

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA SATIKO PASTORE SAITO

VALIDAÇÃO “*IN HOUSE*” DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE
ALTERAÇÕES GENÔMICAS DE ALTO RISCO EM MIELOMA MÚLTIPLO PELO
MÉTODO DE *FISH*

CURITIBA

2024

VALIDAÇÃO “*IN HOUSE*” DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
GENÔMICAS DE ALTO RISCO EM MIELOMA MÚLTIPLO PELO MÉTODO DE
FISH

Trabalho de conclusão de curso apresentado
requisito parcial à obtenção do título de
Biomédico, Curso de Graduação em Biomedicina,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof.(a). Daniel Pacheco Bruschi

CURITIBA

2024

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA SATIKO PASTORE SAITO

VALIDAÇÃO “*IN HOUSE*” DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS DE ALTO RISCO EM MIELOMA MÚLTIPLO PELO MÉTODO DE *FISH*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi
Orientador – Departamento de Genética – UFPR

Prof. Dr. Kaleb Pretto Gatto
Departamento de Genética - UFPR

Curitiba, 20 de dezembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde, pois sem elas não estaria aqui.

Pela minha família e amigos, pelo apoio durante todo esse percurso.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

À Universidade Federal do Paraná, por permitir a realização deste projeto.

Ao Centro de Oncohematologia do Hospital Erasto Gaertner, pela parceria e auxílio na obtenção das amostras.

Ao Centro De Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF - UFPR), pela disponibilidade dos equipamentos de microscopia, e à CAPES e FINEP, que possibilitaram a obtenção dos equipamentos recursos do Edital Pró-Equipamentos (CAPES) e do Edital Pró-Infra 2009 (CT-INFRA) da FINEP.

À FINEP, pelo financiamento ao projeto “Desenvolvimento de uma plataforma multidimensional de identificação, diagnóstico e rastreamento de biomarcadores de mieloma múltiplo do estado Paraná” de registro 0 1.23.0348.00, do qual este trabalho faz parte.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o processo de aprendizado.

RESUMO

O MM afeta as células plasmáticas da medula óssea, sendo caracterizado pela produção excessiva de anticorpos anormais (proteína M) e a presença de sinais clínicos, como lesões ósseas, insuficiência renal, anemia e hipercalcemia (conhecida como síndrome CRAB). Sua incidência é maior em indivíduos acima de 65 anos, homens e afrodescendentes. Alterações genéticas são detectáveis em 90% dos pacientes, e não apenas impactam o diagnóstico, mas também desempenham um papel importante na estratificação de risco e no direcionamento terapêutico. O trabalho apresentado valida sondas “*in house*” para detecção de alterações genômicas de alto risco em pacientes com Mieloma Múltiplo (MM), utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Foram avaliadas translocações *IGH/FGFR3* (t(4;14)) e *IGH/MAF* (t(14;16)), que estão associadas ao alto risco e estão inclusos no painel do CONITEC. A metodologia utilizada foi a partir da execução do FISH em 5 amostras de aspirado de MO em pacientes com MM e em um controle negativo. As imagens foram capturadas em microscopia confocal de fluorescência, e analisadas a partir do programa FIJI/IMAGE J, determinando-se valores de corte (*cut-off*) para identificação de alterações genômicas significativas. O estudo confirmou a validade das sondas para uso laboratorial, obtendo valores de *cut-off* de 14 e 12, para as fusões *IGH/FGFR3* e *IGH/FGFR3*, respectivamente.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Validação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 OBJETIVOS	6
1.2 JUSTIFICATIVA	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 MIELOMA MÚLTIPLO	7
2.2 DIAGNÓSTICO	7
2.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS.....	8
2.3.1 REARANJOS DE IGH AVALIADOS CONFORME PRERROGATIVA DO CONITEC	10
2.3.1.1 t(4;14)(q32;q23) - <i>IGH/FGFR3</i>	10
2.3.1.2 t (14;16)(q32;q23) - <i>IGH/MAF</i>	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 AMOSTRAGEM	11
3.2 CULTIVO.....	11
3.3 <i>FISH</i>	11
3.3.1 SONDA PARA FUSÃO <i>IGH/FGFR3</i>	12
3.3.2 SONDA PARA FUSÃO <i>IGH/MAF</i>	13
3.4 CAPTURA E ANÁLISE.....	14
4 RESULTADOS.....	16
4.1 FUSÃO <i>IGH/FGFR3</i>	16
4.2 FUSÃO <i>IGH/MAF</i>	17
4.3 DADOS DOS PACIENTES E RESULTADOS GERAIS.....	17
5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

