a utilização destas amostras.
- f. Caso tenham sido tiradas fotografias:
- () SIM, concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.
- () NÃO concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- g. Você autoriza que os pesquisadores associados a esta pesquisa tenham acesso aos dados de seu prontuário médico?
- () SIM, autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.
- () NÃO autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.
- h. Caso deseje, poderá tomar conhecimento dos resultados parciais da pesquisa, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- () SIM, desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- e. Entendo que a autorização de coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano (sangue, medula óssea, células da mucosa oral) para pesquisa científica é uma decisão voluntária, portanto:
- () SIM, autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano.
- () NÃO autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso de meu material biológico humano.

9. Confidencialidade

As informações obtidas farão parte apenas desta pesquisa e serão analisadas em conjunto com outros participantes da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante da pesquisa. Portanto seu sigilo e privacidade de seus dados pessoais serão garantidos. Se você autorizou o uso de fotografias, tarjas pretas serão utilizadas para evitar a identificação.

Caso deseje tomar conhecimento dos resultados da pesquisa, você será informado sobre os resultados dos testes genéticos e qual o significado desses resultados para você e sua família.

10. Dúvidas

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador responsável é a Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso que pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos

Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 horário comercial e (11) 99990-3279 (24 horas).

Se você tiver dúvidas sobre os seus direitos como um participante de um estudo clínico, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética responsável pelo estudo nesta instituição ou com a CONEP.

O Comitê de Ética é um órgão responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante de pesquisa. A CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) é um órgão vinculado ao Conselho Nacional de Saúde que examina os aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos, fazendo e atualizando as regras para a proteção dos participantes de pesquisa, além de coordenar a rede de Comitês de Ética das instituições.

Nome do CEP: CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

Endereço: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar do Prédio da Administração - Cerqueira César, 05403-010, São Paulo/SP.

Telefone: (11) 2661-7585 / (11) 2661-1548 / (11) 2661-1549.

Email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Horário de Funcionamento: De segunda a sexta-feira das 07h às 16h.

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Telefones para contato: (61) 3315-5877 ou (61) 3315-5878

Email: conep@saude.gov.br

Endereço: SRTV 701, SRTVN, Edifício PO 700 - Brasília, DF, SRTVN - Asa Norte, Brasília - DF, 70723-040

Horário de Funcionamento: De segunda à sexta-feira, das 8h às 18h

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ESTUDO MOLECULAR E CITOGENÉTICO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”. Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este documento terá duas vias. Caso concorde em participar da pesquisa ele deverá ser assinado tanto por você quanto pelo pesquisador. Uma via ficará com você e a outra com o pesquisador.

Nome do (a) Participante da Pesquisa

Assinatura do (a) Participante da Pesquisa

Data

Nome da Testemunha (se aplicável)

Assinatura da Testemunha (se aplicável)

Data

(Somente para o pesquisador) - Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante da pesquisa para a participação neste estudo.

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

Anexo 3. TCLE versão para o responsável Legal

NOME DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

.....

NOME DO RESPONSÁVEL LEGAL:

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP

Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia

Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.

Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO REPRESENTANTE LEGAL DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. Objetivo da pesquisa

O(A) seu filho(a), ou o menor sobre o qual você tem responsabilidade legal, está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico por ter suspeita de ser portador da doença síndrome mielodisplásica familiar. Este estudo visa caracterizar as alterações encontradas em seu sangue (diminuição da quantidade de células do sangue), as alterações hematológicas da medula óssea (local de produção das células do sangue) e também se existem alterações semelhantes em sua família. Tem como objetivo também identificar possíveis causas genéticas destas alterações. Os genes estudados nesta pesquisa estão relacionados à produção das células do sangue e surgimento de câncer. Se nenhuma alteração for identificada nestes genes, poderá ser empregada técnica para estudar toda a sequência de seus genes.

2. Testes e procedimentos

A coleta de exames de sangue e medula óssea já é necessária para a avaliação médica de rotina, independente da pesquisa. Estes exames têm como objetivo a avaliação da alteração da quantidade de células, alteração de sua função e composição. Caso deseje que seu filho participe desta pesquisa será necessário responder a um curto questionário sobre doenças em sua família (cerca de 5 minutos), ser submetido a algumas fotografias e coletar uma maior quantidade de sangue e material de medula óssea,

quando for realizar seu exame de rotina. Este material adicional será utilizado para realização de testes genéticos mais detalhados.

A coleta de sangue será realizada por meio de agulha em veia do antebraço no momento de coleta de exames para a sua consulta de rotina. Serão coletados cerca de 15mL (3 colheres de sobremesa) a mais do que o habitual.

A coleta de material de medula óssea é um procedimento no qual, após anestesia local, uma agulha é introduzida em osso de quadril e a medula óssea (cujo aspecto se assemelha ao sangue) é aspirado. Este exame já faz parte de sua rotina médica e haverá apenas a coleta de material adicional (cerca de 10mL ou 2 colheres de sobremesa), para os testes genéticos desta pesquisa.

As técnicas de laboratório utilizadas para identificar possíveis alterações genéticas são várias como cariótipo (estuda todos os cromossomos), Hibridação Genômica Comparativa (estuda vários genes), reação de polimerase em cadeia e hibridação in situ por fluorescência (para avaliar um único tipo de gene) e exoma (para avaliar todo o seu conjunto de genes).

3. Riscos e inconveniências

Essas coletas serão feitas apenas para este estudo, mas não vão curar a doença de seu filho. Não vão causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue), sendo o desconforto semelhante ao da punção habitual para coleta de exames ou da rotina para a consulta. No caso da coleta de material de medula óssea poderá haver desconforto momentâneo no lugar da punção. Apesar dos cuidados que serão tomados em relação a manter o anonimato de seu filho, existe um risco mínimo de suas informações e imagens poderem ser divulgadas, podendo interferir na rotina de seu filho e sua família e ocorrer discriminação.

4. Benefícios

De imediato, não há benefício direto em participar do estudo, o tratamento seguirá de forma habitual. Somente no final do estudo se poderá concluir sobre a influência das alterações genéticas (caso sejam encontradas) na doença de seu filho. Poderá haver algum benefício para ele e para seus familiares, caso os exames tragam alguma informação relevante.

5. Custo da participação

Não existe custo ou despesa para participar desta pesquisa. Exames, consultas (acompanhamento clínico) e aconselhamento genético serão realizados e também não terão custo para você. Seu filho não será pago para participar da pesquisa, mas caso tenha despesas diretamente e exclusivamente relacionadas a sua participação como, por exemplo, transporte ao local de consulta e alimentação, você será ressarcido, bem como o seu acompanhante.

Será garantido seu direito a indenização e assistência integral e gratuita caso seu filho sofra algum dano ou prejuízo imediato ou tardio, direto ou indireto, decorrente de sua participação nesta pesquisa. Jamais será exigido de você que renuncie a este direito.

