

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIANA MINUNCIO NASCIMENTO

**ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÕES *DRIVER* POR MLPA
EM PACIENTES COM MIELOFIBROSE**

Brasília

2017

JULIANA MINUNCIO NASCIMENTO

**ANÁLISE DO PERFIL DE MUTAÇÕES *DRIVER* POR MLPA EM
PACIENTES COM MIELOFIBROSE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Cintia do Couto Mascarenhas

Brasília

2017

Ma Minuncio Nascimento, Juliana
 Análise do perfil de mutações driver por MLPA em
 pacientes com Mielofibrose / Juliana Minuncio Nascimento;
 orientador Juliana Forte Mazzeu de Araújo ; co-orientador
 Cintia do Couto Mascarenhas. -- Brasília, 2017.
 102 p.

 Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
 Universidade de Brasília, 2017.

 1. Mielofibrose. 2. Mutações driver. 3. MLPA. 4.
 Neoplasias Mieloproliferativas. I. Forte Mazzeu de Araújo
 , Juliana, orient. II. do Couto Mascarenhas, Cintia, co
 orient. III. Título.

Aos meus amores, por quem tudo vale a pena:
meus pais, José Pedro e Silvia; Débora e Daniel.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, Daniel, pelo apoio e suporte durante esta jornada.

Aos meus pais, exemplos de vida, por me permitirem sonhar alto e pela torcida e incentivo incessantes.

À minha irmã, Débora, amiga e parceira de todas as horas.

Às Profs. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo e Dra. Cintia do Couto Mascarenhas, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos, paciência e tranquilidade.

Ao Dr. Alexandre Nonino, pela fundamental contribuição em diversas etapas deste projeto e pelas discussões ricas e instigantes.

Aos demais colegas hematologistas do Hospital de Base de DF, que compartilham a batalha diária contra doenças graves e complexas, a burocracia e a escassez.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Base, em especial a Graciana Lordelo, pela ajuda com as amostras biológicas e o Excel e, sobretudo, pelo incentivo.

Ao Milton Júnior, pelos resultados de array CGH e parceria ao longo deste projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Freitas da Silva, pela análise estatística deste trabalho e pelos "insights" que nossas reuniões fomentaram.

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Medicina, pela oportunidade da realização do mestrado.

Aos pacientes com neoplasias hematológicas, que confiam a nós suas vidas e são a motivação maior para esta pesquisa.

“ A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original. ”

Oliver Wendell Holmes

RESUMO

A Mielofibrose é a mais rara e severa das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas Philadelphia negativas. Caracteriza-se por fibrose medular, hematopoese extramedular e expressão anormal de citocinas inflamatórias, que resultam em citopenias, organomegalias, sintomas constitucionais, eventos trombohemorrágicos e evolução para Leucemia Aguda. Pode ocorrer *de novo* ou pós Policitemia Vera ou Trombocitemia Essencial, a partir da expansão clonal de uma célula tronco hematopoética desencadeada por uma mutação somática envolvendo os genes *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, combinada a desregulação dos nichos hematopoéticos, a mutações e a anomalias citogenéticas adicionais.

Este estudo visou caracterizar o perfil de mutações *driver* de portadores de Mielofibrose primária e secundária acompanhados em um serviço público terciário de Hematologia, e correlacionar este perfil aos desfechos clínicos dos doentes.

A pesquisa das mutações *JAK2* V617F (éxon 14) e éxon 12, *CALR* c.1092_1143del52 e c.1154_1155insTTGTC (éxon 9) e *MPL* W515K e W515L foi realizada em 31 indivíduos por meio da técnica de MLPA, método de análise de DNA que permite a pesquisa simultânea de diferentes mutações, em diferentes amostras.

A mutação *JAK2*V617F foi encontrada em 48,4% dos pacientes, mutações *indel* do éxon 9 da *CALR* em 38,7% (em 66,7% destes a mutação del52, e em 33,3% a mutação insTTGTC), e a mutação *MPL* W515L em 3,2% dos pacientes. 9,7% dos pacientes eram triplo-negativos. Os pacientes com *JAK2* mutada eram mais idosos, com menor grau de anemia e maior frequência de leucocitose, enquanto os portadores de mutações da *CALR* apresentavam menor frequência de leucocitose e plaquetopenia. Os indivíduos triplo-negativos apresentaram a menor mediana de idade ao diagnóstico (49,3 anos) e fenótipo de falência medular semelhante a Síndrome Mielodisplásica. A estratificação de risco por DIPSS foi semelhante à relatada em outros centros.