O Mieloma Múltiplo (MM) é um câncer hematológico que afeta as células plasmáticas, principalmente em idosos, e possui um diagnóstico clínico difícil. Uma das etapas para o diagnóstico diferencial é a caracterização das alterações genéticas, que permite ao médico definir o grupo de risco do paciente, e até o momento, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) é tida como padrão ouro para esta caracterização.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é realizar a validação de duas sondas para detecção de alterações genômicas de alto risco em pacientes com MM para uso *in house*. O objetivo específico deste trabalho é encontrar os valores de *cut-off* para as duas sondas utilizadas.

1.2 JUSTIFICATIVA

Esta validação é necessária para permitir que essas sondas sejam utilizadas para o diagnóstico médico, possibilitando um aumento na qualidade do serviço de Citogenética Clínica do Laboratório de Citogenética Evolutiva e Conservação Animal, presente na Universidade Federal do Paraná.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MIELOMA MÚLTIPLO

O Mieloma Múltiplo (MM) é um tipo de câncer hematológico que afeta as células plasmáticas na medula óssea (MO), e caracterizado pela presença da Proteína M no sangue periférico e na urina (Chesi e Bergsagel, 2013). A doença tem uma incidência maior em indivíduos afro-americanos, do sexo masculino e de mais de 65 anos (Waxmen *et al.*, 2010; Padala *et al.*, 2021; Cowan *et al.*, 2018). Os principais sinais clínicos da doença são caracterizados pela síndrome CRAB, sigla do inglês para hipercalcemia, falência renal, anemia e dor óssea, causada por microfraturas (Padala *et al.*, 2021).

2.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença requer a presença de pelo menos um evento característico da doença em conjunto com a presença de no mínimo 10% de clones de células plasmáticas ou de plasmocitoma confirmado por biópsia (Rajkumar, 2024). Os eventos característicos podem ser: presença estabelecida dos sinais CRAB; presença $\geq 60\%$ de clones de células plasmáticas na MO; mais de uma lesão focal visualizada em ressonância magnética; e uma razão ≥ 100 de cadeias leves de imunoglobulinas livres no soro (Rajkumar, 2020).

O diagnóstico rápido e no início da doença, em conjunto com a correta identificação da estratificação de risco de acordo com as alterações genéticas permitem o início do tratamento que proporciona uma melhor qualidade de vida e estende a sobrevida (Yu *et al.*, 2020). As alterações genéticas podem ser analisadas por cariotipagem (citogenética convencional), hibridização *in situ* fluorescente (FISH), reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) ou técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) (Yu *et al.*, 2020).

A cariotipagem é uma técnica inespecífica, sendo utilizada para qualquer patologia envolvendo alterações genéticas, incluindo o MM, mas sua limitação se deve à sua necessidade do crescimento celular em cultivo (dificultado ainda mais pela baixa taxa de mitose das células plasmáticas *in vitro*) e sua baixa resolução, que não permite a identificação de algumas alterações como t(4;14) e t(14;16)

(Rajkumar, 2020). O FISH torna-se, então, o padrão ouro para o diagnóstico diferencial do MM, possuindo uma maior resolução e sendo alvo-específica para a alteração genética (Rajkumar, 2020). O FISH é uma técnica alvo-específica onde se pesquisa uma única alteração por sonda, exigindo conhecimento prévio da doença para que se saiba qual sonda utilizar, porém, no caso de doenças onco-hematológicas é necessário que um painel seja preparado com mais de uma sonda, elevando o custo da técnica (Yu *et al*, 2020). Para a realização de FISH no MM, o ideal é enriquecer a amostra pesquisada com células CD138 positivo, seja por citometria de fluxo ou separação com *beads* magnéticas, pela dificuldade do crescimento dos plasmócitos em cultivo celular, a principal limitação para a realização da citogenética convencional no MM (Yu *et al*, 2020).