6. Retirada do consentimento para participar do estudo

É garantida a sua liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e seu filho deixar de participar do estudo, com validade a partir da data da comunicação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você poderá retirar o seu consentimento de armazenamento do material genético. Para isso basta solicitar por escrito que não deseja mais participar da pesquisa e assinar.

7. Armazenamento de amostras

O material colhido será armazenado até a finalização desta pesquisa após o qual poderá ser descartado. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta

pesquisa. Caso o pesquisador queira fazer outra pesquisa, ele deverá pedir sua autorização por escrito e explicar a nova pesquisa.

A amostra de material genético do seu filho poderá ser encaminhada ao laboratório da Universidade de Chicago (Estados Unidos da América) como parte desta pesquisa, com o objetivo de aprofundar a análise de possíveis alterações genéticas. Sendo armazenada pelo período apenas de duração da pesquisa.

8. Algumas perguntas

- i. Caso tenham sido coletadas amostras de sangue ou medula para estudos rotineiros de avaliação da doença do seu filho e os mesmos estejam armazenados (devido à rotina laboratorial) antes do início desta pesquisa estes poderão ser analisados como parte desta pesquisa?
- SIM, autorizo a utilização destas amostras para estudos de genéticos caso seja pertinente para a pesquisa.
- NÃO autorizo a utilização destas amostras.
- j. Caso tenham sido tiradas fotografias:
- SIM, concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.
- NÃO concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- k. Você autoriza que os pesquisadores associados a esta pesquisa tenham acesso aos dados do prontuário médico de seu filho?
- SIM, autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.
- NÃO autorizo o acesso aos dados de meu prontuário médico.
- l. Caso deseje, poderá tomar conhecimento dos resultados parciais da pesquisa, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- SIM, desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- e. Entendo que a autorização de coleta, depósito, armazenamento e uso do material biológico humano (sangue, medula óssea, células da mucosa oral) do meu filho para pesquisa científica é uma decisão voluntária, portanto:
- SIM, autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso do material biológico humano.
- NÃO autorizo a coleta, depósito, armazenamento e uso do material biológico humano.

9. Confidencialidade

As informações obtidas farão parte apenas desta pesquisa e serão analisadas em conjunto com outros participantes da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante da pesquisa. Portanto seu sigilo e privacidade de seus dados pessoais será garantido. Se você autorizou o uso de fotografias, tarjas pretas serão utilizadas para evitar a identificação.

Caso deseje tomar conhecimento dos resultados da pesquisa, você será informado sobre os resultados dos testes genéticos e qual o significado desses resultados para seu filho e sua família.

10. Dúvidas

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora responsável é a Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso que pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 horário comercial e (11) 99990-3279 (24 horas).

Se você tiver dúvidas sobre os seus direitos como um participante de um estudo clínico, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética responsável pelo estudo nesta instituição ou com a CONEP.

O Comitê de Ética é um órgão responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante de pesquisa. A CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) é um órgão vinculado ao Conselho Nacional de Saúde que examina os aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos, fazendo e atualizando as regras para a proteção dos participantes de pesquisa, além de coordenar a rede de Comitês de Ética das instituições.

Nome do CEP: CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

Endereço: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar do Prédio da Administração Cerqueira César, 05403-010, São Paulo/SP.

Telefone: (11) 2661-7585 / (11) 2661-1548 / (11) 2661-1549.

Email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Horário de Funcionamento: De segunda a sexta-feira das 07h às 16h.

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Telefones para contato: (61) 3315-5877 ou (61) 3315-5878

Email: conep@saude.gov.br

Endereço: SRTV 701, SRTVN, Edifício PO 700 - Brasília, DF, SRTVN - Asa Norte, Brasília - DF, 70723-040

Horário de Funcionamento: De segunda à sexta-feira, das 8h às 18h

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ESTUDO MOLECULAR E CITOGÉNÉTICO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”. Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este documento terá duas vias. Caso concorde em participar da pesquisa ele deverá ser assinado tanto por você quanto pelo pesquisador . Uma via ficará com você e a outra com o pesquisador.

Nome do Responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

Data

Nome da Testemunha (se aplicável)

Assinatura da Testemunha (se aplicável)

Data

(Somente para o pesquisador) - Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante da pesquisa para a participação neste estudo.

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

Anexo 4, Termo de Assentimento 7 a 11 anosNOME DO MENOR:
.....**DADOS SOBRE A PESQUISA****1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa de nome difícil: “ESTUDO MOLECULAR E CITOGÉNÉTICO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”.

O objetivo dessa pesquisa é entender porque você tem menor quantidade de células em seu sangue. Estas células (glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas) são responsáveis por não termos anemia, infecções e sangramentos. Queremos saber também se esta doença também pode estar presente em seus familiares como pais e irmãos.

Para esta pesquisa vamos precisar coletar um pouco mais do seu sangue (cerca de cerca de 15mL ou 3 colheres de sobremesa) do que já seria necessário para fazer exames habituais. Poderá ser coletado material da sua bochecha com um pequeno cotonete. Para estudar as alterações das células do sangue, sempre precisamos estudar a medula óssea (“tutano”), que é a fábrica destas células. Para isso, fazemos uma anestesia (igual a que os dentistas usam) no osso de sua bacia e aspiramos com uma seringa um pouco do tutano. Nesta pesquisa, durante a realização deste exame para diagnóstico da sua doença, vamos retirar um pouco mais do tutano do que o habitual (será coletado mais 10mL ou 2 colheres de sobremesa).

Ninguém saberá que você está participando deste estudo e seu nome não será divulgado.

Caso tenham sido tiradas fotografias, você poderá ou não permitir que elas sejam divulgadas:

() Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.

() Não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Você não corre riscos ao participar desta pesquisa, mas poderá sentir um pouco de dor no local da picada de agulha na hora da coleta do sangue. Esperamos com esta pesquisa entender melhor a causa da sua doença.

Você poderá sair da pesquisa a qualquer hora, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação; seu atendimento médico e tratamento não serão modificados.

No caso de dúvidas você poderá falar diretamente com os pesquisadores ou pedir a seu responsável para que ele procure os pesquisadores, a fim de resolver seu problema. A Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 e (11) 99990-3279.

Eu _____ aceito participar da pesquisa (Estudo molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda Familiar). Entendi as coisas desconfortáveis e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do menor SP, ____/____/____.

Nome e assinatura do pesquisador SP, ____/____/____.

Anexo 5. Termo de Assentimento familiares 7 a 11 anosNOME DO MENOR:
.....**DADOS SOBRE A PESQUISA****1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa de nome difícil: “ESTUDO MOLECULAR E CITOGÉNÉTICO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”.

O objetivo dessa pesquisa é entender porque seu familiar tem menor quantidade de células em seu sangue. Estas células (glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas) são responsáveis por não termos anemia, infecções e sangramentos. Queremos saber também se esta doença também pode estar presente em você e outras pessoas de sua família.