O tempo mediano de acompanhamento foi de 32 meses (variando de 10 meses a 13 anos), sendo registrados fenômenos tromboembólicos em 19,3% e evolução para LMA em 6,4% dos pacientes. A taxa de mortalidade foi de 29%, e a sobrevida média após o diagnóstico foi de 68,3 meses. Os indivíduos com mutação da *CALR* apresentaram maior sobrevida média. A mediana de sobrevida de acordo com o DIPSS foi superior à prevista pelo modelo prognóstico, possivelmente pela maior

frequência de mutações da CALR observada nesta população. Maior tempo de seguimento e inclusão de novos pacientes são necessários para melhor avaliação de desfechos e confirmação da maior prevalência de mutações da CALR.

A pesquisa de mutações *driver* é essencial para sustentação diagnóstica, define subgrupos de doentes com características clínicas peculiares e, aliada a pesquisa de mutações colaborativas, tem impacto prognóstico. O complexo panorama genético envolvido na iniciação e progressão das NMP, especialmente a Mielofibrose, instiga a adoção de modelos integrativos de estratificação prognóstica. Neste cenário, o MLPA é uma potente ferramenta para estudo molecular, e um promissor aliado na caracterização das NMP.

ABSTRACT

Myelofibrosis is the rarest and most severe Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasm and can present *de novo* or *post* Polycythemia Vera or Essential Thrombocythemia. It is characterized by bone marrow fibrosis, extramedullary hematopoiesis and abnormal expression of inflammatory cytokines, which result in cytopenias, organomegaly, constitutional symptoms, thrombohemorrhagic events and progression to Acute Leukemia. The disease arises from clonal expansion of a single hematopoietic stem cell (HSC), driven by a somatic mutation of *JAK2*, *CALR* or *MPL* genes combined with dysregulation of hematopoietic microenvironment, additional mutations and cytogenetic abnormalities.

This study aimed to assess driver mutations status in patients with primary and secondary myelofibrosis accompanied at a tertiary Brazilian public hospital, and to correlate their mutational profile with clinical outcomes.

The search for JAK2V617F, exon 12 JAK2, calreticulin exon 9 c.1092_1143del52 and c.1154_1155insTTGT, MPLW515K and MPLW515L mutations was performed in 31 subjects using MLPA technique, a method of DNA analysis that allows simultaneous appraisal of different mutations in multiple samples.

JAK2V617F mutation was found in 48.4% of patients, indel CALR mutations in 38.7% of patients (of these, 66.7% harbored del52 bp, 33.3% harbored insTTGTC), MPL W515L in 3.2% of patients and 9.7% of patients were triple-negative. Patients with mutated JAK2 were older, with minor degree of anemia and more leukocytosis, whereas those with CALR mutations had less frequency of leukocytosis and thrombocytopenia. Triple-negative subjects displayed the lowest median age at diagnosis (49.3 years), and bone marrow failure phenotype, similar to Myelodysplastic Syndrome. Risk stratification provided by DIPSS was similar to other centers.

Median follow-up time was 32 months (ranging from 10 months to 13 years). Thromboembolic phenomena were recorded in 19.3% of patients, and evolution to AML in 6.4% of patients. Mortality rate was 29%, and mean survival after diagnosis was 68.3 months. CALR mutated individuals presented higher average survival. Median survival according to DIPSS was higher than predicted by the prognostic model, possibly due to the higher frequency of CALR mutations reported. Longer follow-up and inclusion of new patients are necessary for better evaluation of outcomes and confirmation of the higher prevalence of CALR mutations.