No Brasil, de acordo com as diretrizes da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC), além da obrigatoriedade da citogenética convencional para o diagnóstico, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza a técnica de *FISH* para a identificação das alterações genéticas na classificação e na classificação de risco de pacientes recém-diagnosticados. O painel para a investigação por *FISH* consiste nas alterações t(4;14)(p16;q32), del(17p13) e t(14;16)(q32;q23) (CONITEC, 2022).

2.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS

As alterações genéticas no MM são detectáveis em aproximadamente 90% dos pacientes e podem ser classificadas em primárias, que ocorrem tradicionalmente no início da doença, e secundárias, geralmente sendo identificadas de acordo com o progresso da doença (TABELA 1). As alterações primárias, por sua vez, podem ser divididas em duas categorias, alterações numéricas e translocações envolvendo o gene de cadeia pesada das imunoglobulinas (*IGH*) (Rajkumar, 2024).

As alterações numéricas podem ser trissomias, que normalmente ocorrem em cromossomos ímpares (principalmente nos cromossomos 3, 5, 7, 11 e 21), ou hiperdiploidias, com células apresentando de 48 a 75 cromossomos (Clarke, Fuller e Erber, 2024). Essas alterações, quando sozinhas, indicam um prognóstico padrão de médio risco, e raramente ocorrem em conjunto com alterações no *locus IGH* (Testa *et al.*, 2024).

Translocações envolvendo o *locus IGH* (14q32) estão presentes em mais da metade dos casos de MM, e possivelmente resultam de erros nos processos de hipermutação somática ou *switch* de classe (Bergsagel e Kuehl, 2001). Essas translocações podem ser detectadas por *FISH*, e sua frequência tende a aumentar com a progressão da doença (Fonseca *et al.*, 2010). As translocações mais comuns que envolvem este *locus* em pacientes com MM são t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q11) e t(6;14)(p21;q32), e envolvem os *loci* 11q13 (*CCND1*), 4p16 (*FGFR3/MMSET*), 16q23 (*C-MAF*), 20q11 (*MAFB*) e 6p21 (*CCND3*) (du Pont *et al.*, 2017). Os genes envolvidos são regulados positivamente devido aos promotores do gene *IGH*, levando a uma vantagem seletiva de crescimento para a célula (Cardona-Benavides, de Ramón e Gutiérrez, 2021).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO CITOGENÉTICA/MOLECULAR PRIMÁRIA E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO NO MIELOMA MÚLTIPLO.

Alteração genética	Genes afetados	Estratificação de risco (de acordo com SG)	Estratificação de risco (de acordo com mSMART)	Pacientes com MM (%)
Primárias				
Hiperdiploidia	Trissomia de cromossomos ímpares, com exceção dos cromossomos 1, 13 e 21	Baixo	Padrão	45
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i> (<i>Ciclina D1</i>)	Baixo	Padrão	20
t(6;14)(p21;q32)	<i>CCND3</i> (<i>Ciclina D3</i>)	Baixo	Padrão	5
t(4;14)(p16;q32)	<i>NSD2</i>	Intermediário	Alto	10
t(14;16)(q32;q23)	<i>C-MAF</i>	Intermediário	Alto	4
t(14;20)(q32;q11)	<i>MAFB</i>	Intermediário	Alto	<1
Secundárias				
Gain(1q21)	<i>CKS1B</i> , <i>MCL1</i> , <i>ADAR1</i> , <i>IL6R</i> , <i>ANP32E</i> , entre outros	Intermediário	Alto	5
Del(17p)	<i>P53</i>	Alto	Alto	
Normal*		Baixo	-	

FONTE: Adaptada de Rajkumar (2024).

Risco Baixo: sobrevida geral (SG) média de 10 anos; Risco Alto: SG média de 5 anos; Risco Intermediário: SG média de 7 anos. Alterações Primárias: Hiperdiploidia e rearranjos de *IGH*;

Alterações Secundárias: outras anormalidades citogenéticas ou citogenética normal. mSMART: Mayo clinic risk stratification for multiple myeloma. *SG >10 anos.