Para esta pesquisa vamos precisar coletar um pouco mais do seu sangue (cerca de cerca de 15mL ou 3 colheres de sobremesa) do que já seria indicado para fazer exames habituais. Poderá ser coletado material da sua bochecha com um pequeno cotonete.

Ninguém saberá que você está participando deste estudo e seu nome não será divulgado.

Caso tenham sido tiradas fotografias, você poderá ou não permitir que elas sejam divulgadas:

() Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.

() Não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Você não corre riscos ao participar desta pesquisa, mas poderá sentir o desconforto da picada de agulha na hora da coleta do sangue. Esperamos com esta pesquisa entender melhor a causa da doença de seu familiar, mas não haverá mudança no tratamento dele.

Você poderá sair da pesquisa a qualquer hora, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação.

No caso de dúvidas você poderá falar diretamente com os pesquisadores ou pedir a seu responsável para que ele procure os pesquisadores, a fim de resolver seu problema. A Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 e (11) 99990-3279.

Eu _____ aceito participar da pesquisa (Estudo molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda Familiar). Entendi as coisas desconfortáveis e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

_____, SP, ____/____/____.
Assinatura do menor

_____, SP, ____/____/____.
Nome e assinatura do pesquisador

Anexo 6. Termo de Assentimento 12-17 anos

NOME DO MENOR:

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “ESTUDO MOLECULAR E CITOGÉNÉTICO DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”.

O objetivo dessa pesquisa é descrever as alterações presentes no seu sangue, avaliar se existe alguma alteração genética que justifique estas alterações e se estas alterações estão presentes nos seus familiares.

Para realização deste trabalho realizaremos uma coleta de sangue, esta coleta já seria necessária, independente da pesquisa, mas coletaremos uma quantidade maior (cerca de 15mL ou 3 colheres de sobremesa) para realizar testes de avaliação genética. Poderá ser coletado material da sua bochecha com um pequeno cotonete. A coleta de material de medula óssea é um procedimento no qual, após anestesia local, uma agulha é introduzida em osso de quadril e medula óssea (cujo aspecto se assemelha ao sangue) é aspirada. Nesta pesquisa, durante a realização deste exame para diagnóstico da sua doença, vamos retirar um pouco mais de material (será coletado mais 10mL ou 2 colheres de sobremesa) para testes genéticos.

Seu nome assim como todos os dados que lhe identifiquem será mantido em sigilo absoluto antes, durante e após o término do estudo. Ninguém saberá que você está participando.

Caso tenham sido tiradas fotografias, você poderá ou não permitir que elas sejam divulgadas:

() Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário e/ou em aulas para profissionais da saúde.

() Não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Você poderá sentir alguma dor provocada pela picada de agulha na hora da coleta do sangue e apresentar mancha arroxeadada no local da picada.

Os benefícios esperados com o resultado desta pesquisa são entender melhor qual a causa da sua doença e se existe alguma alteração genética relacionada. Não haverá mudança no seu tratamento.

Durante a pesquisa você tem os seguintes direitos:

a) garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta;

b) liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação, sem prejuízo para si, seu familiar ou para seu tratamento (se for o caso);

No caso de dúvidas você poderá nos comunicar ou falar com seu responsável, para que ele procure os pesquisadores, a fim de resolver seu problema. A Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 e (11) 99990-3279.

Eu _____ aceito participar da pesquisa (Estudo molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda Familiar). Entendi as coisas desconfortáveis e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

_____, SP, ____/____/____.

Assinatura do menor

_____, SP, ____/____/____.

Nome e assinatura do pesquisador

Anexo 7. Termo de Assentimento Familiares 12-17 anosNOME DO MENOR:
.....**DADOS SOBRE A PESQUISA****1) TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Estudo Molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda familiar

Pesquisador / CRM: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – CRM 46140 SP
Cargo/Função/Unidade: Médica Hematologista – Serviço de Hematologia
Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Cerqueira César, SP - 05435-000.
Telefones: (11) 4573-7631 (Horário comercial) e (11) 99990-3279 (24 horas).

2) AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

BAIXO (Probabilidade que o indivíduo sofra algum dano em consequência imediata ou tardia do estudo).

3) DURAÇÃO DA PESQUISA:

2 anos.

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “ESTUDO MOLECULAR E CITOGENÉTICO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA/LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA FAMILIAR”.

O objetivo dessa pesquisa é descrever as alterações presentes no sangue de seu familiar, avaliar se existe alguma alteração genética que justifique estas alterações e se estas alterações estão presentes em outros familiares (como você).

Será realizada uma coleta de sangue. Esta coleta já estaria indicada, independente da pesquisa, mas coletaremos uma quantidade maior (cerca de 15mL ou 3 colheres de sobremesa) para realizar testes de avaliação genética.

Seu nome assim como todos os dados que lhe identifiquem será mantido em sigilo absoluto antes, durante e após o término do estudo. Ninguém saberá que você está participando.

Você não corre riscos ao participar desta pesquisa, mas poderá sentir o desconforto da picada de agulha na hora da coleta do sangue.

Os benefícios esperados com o resultado desta pesquisa são entender melhor qual a causa da doença de seu familiar e se existe alguma alteração genética relacionada. Não haverá mudança no tratamento dele ou seu.

Durante a pesquisa você tem os seguintes direitos:

- a) garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta;

b) liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação, sem prejuízo para si, seu familiar ou para seu tratamento (se for o caso);

No caso de dúvidas você poderá nos comunicar ou falar com seu responsável, para que ele procure os pesquisadores, a fim de resolver seu problema. A Dra Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso pode ser encontrada no Laboratório de Citogenética 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do ICHC, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, telefones: (11) 4573-7631 e (11) 99990-3279.

Eu _____ aceito participar da pesquisa (Estudo molecular e Citogenético de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda Familiar). Entendi as coisas desconfortáveis e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do menor SP, ____/____/____.

Nome e assinatura do pesquisador SP, ____/____/____.

Anexo 8. Questionário Epidemiológico

Nome: _____ RG: _____
 Sexo: _____ Data de nascimento: _____ idade: _____
 Telefone: _____

1-TEMPO DE HISTÓRIA HEMATOLÓGICA:

Data diagnóstica: _____

Hipótese diagnóstica (confirmada ou não): _____

Dados relevantes em história e exame físico:

- surdez linfedema verrugas cutâneas ou anogenitais
 Infecções oportunisticas proteinose alveolar
 Tumor sólido qual: _____
 Câncer de pele reticulado de pele Leucoplasia Distrofia ungueal
 Cabelo grisalho precoce petéquias
 Fibrose pulmonar Cirrose hepática
 hipogonadismo menopausa precoce
 Baixa estatura retardo mental Fascies típica
 Alteração de polegar ou similares
 malformação renal ou uro genital: _____
 malformação cardíaca: _____
 outra anormalidade: _____

2-HISTÓRIA FAMILIAR Sim () Não ()

- A- Consanguinidade Sim () Qual,.....
 Não ()
 B- Estigma orgânico Sim () Qual,.....
 Não ()
 C- Dç oncohematológica Sim () Qual,.....
 Não ()
 D- Tumor sólido Sim () Qual,.....
 Não ()

Anamnese ativa

Você ou alguém na sua família tem alteração das células do sangue? Número baixo de glóbulos vermelhos (anemia), baixa contagem de plaquetas (trombocitopenia ou PTI), baixo número de glóbulos brancos (leucopenia, monocitopenia, linfopenia)?