Driver mutations assessment is essential for diagnostic support, defines subgroups with peculiar clinical characteristics and, combined with collaborative mutations evaluation, has prognostic impact. The complex genetic landscape involved in initiation and progression of MPN, especially Myelofibrosis, instigates the adoption of integrative prognostic stratification models. In this scenario, MLPA is a powerful tool for molecular study, and a promising ally for MPN molecular characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sobrevida relativa de indivíduos com Mielofibrose Primária nos Estados Unidos, de 2001 a 2012, de acordo com o sexo e a idade ao diagnóstico	19
Figura 2 - Estrutura das Janus Kinases	21
Figura 3 - Via de sinalização JAK-STAT	21
Figura 4 - Mecanismo de recombinação mitótica levando a 9pLOH	22
Figura 5 - Mutações da JAK2	23
Figura 6 - Representação esquemática do MPL, receptor de trombopoetina	25
Figura 7 - Representação esquemática da calreticulina	26
Figura 8 - Localização genômica das deleções <i>CALR</i> em NMP e SMD	27
Figura 9 - Localização genômica das inserções <i>CALR</i> em NMP e SMD	28
Figura 10 - Ligação da calreticulina mutada ao MPL e ativação da JAK2 na ausência de trombopoetina.	28
Figura 11 - Visão geral da reação de MLPA	51
Figura 12 - Eletroferograma de DNA controle, feminino, analisado com SALSA MLPA	53
Figura 13 - Eletroferograma de indivíduo masculino, controle positivo da reação de MLPA	59
Figura 14 - Eletroferograma de paciente masculino com a mutação <i>CALR</i> tipo 1	59
Figura 15 - Eletroferograma de paciente feminino com a mutação <i>JAK2</i> V617F	60
Figura 16 - Eletroferograma de paciente feminino com a mutação <i>MPL</i> W515L	60
Figura 17 - Eletroferograma de paciente masculino, triplo negativo	61
Figura 18 - Distribuição das mutações <i>driver</i> entre os pacientes da amostra	62
Figura 19 - Estratificação de risco dos pacientes segundo IPSS, DIPSS ou DIPSS plus, ao diagnóstico	64
Figura 20 - Distribuição dos pacientes de acordo com IPSS, DIPSS e DIPSS Plus ao diagnóstico e ao final do acompanhamento	66
Figura 21 - Incidência cumulativa de trombose, de acordo com a mutação <i>driver</i>	70
Figura 22 - Incidência cumulativa de sangramentos, de acordo com a mutação <i>driver</i>	71
Figura 23 - Sobrevida global dos 31 pacientes com Mielofibrose	75
Figura 24 - Sobrevida Global, de acordo com a mutação <i>driver</i>	76
Figura 25 - Sobrevida Global, de acordo com o DIPSS inicial	77
Figura 26 - Sobrevida Global, de acordo com o escore clínico-mutacional	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão 2016 da Classificação da OMS para Neoplasias Mielóides e Leucemias Agudas.....	17
Tabela 2 - Consenso Europeu para Gradação da Fibrose Medular	36
Tabela 3 - Quantificação da reticulina e do colagénio da medula óssea, Bauermeister	37
Tabela 4 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária, OMS, 2008	38
Tabela 5 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária Pré-Fibrótica, OMS, 2016	38
Tabela 6 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária Fibrótica, OMS, 2016..	39
Tabela 7 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose pós Policitemia Vera, IWG-MRT, 2008	39
Tabela 8 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial, IWG-MRT, 2008	40
Tabela 9 - Estratificação de risco conforme IPSS e DIPSS	41
Tabela 10 - Estratificação de risco conforme DIPSS plus	42
Tabela 11 - Grupos de risco e sobrevida média conforme IPSS, DIPSS ou DIPSS plus	42
Tabela 12 - Estratificação de risco conforme MIPSS	43
Tabela 13 - Estratificação de risco conforme GPSS	43
Tabela 14 - Grupos de risco e sobrevida média conforme MIPSS e GPSS.....	44
Tabela 15 - Mutações pesquisadas.....	52
Tabela 16 - Mix de sondas SALSA MLPA P420-A1 MPN mix 1.....	52
Tabela 17 - Características demográficas e laboratoriais basais de 31 pacientes com Mielofibrose	62
Tabela 18 - Estratificação de risco inicial dos 31 indivíduos da amostra, de acordo com IPSS, DIPSS ou DIPSS plus	64
Tabela 19 - Tratamentos instituídos e desfechos clínicos	65
Tabela 20 - Estratificação de risco final dos 31 indivíduos da amostra, de acordo com DIPSS ou DIPSS plus final	66
Tabela 21 - Características demográficas e clínicas subdivididas por tipo de mutações	67
Tabela 22 – Ocorrência de desfechos clínicos de acordo com o perfil mutacional ...	68
Tabela 23 - Distribuição de DIPSS entre os portadores de mutações CALR	68
Tabela 24 - Distribuição de DIPSS entre os portadores da mutação JAK2.....	69
Tabela 25 - Distribuição de DIPSS entre triplo-negativos	69
Tabela 26 - Comparações das Razões de Riscos de ocorrência de trombose entre mutações <i>driver</i>	70
Tabela 27 - Comparações das Razões de Riscos de ocorrência de sangramento entre os tipos de Mutações	71
Tabela 28 - Distribuição das variáveis clínicas segundo a ocorrência de Leucemia .	72
Tabela 29 - Comparações das médias de hemoglobina, leucócitos e plaquetas entre MFP e MF pós TE	73
Tabela 30 - Associação de blastos circulantes, necessidade de transfusão e sintomas constitucionais com MFP ou MFP pós TE, no final do acompanhamento	73
Tabela 31 - Distribuição das variáveis clínicas segundo a presença de esplenomegalia	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARSA-T	Anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose
ASXL1	Gene <i>Additional Sex Combs Like 1</i>
BCR-ABL1	Gene híbrido correspondente ao cromossomo <i>Philadelphia</i>
CALR	Gene da calreticulina
CN-LOH	Perda de heterozigose sem variação do número de cópias
CTH	Célula Tronco Hematopoética
DHL	Desidrogenase Láctica
DIPSS	Sistema de escore prognóstico internacional dinâmico
DIPSS Plus	Sistema de escore prognóstico internacional dinâmico Plus
EPO	Eritropoetina
EZH2	Gene <i>Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex</i> Subunidade 2
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
GCSF	Fator estimulador do crescimento de colônia de granulócitos
GPSS	Sistema Prognóstico Baseado em Genética
HBDF	Hospital de Base do Distrito Federal
IWG-MRT	Grupo de trabalho internacional para pesquisa e tratamento das neoplasias mieloproliferativas
IPSS	Sistema de escore prognóstico internacional
JAK	Janus Kinase
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MF pós TE	Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial
MFP	Mielofibrose primária
MIPSS	IPSS realçado por mutações
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
MPL	Gene do receptor de trombopoetina
NMP	Neoplasia Mieloproliferativa Crônica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PI3K	Quinase Fosfatidilinositol 3