2.3.1 REARANJOS DE IGH AVALIADOS CONFORME PRERROGATIVA DO CONITEC

2.3.1.1 t(4;14)(q32;q23) - *IGH/FGFR3*

A t(4;14) ocorre em aproximadamente 10 a 15% dos pacientes com MM, e sua frequência diminui com a idade (Cardona-Benavides, de Ramón e Gutiérrez, 2021). A alteração acarreta na desregulação de 2 proto-oncogenes: receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3 (*FGFR3*) e Domínio Proteico de Receptor Nuclear Ligante *SET 2* (*NSD2* ou *MMSET*) (4p16.3) (Chesi *et al.*, 1998), e é classificado como marcador de alto risco pelo Sistema Internacional de Estadiamento Revisado (R-ISS).

2.3.1.2 t(14;16)(q32;q23) - *IGH/MAF*

A translocação t(14;16) envolve os genes *IGH* e *c-MAF*, e resulta na superexpressão do fator de transcrição *c-MAF*, que resulta no aumento de ciclina D2, aumentando a síntese de *DNA* e a proliferação celular (Manier *et al.*, 2017). A translocação é encontrada em cerca de 2 a 5% dos pacientes com MM, e considerada uma alteração de alto risco (Rajkumar, 2022; Clarke, Fuller e Erber, 2024). Em conjunto com a t(14;20), que envolve o gene *MAFB*, as duas estão associadas a um aumento na quantidade de proteína M circulante, e um maior risco de falência renal (Rajkumar, 2022)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Todas as amostras foram obtidas de pacientes do serviço de citogenética clínica do Laboratório de Citogenética Evolutiva e Conservação Animal, através de aspirado de MO, coletadas em tubo com anticoagulante heparina sódica e armazenadas como *pellet* citogenético (em fixador Carnoy, 5 partes de metanol para 2 parte de ácido acético). O controle negativo (CN) foi composto por um *pool* de 5 amostras de MO de indivíduos não portadores de MM, enquanto as outras amostras testadas foram de pacientes com diagnóstico prévio de MM.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (CEP - UFPR) no parecer 6.578.321, e todos os pacientes selecionados foram esclarecidos sobre e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 CULTIVO

As amostras em heparina foram cultivadas em duplicata em meios para cariótipo com RPMI (5 mL, *vitrocell*) com volumes de 300µL e 600µL, respectivamente; cultivadas por 72h e posterior adição de 25µL de colchicina para interromper o ciclo.

As amostras passaram por uma etapa de hipotonia celular por 20 minutos, utilizando 6 mL de uma solução de KCl 0,56% com HEPES, que foi interrompida com 1 mL de fixador Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético). Foram feitas, então, 3 lavagens com 6 mL de fixador Carnoy 5:2 (metanol:ácido acético), e as amostras foram armazenadas em temperatura refrigerada (4°C).

3.3 FISH

O cultivo com maior quantidade de núcleos foi selecionado para a preparação da lâmina de *FISH*, a partir da comparação dos *pellets* de células. A amostra foi aplicada sobre lâmina de vidro (26x76mm), que recebeu lavagens com soluções de diferentes concentrações de SSC (sal de tampão de cloreto de

sódio/citrato de sódio). A desnaturação do *DNA* foi feita com uma solução de NaOH 70 mM, e em seguida passou por uma desidratação em série de álcoois (etanol 70%, 85% e 100%).