Alguém na sua família já precisou de transfusão de sangue?

Você ou alguém na sua família tem sangramento fácil? Se sim, já precisou receber transfusão?

Você ou alguém na sua família tem verrugas (mãos, pés, genital, outro local)? Se sim, desde quando?

Você ou alguém na sua família tem infecções frequentes ou infecções raras? Se sim, quantas e de que tipo? Precisou internar para receber antibióticos?

Você ou alguém na sua família tem inchaço em braços ou pernas (linfedema) Se sim, qual o membro com alteração e a razão dele ser inchado.

Você ou alguém na sua família é surdo? Se sim, em que idade ocorreu e qual a razão pela qual a pessoa é surda.

Você ou alguém na sua família tem unhas anormais?

Você ou alguém na sua família tem cabelos grisalhos antes dos 20- 30 anos? Se sim, quem e com que idade?

Você ou alguém na sua família tem câncer de pele ou coloração anormal da pele, principalmente na região do pescoço?

Você ou alguém na sua família tem um problema de pulmão chamado fibrose pulmonar, enfisema ou proteinase alveolar?

Você ou alguém na sua família tem uma doença de fígado chamada cirrose hepática? Se sim, em que idade e qual a razão (por exemplo uso de álcool).

Você ou alguém na sua família tem outros tipos de câncer, como câncer de cabeça e pescoço?

Você ou alguém na sua família tem outros tipos de câncer, como câncer de útero ou anal?

Você ou alguém na sua família tem outros tipos de câncer, como câncer de mama precoce, sarcoma, tumor cerebral ou de intestino?

Histórico de exposição:

Você fuma? Quantos cigarros ao dia?

Você bebe álcool? Se sim, quantas doses ao dia?

Você foi exposto a pesticidas (drogas usadas na lavoura)? Se sim, que agentes, quando e quanto durou a exposição?

Você foi exposto à radioterapia ou quimioterapia? Se sim, quais e por quanto tempo? Por que razão?

Você foi exposto a outros químicos como benzeno? Se sim, porque, e por quanto tempo?

Anexo 9

A. Critérios ACMG para evidencia de patogenicidade. Adaptado de Richards et al 2015

Evidência de Patogenicidade	Categoria	Descrição
Muito Forte	PVS1	Variante <i>null</i> (nonsense, frameshift em sítios de splice canônico +- 1 ou 2 , deleção de 1 ou mais éxons em gene onde a perda de função é um mecanismo de doença conhecido
Forte	PS1	Mudança de aminoácido semelhante a variante patogênica previamente descrita, independente de mudança de nucleotídeo
	PS2	Mutação <i>de novo</i> confirmada em paciente com doença e sem história familiar
	PS3	Teste funcional <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecido que apoiam o efeito deletério no gene ou produto gênico
	PS4	A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente maior do que em controles
Moderado	PM1	Localizado em um <i>hot spot</i> mutacional e/ou em um domínio funcional crítico e bem estabelecido sem variante benigna
	PM2	Ausente em controles ou em uma frequência muito baixa se for recessivo no Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project e no Exome Aggregation Consortium
	PM3	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica quando o transtorno é recessivo
	PM4	O comprimento da proteína muda em decorrência de deleção/inserção <i>inframe</i> em região não repetitiva ou variantes tipo <i>stop-loss</i> (perda de codon de parada)
	PM5	Mutação do tipo <i>missense</i> em aminoácido onde uma mutação <i>missense</i> diferente foi previamente identificada e definida como patogênica
	PM6	Mutação presumida como <i>de novo</i> porem sem confirmação materna ou paterna
Apoio ou suporte	PP1	Co-segregação com doença em múltiplos membros da família afetados, em um gene definitivamente conhecido como causador da doença
	PP2	Variante <i>missense</i> em um gene que apresenta baixa taxa de variação benigna do tipo <i>missense</i> e no qual variantes <i>missense</i> são um mecanismo comum de doença
	PP3	Múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério no gene (conservação, evolutivo, impacto no <i>splicing</i>)
	PP4	O fenótipo ou histórico familiar do paciente é altamente específico para uma doença com uma única etiologia genética
	PP5	Fonte respeitável recentemente relata a variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para o laboratório para realizar uma avaliação independente

B. Critérios ACMG para evidencia de benignidade. Adaptado de Richards et al 2015

Evidencia de Benignidade	Categoria	Descrição
Independente	BA1	A frequência do alelo é >5% no Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project e no Exome Aggregation Consortium
Forte	BS1	A frequência do alelo é maior que a frequência esperada do transtorno
	BS2	Observado em um indivíduo adulto saudável para transtorno recessivo (homozigose), dominante (heterozigose) ou ligado ao X com penetrância completa esperada em idade precoce
	BS3	Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos não mostram efeito prejudicial sobre a função da proteína ou <i>splicing</i>
	BS4	Não há segregação nos membros afetados de uma família
Suporte ou apoio	BP1	Variante <i>missense</i> em um gene para o qual se sabe que variantes que causam truncamento da proteína é mecanismo conhecido de doença
	BP2	Variante observada em trans com uma variante patogênica para um gene em transtorno dominante totalmente penetrante ou observado em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança
	BP3	Deleções ou inserções <i>inframe</i> em região repetitiva sem função conhecida
	BP4	Múltiplas linhas de evidencia computacional sugerem não haver um efeito deletério no gene ou seu produto (conservação, evolutivo, impacto no <i>splicing</i>)
	BP5	Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença
	BP6	Fonte respeitável relatou recentemente a variante como benigna, mas as evidências não estão disponíveis para o laboratório realizar uma avaliação independente
	BP7	Uma variante sinônima para a qual os algoritmos não prevêem impacto na sequência de consenso de <i>splicing</i> nem na criação de um novo local de <i>splicing</i> e o nucleotídeo não é altamente conservado