PV	Policitemia Vera
SMD	Síndrome Mielodisplásica
STAT	Tradutores de sinal e ativadores da transcrição
TACTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas
TE	Trombocitemia Essencial
TPO	Trombopoetina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS.....	16
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.3	MUTAÇÕES E ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS.....	19
1.3.1	MUTAÇÕES <i>DRIVER</i>	20
1.3.1.1	JAK2.....	20
1.3.1.2	MPL.....	24
1.3.1.3	CALR.....	26
1.3.2	ACHADOS CITOGENÉTICOS.....	29
1.3.3	MUTAÇÕES COOPERATIVAS	29
1.4	FISIOPATOLOGIA E QUADRO CLÍNICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA...31	
1.4.1	FIBROSE MEDULAR.....	31
1.4.2	HEMATOPOESE EXTRAMEDULAR	33
1.4.3	TROMBOSE	34
1.4.4	LEUCEMIA AGUDA	35
1.5	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS.....	35
1.6	ESCORES PROGNÓSTICOS.....	40
1.7	TRATAMENTO.....	45
2	OBJETIVOS	48
2.1	OBJETIVO GERAL.....	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	TIPO DE ESTUDO	49
3.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	49
3.3	PARÂMETROS AVALIADOS	49
3.3.1	PARÂMETROS CLÍNICOS.....	49
3.3.2	PARÂMETROS LABORATORIAIS	50
3.4	PESQUISA DE MUTAÇÕES <i>DRIVER</i> POR MLPA.....	50
3.4.1	ETAPAS DO PROCEDIMENTO	54
3.4.1.1	<i>Obtenção de DNA</i>	<i>54</i>
3.4.1.2	<i>Extração e quantificação de DNA.....</i>	<i>54</i>
3.4.1.3	<i>Preparação da amostra.....</i>	<i>55</i>
3.4.1.4	<i>Desnaturação do DNA da amostra.....</i>	<i>55</i>
3.4.1.6	<i>Ligação das sondas hibridizadas</i>	<i>55</i>
3.4.1.7	<i>Amplificação das sondas ligadas por PCR.....</i>	<i>56</i>