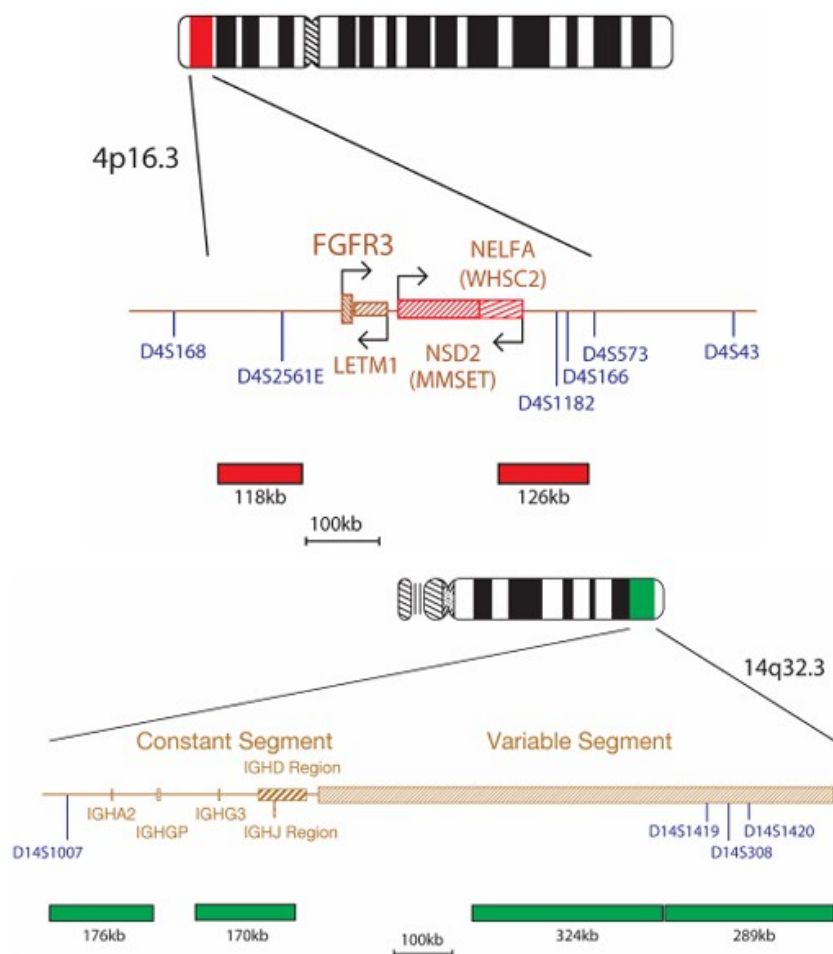
Em um ambiente protegido de luz, foi aliquotado 4µL da sonda para cada paciente, para a lamínula de vidro redonda com 15 mm de diâmetro. A sonda foi desnaturada em banho maria a 75°C por 5 min, e imediatamente aplicada na lâmina. A lamínula foi colocada sobre a amostra com a sonda, selada com cola plástica e mantida de 16 a 48h em câmara úmida em estufa a 37°C para hibridização.

Após o período de hibridização, a lamínula foi retirada e a lâmina foi lavada em soluções 0,4xSSC/0,25% Tween-20 e 2xSSC/0,05% Tween-20, respectivamente, desidratadas em soluções de álcoois (70%, 85% e 100%) e seca em temperatura ambiente. Depois de seca, foi aplicado sobre a amostra 6 µL do marcador DAPI com antifade para marcação do núcleo e preservação de sinais das sondas. Uma nova lamínula foi colocada, selada, e armazenada em ambiente refrigerado (4°C), para depois ser analisada.

3.3.1 SONDA PARA FUSÃO IGH/FGFR3

A sonda utilizada para a visualização da t(4;14) é *IGH/MAF Plus Translocation, Dual Fusion Probe*, da marca *Cytocell*. O sinal vermelho corresponde ao gene *FGFR3*, na região 4p16.3, e o sinal verde corresponde ao gene *IGH*, na região 14q32.33, conforme a FIGURA 1