C. Classificação ACMG de variantes e Combinação critérios utilizados para classificação

Categoria	Combinação de critérios
Patogênico	i. 1 muito forte (PVS1) E (a) ≥ 1 forte (PS1-PS4) OU (b) ≥ 2 moderados (PM1-PM6) OU (c) 1 moderado (PM1-PM6) e um de suporte (PP1-PP5) OU (d) ≥ 2 de suporte (PP1-PP5) ii. ≥ 2 fortes (PS1-PS4) OU iii. 1 forte (PS1-PS4) E (a) ≥ 3 moderados (PM1-PM6) OU (b) 2 moderados (PM1-PM6) E ≥ 2 de suporte (PP1-PP5) OU (c) 1 moderado (PM1-PM6) e ≥ 4 de suporte (PP1-PP5)
Provavelmente Patogênico	i. 1 muito forte (PVS1) e 1 moderado (PM1-PM6) OU ii. 1 forte (PS1-PS4) e 1-2 moderado (PM1-PM6) OU iii. 1 forte (PS1-PS4) e ≥ 2 de suporte (PP1-PP5) OU iv. ≥ 3 moderados (PM1-PM6) v. 2 moderados (PM1-PM6) e ≥ 2 de suporte (PP1-PP5) OU vi. 1 moderados (PM1-PM6) e ≥ 4 de suporte (PP1-PP5) OU
Benigno	i. 1 independente (BA1) OU ii. ≥ 2 fortes (BS1-BS4)
Provavelmente Benigno	i. 1 forte (BS1-BS4) e 1 de suporte (BP1-BP7) OU ii. ≥ 2 de suporte (BP1-BP7)
Significado incerto	i. não preenche nenhum dos critérios acima ii. os critérios para benignidade e patogenicidade são contraditórios

Fonte: Adaptado de Richards et al., 2015

9 Apêndices

Apêndice 1



Cancer Genetics 222–223 (2018) 32–37

**Cancer
Genetics**

SHORT COMMUNICATION

Deletion of *RUNX1* exons 1 and 2 associated with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia

Marcela Cavalcante de Andrade Silva^{a,*}, Ana Cristina Victorino Krepischi^c,
Leslie Domenici Kulikowski^d, Evelin Aline Zanardo^d, Luciana Nardinelli^b,
Aline Medeiros Leal^a, Silvia Souza Costa^c, Nair Hideki Muto^e,
Vanderson Rocha^{a,b}, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso^{a,e}

^a Departamento de Hematologia, Laboratório de Citogenética, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR Av. Dr. Eneas de Carvalho 255, Cerqueira César 01246-000, São Paulo, SP, Brazil; ^b Departamento de Hematologia, Laboratório Biologia Tumoral, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR Av. Dr. Eneas de Carvalho 255, Cerqueira César 01246-000, São Paulo, SP, Brazil; ^c Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, SP, Brazil Rua do Matão, 321, Butantã, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil; ^d Departamento de Patologia, Laboratório de Citogenômica do LIM 03, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR. Av. Dr. Eneas de Carvalho 255, Cerqueira César 01246-000, São Paulo, SP, Brazil; ^e Hospital Israelita Albert Einstein. Av. Albert Einstein, 627/701 Morumbi 05652-900 - São Paulo, SP, Brazil

Familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia (FPD/AML) associated with *RUNX1* mutations is an autosomal dominant disorder included in the group of the myeloid neoplasms with germ line predisposition. We describe two brothers who were diagnosed with hematological malignancies (one with AML and the other with T-cell lymphoblastic lymphoma). There was a history of leukemia in the paternal family and two of their siblings presented with low platelet counts and no history of significant bleeding. A microdeletion encompassing exons 1–2 of *RUNX1* (outside the cluster region of the Runt Homology domain and the transactivation domain) was detected in six family members using array-CGH and MLPA validation. A low platelet count was not present in all deletion carriers and, therefore, it should not be used as an indication for screening in suspected families and family members.

Keywords *RUNX1*, Acute leukemia, Myelodysplastic syndrome, Familial thrombocytopenia, Germ line myeloid neoplasm, FPD/AML.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Myeloid neoplasms with germ line predisposition (MNGP) were recently included in the World Health Organization (WHO) 2016 Classification Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. It is likely that these cases are overlooked by hematologists. The study of families with MNGP produces important knowledge of the multistep process of leukemoge-

nesis, and a correct diagnosis has therapeutic implications. Here we describe a new pedigree of familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia (FPD/AML) associated with partial deletion of the Runt related transcription factor 1 (*RUNX1*) gene segregating in individuals without congenital dysmorphisms.

Material and methods

Case presentation

Two brothers with a history of hematological malignancy and persistent thrombocytopenia were referred for investigation (Fig. 1).

Received July 14, 2017; accepted January 16, 2018

* Corresponding author.

E-mail addresses: marcelacas@uol.com.br,

ana.krepischi@ib.usp.br, lesliekulik@usp.br, nair.muto@einstein.br, elvira.velloso@fm.usp.br

2210-7762/\$ - see front matter © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.01.002>

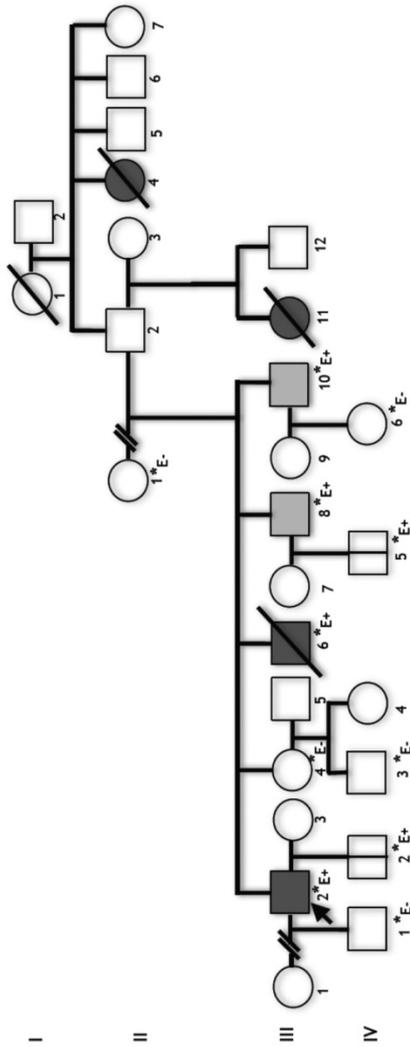


Fig. 1 Family pedigree. White symbols represent unaffected relatives; dark gray filled symbols represent individuals with hematological neoplasms; light gray symbols represent individuals with thrombocytopenia. (◐) represents individuals directly evaluated by authors; E represents RUNX1 exons 1 and 2 microdeletion evaluation. E + : RUNX1 exons 1 and 2 microdeletion detected; E - : RUNX1 exons 1 and 2 microdeletion not detected. Symbols crossed by a vertical line represent asymptomatic individuals who tested positive for RUNX1 exons 1 and 2 microdeletion.