FIGURA 1 - DESENHO DAS REGIÕES ABRANGIDAS PELA Sonda *IGH/FGFR3 PLUS TRANSLOCATION*

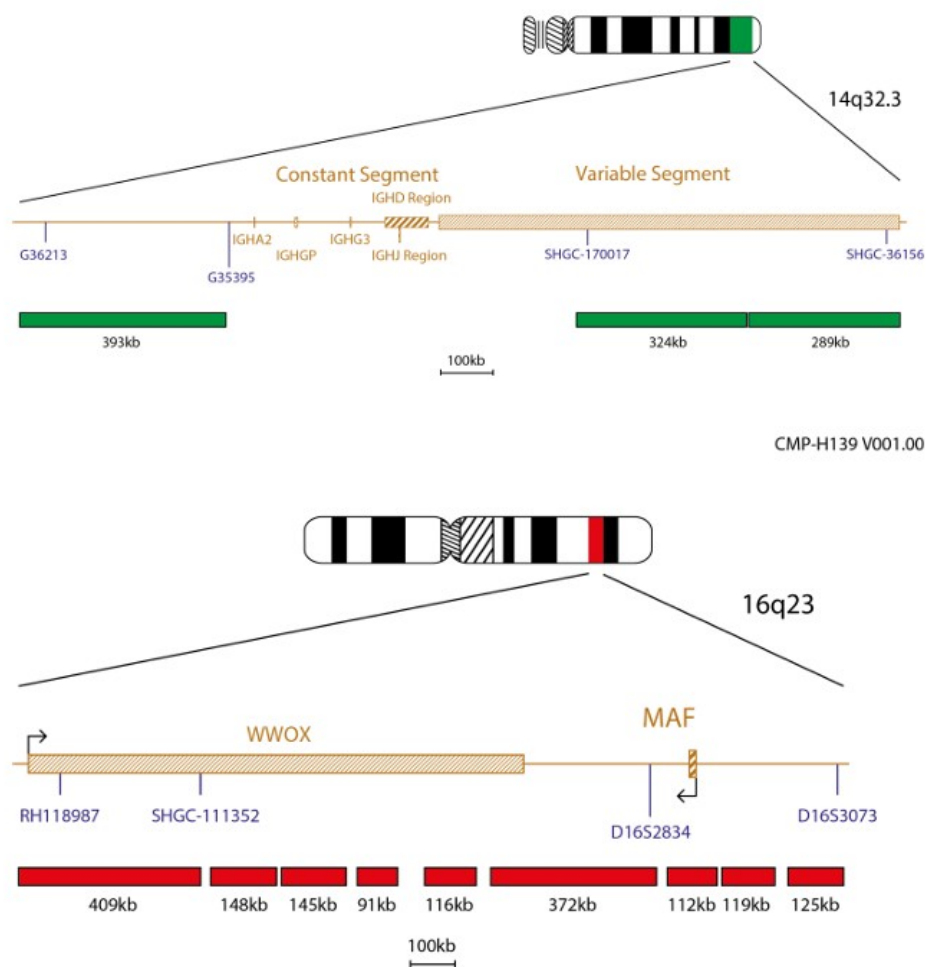


Fonte: Cytocell (2021)

3.3.2 Sonda PARA FUSÃO *IGH/MAF*

A sonda utilizada para a visualização da *t(14;16)* é *IGH/MAF Plus v2 Translocation, Dual Fusion Probe*, da marca Cytocell. O sinal vermelho corresponde ao gene *MAF*, na região 16q23, e o sinal verde corresponde ao gene *IGH*, na região 14q32.33, conforme a FIGURA 2.

FIGURA 2 - DESENHO DAS REGIÕES ABRANGIDAS PELA SONDA *IGH/MAF PLUS TRANSLOCATION*



Fonte: Cytocell (2023)

3.4 CAPTURA E ANÁLISE

A análise foi realizada em microscopia confocal de fluorescência com sistema de captura da marca Nikon, modelo A1R MP, sendo capturados 200 núcleos interfásicos para cada sonda por paciente. As imagens foram analisadas com auxílio do programa FIJI/Image J, e a contagem dos sinais foi realizada utilizando as cores verde, vermelho e amarelo em inglês (*green*, *red* e *yellow*) para eliminar a ocorrência de erro na interpretação dos sinais. O cálculo para determinação do valor de *cut-off* foi realizado utilizando a função CRITBINOM no *Microsoft Excel*, com probabilidade de 95% (Ciolino, Tang e Bryant, 2009).

As amostras foram consideradas positivas para a translocação analisada se obtiveram um valor de sinais de fusão (sinal amarelo ou *yellow*) maior que o valor do *cut-off*.

4 RESULTADOS

4.1 FUSÃO *IGH/FGFR3*

Para a fusão *IGH/FGFR3* foram obtidos os resultados de 3 pacientes com MM, além do CN. Os resultados podem ser observados na TABELA 2, enquanto a FIGURA 3 apresenta 2 imagens capturadas em microscopia de fluorescência do controle negativo.

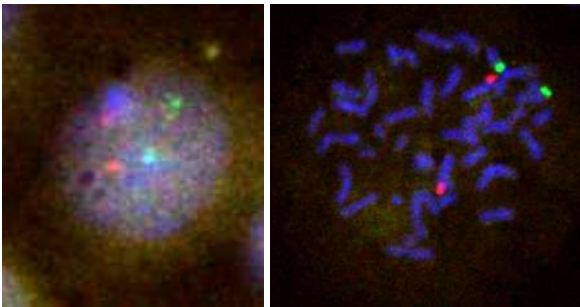
O resultado do cálculo do *cut-off* foi 14, logo pode-se considerar que o paciente B apresenta a fusão *IGH/FGFR3*.

TABELA 2: RESULTADOS DA SONDA *IGH/FGFR3*

SINAL OBTIDO	CN	PACIENTE A	PACIENTE B	PACIENTE C
2R2G	186	176	170	186
1R1G2Y	9	12	18	9
1R2G	2	3	2	0
2R1G	1	2	5	0
1R1G	0	4	2	4
1R1G1Y	2	3	3	1
TOTAL	200	200	200	200

LEGENDA: Os valores representam a quantidade de núcleos da amostra com o sinal correspondente. 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes (2R2G), representado um sinal normal, sem translocações; 1 sinal vermelho, 1 sinal verde e 2 sinais amarelos (1R1G2Y), representando o sinal alterado com uma translocação equilibrada; 1 sinal vermelho e 2 verdes (1R2G); 2 sinais vermelhos e 1 verde (2R1G); 1 sinal vermelho e 1 verde (1R1G); 1 sinal vermelho, 1 sinal verde e 1 sinal amarelo (1R1G1Y Os sinais 1R2G, 2R1G, 1R1G e 1R1G1Y (dentro do *cut-off*) foram considerados como variações no padrão de sinais que podem ocorrer na técnica.

FIGURA 3: FOTOS DO SINAL 2R2G OBTIDAS EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA



Fonte: A Autora (2024)

Legenda: Ambas as fotografias, obtidas a partir do controle negativo, apresentam o mesmo tipo de sinal (2R2G) esperado de uma célula saudável. A imagem da esquerda mostra este sinal em um núcleo interfásico, e a imagem da direita apresenta o sinal em uma metáfase.

4.2 FUSÃO *IGH/MAF*

Foram obtidos os resultados de 3 pacientes com MM, além do CN. Os resultados podem ser observados na TABELA 3.

O resultado do cálculo do cut-off foi 12, logo os pacientes C e E podem ser considerados positivos para *IGH/MAF*.

TABELA 3: RESULTADOS DA SONDA *IGH/MAF*

SINAL OBTIDO	CN	C	D	E
2R2G	193	180	190	187
1R1G2Y	7	16	10	13
1Y	0	4	0	0
TOTAL	200	200	200	200

LEGENDA: 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes (2R2G), representado um sinal normal, sem translocações; 1 sinal vermelho, 1 sinal verde e 2 sinais amarelos (1R1G2Y), representando o sinal alterado com uma translocação equilibrada; 1 sinal amarelo (1Y), considerado como artefatos da técnica.

4.3 DADOS DOS PACIENTES E RESULTADOS GERAIS

A TABELA 4 apresenta os resultados dos pacientes de acordo com as sondas testadas, bem como o sexo biológico e idade no momento da coleta da amostra.

TABELA 4: RESULTADOS POR PACIENTE

PACIENTE	SEXO	IDADE	RESULTADO	
			<i>IGH/FGFR3</i>	<i>IGH/MAF</i>
A	F	67	Neg.	-
B	F	47	Pos.	-
C	M	63	Neg	Pos.
D	M	71	-	Neg.
E	F	69	-	Pos.