The proband (III-2), male, 21 years old, in first remission of an acute myeloid leukemia (AML) diagnosed at the age of 10 years. Thrombocytopenia was detected 4 years after the end of the treatment. Complete blood count (CBC) showed hemoglobin (Hb): 155 g/L, MCV: 76 fL, white blood cells (WBC): $10.6 \times 10^9/L$, 5.4 neutrophils $\times 10^9/L$ (NE), 4.1 lymphocytes $\times 10^9/L$ (LY) and 89 platelets $\times 10^9/L$ (PLT). Although red blood cells were microcytic, iron deficiency was not detected (serum Iron: 67 $\mu\text{g/dL}$, reference value: 59–158 $\mu\text{g/dL}$; TIBC: 360 $\mu\text{g/dL}$, reference value: 228–428 $\mu\text{g/dL}$; Ferritin 233 $\mu\text{g/L}$, reference value 30–400 $\mu\text{g/L}$). A morphologic review of the peripheral blood smear confirmed thrombocytopenia with normal platelet size. The bone marrow (BM) aspirate was normocellular with hypocellular granulocytic and megakaryocytic lineages. The latter was dysplastic (micromegakaryocytes and hypolobulated megakaryocytes) and the blast count was 2.4%. A Trephine biopsy confirmed normocellularity, megakaryocytic dysplasia and showed an abnormal localization of immature precursors (Supplement Fig. 1). Flow cytometry immunophenotypic analysis of the granulocytic lineage revealed a reduced side scatter (SSC) and a reduced antigenic expression of CD16, CD13, and CD10. There was also an aberrant expression of CD56 and CD7 in the CD117 positive subpopulation. Bone marrow karyotype was normal (Supplement Fig. 2). At the time a diagnosis of MDS (refractory cytopenia with multilineage dysplasia) was suspected. This patient is alive, 5 years after the first consultation at our institution, with stable blood counts and no other relevant clinical findings.

His brother (III-6), 19 years old, was also diagnosed at the age of 10 years with a T-cell lymphoblastic lymphoma (mediastinal mass). There was no involvement of the bone marrow, despite the low PLT count that persisted after remission and the end of the treatment (Brazilian childhood Cooperative group for ALL Treatment protocol - GBTLI ALL-99). At time of referral, a CBC and morphological review of the PB was performed and showed a microcytic anemia (Hb: 100 g/L, MCV: 73,1 fL), the WBC was $3.09 \times 10^9/L$ (NE: $0.8 \times 10^9/L$ and 1% of blasts) and the PLT count was $45 \times 10^9/L$. An iron deficiency was detected with serum iron: 32 $\mu\text{g/dL}$ (reference value 59–158 $\mu\text{g/dL}$); Ferritin: 17 $\mu\text{g/L}$ (reference value 30–400 $\mu\text{g/L}$); Transferrin saturation: 7.88%, although the history of bleeding was mild and an investigation of the gastrointestinal tract did not detect any potential bleeding source. A BM smear revealed a dysplastic granulocytic lineage (hypogranular and pelgeroid neutrophils) with 9% of myeloblasts and a hypocellular and dysplastic megakaryocytic lineage (micromegakaryocytes and hypolobulated megakaryocytes) (Supplement Fig. 1). The BM sample was inadequate for immunophenotypic analysis. A trephine biopsy was normocellular with granulocytic hypoplasia and 5% of CD34+ cells. The bone marrow karyotype showed no clonal abnormalities. He was diagnosed with refractory anemia with excess blasts-1. No matched donor was found, and he died due to AML progression three years later.

CBC prior to the development of hematological malignancy was not available and neither was mutation analysis for AML or T-ALL. Both affected brothers had increased fetal hemoglobin levels (17% and 14.8%, respectively), normal constitutional karyotypes and no increased chromosomal fragility in diepoxybutane (DEB) tests. They did not present dysmorphic features or any other organ dysfunction. Although

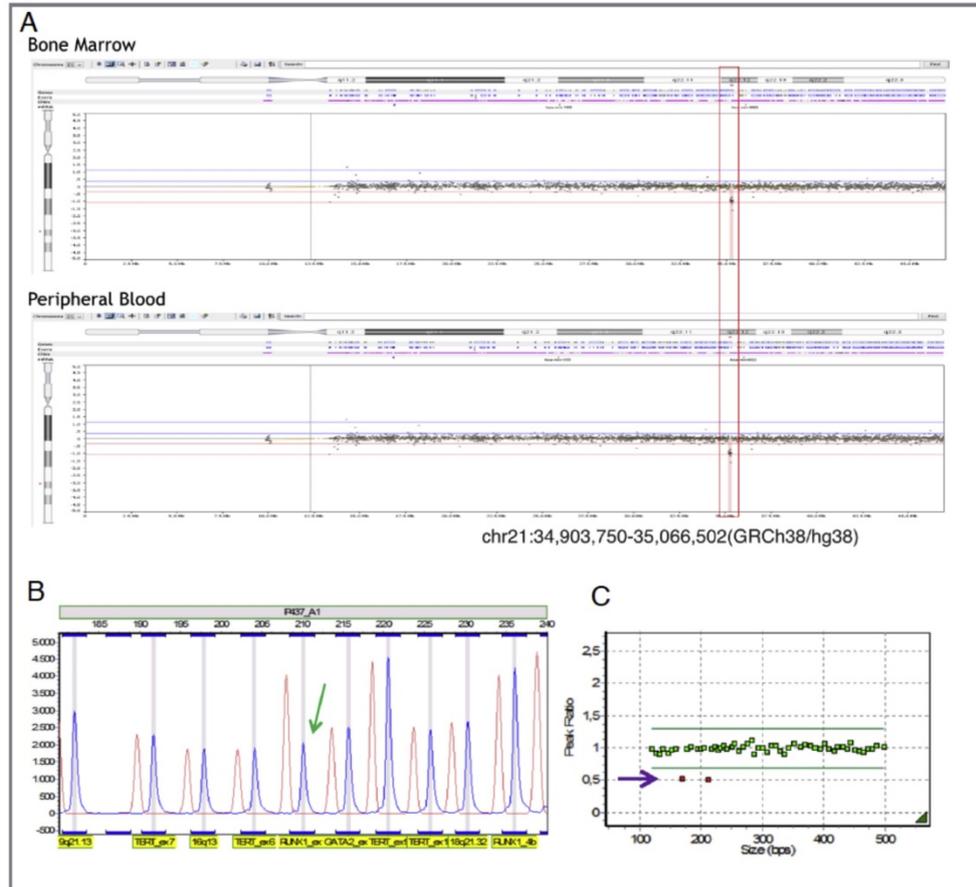


Fig. 2 A. Proband's bone marrow and peripheral blood array-CGH, showing 163 kb microdeletion in 21q22.12 chr21:34,903,750–35,066,502 (GRCh/hg38) (180 K Agilent). B and C. Multiplex ligation-dependent-probe amplification SALSA MLPA probemix p437-A1 Familial MDS-AML (MRC–Holland) from peripheral blood of proband. B: the green arrow indicates sample peak (blue) shorter than the normal control (red). C: Red dots show deletion of *RUNX1* exon 1 and exon 2 probes (purple arrow).

the siblings were diagnosed with a second hematological neoplasm and there was previous exposure to alkylating therapy, the lack of cytogenetic abnormalities made it less likely to be therapy related and for this reason they were classified according to WHO 2008 MDS *de novo* classification.