LEGENDA: F: indivíduo do sexo biológico feminino; M: indivíduo do sexo biológico masculino; Neg.: resultado negativo para a translocação correspondente; Pos.: resultado positivo para a translocação correspondente; "-": dados não obtidos para a translocação correspondente.

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi obtida validação das sondas para a pesquisa das fusões *IGH/FGFR3* e *IGH/MAF* para uso em diagnóstico laboratorial, passo fundamental para se estabelecer uma rotina laboratorial para exames de FISH com valores de confiabilidade do teste sejam adequados às condições laboratoriais e aos protocolos estabelecidos no respectivo estabelecimento. Obtemos valores de *cut-off* de cada uma das sondas, nas quais foram mais restritivos em comparação ao limite inferior sugerido pela empresa, de 10% de alterações. Ainda assim, para que o diagnóstico seja ainda mais específico e eficiente, se faz necessária a validação a partir de amostras enriquecidas através de citometria de fluxo ou *beads* magnéticas, a fim de elevar o número de células plasmáticas nas amostras e consequentemente a probabilidade de visualização ne núcleos que apresentem as alterações pesquisadas diminuindo os resultados falsos-negativos.

Com a análise dos dados obtidos, é possível perceber que a paciente com idade abaixo dos 65 anos possuiu pelo menos uma das alterações de alto risco, possivelmente pela associação da alteração com diagnóstico do MM em idade mais jovem.

REFERÊNCIAS

- Bergsagel, P. L., & Kuehl, W. M. (2001). *Chromosome translocations in multiple myeloma*. *Oncogene*, 20(40), 5611–5622. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204641>
- Cardona-Benavides, I. J., de Ramón, C., & Gutiérrez, N. C. (2021). *Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications*. *Cells*, 10(2), 336. <https://doi.org/10.3390/cells10020336>
- Chesi, M., & Bergsagel, P. L. (2013). *Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates*. *International journal of hematology*, 97(3), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1291-2>
- Ciolino, A. L., Tang, M. E., & Bryant, R. (2009). *Statistical treatment of fluorescence in situ hybridization validation data to generate normal reference ranges using Excel functions*. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 11(4), 330–333. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.080101>
- Clarke, S. E., Fuller, K. A., & Erber, W. N. (2024). *Chromosomal defects in multiple myeloma*. *Blood reviews*, 64, 101168. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2024.101168>
- CONITEC. (2022) Relatório de recomendação - Diretrizes diagnósticas Terapêuticas: Mieloma Múltiplo. Ministério da saúde.
- Cowan, A. J., Allen, C., Barac, A., et al. (2018) *Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1221-1227. doi:10.1001/jamaoncol.2018.2128
- du Pont, S., Cleyner, A., Fontan, C., et al. (2017). *Genomics of Multiple Myeloma*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(9), 963–967. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.6705>
- Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Drach, J., et al. (2009) *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-2221. doi:10.1038/leu.2009.174
- Manier, S., Salem, K. Z., Park, J., et al. (2017). *Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications*. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(2), 100–113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
- Padala, S. A., Barsouk, A., Barsouk, A., et al. (2021) *Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma*. *Med Sci (Basel)*. 2021;9(1):3. doi:10.3390/medsci9010003
- Rajkumar, S. V., (2020). Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American journal of hematology*, 95(5), 548–567. <https://doi.org/10.1002/ajh.25791>

Rajkumar, S. V., (2022). *Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol. 2022;97(8):1086-1107. doi:10.1002/ajh.26590

Rajkumar, S. V., (2024). *Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol. 2024;99:1802–1824. DOI: 10.1002/ajh.27422

Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., et al. (2024). *Recent Advances in The Definition of the Molecular Alterations Occurring in Multiple Myeloma*. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 16(1), e2024062. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2024.062>

Waxman, A. J., Mink, P. J., Devesa, S. S., et al. (2010). *Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study*. Blood. 2010;116(25):5501-5506. doi:10.1182/blood-2010-07-298760

Yu, Y., Brown Wade, N., Hwang, A. E., et al. (2020). *Variability in Cytogenetic Testing for Multiple Myeloma: A Comprehensive Analysis From Across the United States*. JCO Oncol Pract. 2020;16(10):e1169-e1180. doi:10.1200/JOP.19.00639