Two other siblings (III-8; III-10) also presented with a mild thrombocytopenia and no bleeding history. BM studies from III-10 showed low-age-cellularity, mainly in granulocytic and erythrocytic lineages, normal blast counts and hypolobulated megakaryocytes (Supplement Fig. 1). Sibling III-8 refused to perform BM aspirate and biopsy.

Platelet aggregation was determined by light transmittance aggregometry using platelet rich plasma. Spontaneous aggregation (SPT) and aggregation in response to aradonic

acid (AA), collagen (COL); adenine di-phosphate (ADP) were abnormal in siblings III-4, III-6, III-8, III-10 (proband's sample was inadequate for analysis).

The paternal family history revealed two cases of leukemia (II-4, III-11), making a paternal inheritance of MNGP likely but details or complete information were unavailable.

Molecular studies

After informed consent, PB and buccal mucosa (BMu) samples were collected from the patients and from potentially susceptible family members for genetic studies. Father's and other paternal relative's material was not available. Bone mar-

row samples were only collected from individuals presenting with cytenias. We did not perform skin biopsy in this family. Clinical and hematological findings are shown in Supplement Table 1.

Molecular studies included: Direct Sanger sequencing of *RUNX1* exons 3-8, Fluorescent in situ hybridization using probe *ETV6-RUNX1*, ES DC (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA), Array CGH (180K Agilent, Santa Clara, CA, USA) and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) with SALSA probemix P437-A1 Familial MDS-AML (MRC- Amsterdam, Holland).

Results

Direct Sanger sequencing of exons 3-8 of *RUNX1* in PB samples (of individuals II-1, III-2, III-4, III-8, III-10) did not reveal any mutations. Sequencing of exons 1 and 2 was not performed at the time because they were not previously reported to be mutated.

Once direct sequencing produced negative results, we looked for genetic imbalances using FISH probe *ETV6-RUNX1*, ES DC in PB samples of the two patients (III-2, III-4) and it did not identify deletion of *RUNX1* (Supplement Fig. 2).

Array-CGH analysis of all proband's DNA samples (PB, BM and BMu) identified a heterozygous germ line 163 kb microdeletion encompassing part of the *RUNX1* sequence at 21q22.12, through 5' region to intron 2, including exons 1 and 2 [chr21:34,903,750–35,066,502 (GRCh38/hg38)] (Fig. 2). This deletion was also detected in individuals III-6, III-8, III-10, IV-2 and IV-5, the two latter, asymptomatic toddlers. The proband's BM and PB samples Array-CGH investigation also detected a 2.7 Mb deletion at 12q22 [chr12: 93,072,890–95,766,754(GRCh38/hg38)], that was not present neither in his BMu sample nor in his sibling's, indicating a somatic acquisition. (Supplement Fig. 2)

The genomic DNA from peripheral blood of the patients II-1, III-2, III-4, III-8, III-10, IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-5 and IV-6 were screened using the SALSA MLPA probemix P437-A1 Familial MDS-AML, that can detect copy number alterations of the *GATA2*, *TERC*, *TERT*, *CEBPA* and *RUNX1* genes. The MLPA analysis confirmed the deletion of *RUNX1* exons 1 and 2 in patients III-2, III-8, III-10, IV-2 and IV-5 (Fig. 2).

Discussion

This new family with the diagnosis of FPD/AML carries a deletion of *RUNX1* encompassing exons 1 and 2. Although fibroblast material analysis is recommended to confirm the germ line nature of mutations in hematological malignancies (as peripheral blood may be contaminated with clonal cells) the segregation of the micro deletion in the family can be used to corroborate the inherited trace.

Familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia (FPD/AML) (OMIM #601399) is an autosomal dominant disorder with an association of thrombocytopenia, platelet dysfunction and a predisposition to myeloid malignancies associated with *RUNX1* mutations. It is part of the group of MNGP with preexisting platelet disorders that also includes Thrombocytopenia 2 (*ANKRD26* mutations) and Thrombocytopenia 5 (*ETV6* mutations) [1]. It is not possible

to differentiate which gene is behind MNGP with preexisting platelet disorders based solely on clinical presentation. FPD/AML, thrombocytopenia 2 and thrombocytopenia 5 all have low platelet count with normal platelet size and mild bleeding tendencies [2].

During embryonic stages of hematopoiesis, *RUNX1* is essential for the formation of hematopoietic stem cells and during the adult phase it participates in the maturation of megakaryocytes, B and T lymphocytes [3]. Two basic genetic mechanisms are implied in FPD/AML: haploinsufficiency and dominant negative mutations. It seems that all mutations have the same effect in megakaryocytic differentiation and hematopoietic stem cell emergence [4] but granulomonocytic progenitors present an increased proliferative rate and genomic instability that induces a preleukemic state when the levels of *RUNX1* are very low, such as those seen in dominant negative mutations [5]. Although thrombocytopenia is supposed to be an omnipresent disease characteristic, cases with no prior thrombocytopenia or bleeding history have been described [5,6]. Even in the same pedigree not all *RUNX1* mutation carriers are thrombocytopenic as is seen in the family studied (Supplement Table 1) and even though abnormal platelet aggregation was present in all affected family members in a manner previously described in FPD/AML [7,8], a sibling (III-4) not affected by the *RUNX1* microdeletion also had abnormal aggregation tests.

At least 70 families with inherited *RUNX1* mutations and FPD/AML have been reported [9]. Myeloid neoplasms are the most common presentation, but cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL) [10–13] and even hairy cell leukemia¹⁰ have also been described. The estimated risk of hematological malignancies varied from 35% to 40% in pedigrees. AML and MDS are the most prevalent, followed by T-cell ALL (9 cases). Nearly half of the patients (4/9) with T-cell ALL later developed AML, as was the case with our patient (III-6). Age at presentation of malignancy varied from 6 to 72 years [4,10,12], making the point that this inherited predisposition is also an adult issue and not confined to the pediatric population.

The correct diagnosis of myelodysplastic syndromes is a challenge in patients with FPD/AML. Recent studies suggests that megakaryocytic dysplasia can be present even in the absence of MDS [14,15], and at the time of our cases' diagnosis it was erroneously used as criteria for the diagnosis of MDS that was reinforced (albeit these are not diagnostic criteria) by immunophenotypic findings and abnormal localization of immature precursors. Although no cytogenetic abnormalities were identified by conventional karyotyping, a somatic deletion of chromosome 12 was detected by CGH array in our proband (Supplemental Fig. 2). The presence of the dysmorphic small and hypobulbated megakaryocytes in the three patients, even in the sibling III-10 that had no other hematological findings, except for thrombocytopenia, is in agreement that FPD/AML baseline morphologic BM includes dysplastic megakaryopoiesis, not indicative of MDS evolution.

In patients highly suspicious of FPD/AML negative results from PCR amplification and direct sequencing or next generation sequencing assays must be analyzed with caution and further investigations to address copy number variation (such as CGH array) should be considered. When malformations and physical abnormalities are present, deletions of *RUNX1* tend to be *de novo* deletions and are probably associated with

deletion of other genes which are adjacent to *RUNX1* [15–17] and it is our belief that these cases should be analyzed separately. But large intragene duplications or deletions without dysmorphisms such as seen in our case have been described and identified using CGH array [11,14,18] and would otherwise be missed.

Almost all reported pedigrees have different *RUNX1* mutations with predominance of mutations in the RUNT domain followed by transactivation domain. Apart from a *de novo* congenital translocation involving intron 1 of *RUNX1* [19], to our knowledge, all deletions described so far involved larger portions of *RUNX1* [11,14,20] or a deletion in exon 5 [18]. The expression of *RUNX1* is controlled by two promoters: P1 and P2 [21]. In the family here described, the deletion affected exon 1 and 2, consequently deleting the distal promoter (P1) but preserving the second promoter (P2) located in the intronic region between exons 3 and 4. This deletion can potentially induce haploinsufficiency of isoform RUNX1c (a product of the deleted distal promoter P1) and an imbalance between the two most relevant isoforms of *RUNX1*. RUNX1c although structurally very similar to isoform RUNX1b (product of proximal promoter P2) seems to have different functions in hematopoiesis. The first, apparently promotes proliferation and survival of megakaryocytes while the second induces its maturation and platelet production [22].

Diverse clinical features might result from the heterogeneity of *RUNX1* mutations but also from secondary mutations. In the multistep process of leukemogenesis, the presence of a *RUNX1* mutation probably predisposes secondary mutations. These secondary “hits” seem to be necessary for development of leukemia. Acquired mutations in the homologous *RUNX1* gene have been reported [11,13] and were found in all patients who developed acute leukemia in a French cohort suggesting a crucial role in disease progression. Acquired mutations in other genes previously described to be involved in leukemias are also frequent and heterogeneous [13].

Conclusion

We described this new family with FPD/AML associated with a partial *RUNX1* deletion encompassing exons 1 and 2 potentially resulting in haploinsufficiency of RUNX1c isoform. The identification and further study of these families can help elucidate the functions and importance of different *RUNX1* isoforms in hematopoiesis. Thrombocytopenia was not detected in all deletion carriers and should not be used as a trigger to initiate investigation in suspected family members. All suspected cases should be thoroughly investigated as conventional sequencing techniques might miss large gene deletions.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

We thank Maria Gabriella Cordeiro for her invaluable help during the course of this study with sample sorting and collection. We also thank Professor Chong AE Kim and Fernanda T Lima, Professor Israel Bendit and Professor Carla Rosenberg for support in genetic counseling, molecular sequencing and array-CGH studies, respectively, and Jussara Bianchi Castelli MD, PhD for BM histological pictures.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cancer.2018.01.002.

References

- [1] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- [2] Churpek JE, Godley LA. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood* 2016;128(14):1800–13. doi:10.1182/blood-2016-05-670240.
- [3] Mangan JK, Speck NA. *RUNX1* mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncog* 2011;16(1-2):77–91. doi:10.1002/nbm.3066.Non-invasive.
- [4] Béri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline *RUNX1* haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 2008;16(8):1014–18. doi:10.1038/ejhg.2008.89.
- [5] Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, et al. Level of *RUNX1* activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood* 2015;125(6):930–40. doi:10.1182/blood-2014-06-585513.
- [6] Ripperger T, Steinemann D, Göhring G, et al. A novel pedigree with heterozygous germline *RUNX1* mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation. *Leukemia* 2009;23(7):1364–6. doi:10.1038/leu.2009.87.
- [7] Badin MS, Iyer JK, Chong M, et al. Molecular phenotype and bleeding risks of an inherited platelet disorder in a family with a *RUNX1* frameshift mutation. *Haemophilia* 2017;23(3):e204–13. doi:10.1111/hae.13169.
- [8] Glembotsky AC, Bluteau D, Espasandin YR, et al. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate *RUNX1* targets. *J Thromb Haemost* 2014;12(5):761–72. doi:10.1111/jth.12550.
- [9] Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of *RUNX1* in hematological malignancies. *Blood* 2017;129(15) blood-2016-10-687830. doi:10.1182/blood-2016-10-687830.
- [10] Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, et al. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to hematological malignancies: a nationwide survey in Japan. *Ann Oncol* 2016;27(5):887–95. doi:10.1093/annonc/mdw066.
- [11] Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of *RUNX1* biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 2009;113(22):5583–7. doi:10.1182/blood-2008-07-168260.

Deletion of RUNX1 exons 1 and 2 associated with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia 37

- [12] Owen CJ, Toze CL, Koochin A, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood* 2008;112(12):4639–45. doi:10.1182/blood-2008-05-156745.
- [13] Antony-Debré I, Duployez N, Buccì M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(4):999–1002. doi:10.1038/leu.2015.236.
- [14] Kanagal-Shamanna R, Loghavi S, Dinardo CD, et al. Bone marrow pathologic abnormalities in familial platelet disorder with propensity for myeloid malignancy and germline RUNX1 mutation. *Haematologica* 2017;102(10):1661–70. doi:10.3324/haematol.2017.167726.
- [15] Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, et al. Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11(1):49. doi:10.1186/s13023-016-0432-0.
- [16] van der Crabben S, van Binsbergen E, Ausems M, Poot M, Bierings M, Buijs A. Constitutional RUNX1 deletion presenting as non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia: 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation. *Leuk Res* 2010;34(1):8–12. doi:10.1016/j.leukres.2009.06.030.
- [17] Schlegelberger B, Heller PG. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin Hematol* 2017;54(2):75–80. doi:10.1053/j.seminhematol.2017.04.006.
- [18] Jongmans MCJ, Kuiper RP, Carmichael CL, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* 2010;24(1):242–6. doi:10.1038/leu.2009.210.
- [19] Buijs a, Poot M, van der Crabben S, et al. Elucidation of a novel pathogenomic mechanism using genome-wide long mate-pair sequencing of a congenital t(16;21) in a series of three RUNX1-mutated FPD/AML pedigrees. *Leukemia* 2012;26(9):2151–4. doi:10.1038/leu.2012.79.
- [20] Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166–75. doi:10.1038/13793.
- [21] Martinez M, Hinojosa M, Trombly D, et al. Transcriptional auto-regulation of RUNX1 P1 promoter. *PLoS One* 2016;11(2):1–17. doi:10.1371/journal.pone.0149119.
- [22] Bruijn MDe, Dzierzak E. RUNX transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood* 2017;129(15):2061–70. doi:10.1182/blood-2016-12-689109.