3.4.1.8	<i>Eletroforese capilar dos produtos de PCR</i>	56
3.4.2	ANÁLISE DE DADOS	56
3.4.2.1	<i>Interpretação do MLPA</i>	56
3.4.2.2	<i>Análise estatística</i>	56
4	RESULTADOS	58
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES JAK2, MPL OU CALR.....	58
4.2	CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	62
4.3	CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL.....	66
4.4	OCORRÊNCIA DE ANEMIA, LEUCOCITOSE, PLAQUETOPENIA OU DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL.....	67
4.5	DISTRIBUIÇÃO DO DIPSS AO FINAL DO ACOMPANHAMENTO, DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL.....	68
4.6	ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO POR MODELO PROGNÓSTICO CLÍNICO-MOLECULAR.....	69
4.7	RISCO CUMULATIVO DE TROMBOSE, FENÔMENOS HEMORRÁGICOS E EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL.....	69
4.7.1	RISCO CUMULATIVO DE TROMBOSE.....	70
4.7.2	RISCO CUMULATIVO DE SANGRAMENTOS.....	71
4.8	ASSOCIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS COM EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA	71
4.9	DIFERENÇAS CLÍNICO-LABORATORIAIS ENTRE PORTADORES DE MIELOFIBROSE PRIMÁRIA E MIELOFIBROSE PÓS TROMBOCITEMIA ESSENCIAL.....	72
4.10	CORRELAÇÃO ENTRE ESPLENOMEGALIA E PARÂMETROS CLÍNICOS.....	73
4.11	ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA.....	74
4.11.1	SOBREVIVÊNCIA GLOBAL	74
4.11.2	SOBREVIVÊNCIA GLOBAL DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES <i>DRIVER</i>	75
4.11.3	SOBREVIVÊNCIA GLOBAL DE ACORDO COM O DIPSS INICIAL	76
4.11.4	SOBREVIVÊNCIA GLOBAL DE ACORDO COM O SCORE CLÍNICO-MUTACIONAL	77
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) compreendem um grupo vasto e heterogêneo de doenças originadas da ativação clonal de uma célula tronco hematopoética a partir de uma mutação somática, marcado pela consequente hiperprodução de células mielóides com maturação e funcionalidade variáveis. (1)

As NMP são conhecidas desde 1845, quando foi descrita pela primeira vez a moléstia hoje conhecida como Leucemia Mielóide Crônica (LMC).(2) Um século mais tarde, em 1951, William Dameshek propôs o conceito de síndrome mieloproliferativa e as semelhanças clínico-patológicas entre LMC, Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP).(3) Na década de 1960 foi descrita a associação entre a LMC e o cromossomo Philadelphia, produto da $t(9;22)(q34;q11)$, posteriormente associado ao transcrito BCR-ABL1. Desde então, os notáveis avanços no entendimento e terapêutica desta entidade culminaram com sua distinção conceitual das demais doenças mieloproliferativas. (4)

Na década de 1970 surgiram as primeiras propostas de categorização das desordens mieloproliferativas Philadelphia-negativas, baseadas fundamentalmente em achados clínicos, laboratoriais e de histologia da medula óssea. Em 2001 a Organização Mundial da Saúde esboçou uma Classificação das Neoplasias dos Tecidos Hematopoéticos e Linfóides que combinou pela primeira vez tais características a dados imunológicos e genéticos, tendência confirmada na classificação seguinte, de 2008. Marco histórico, a 4ª edição da classificação passou a nomear estas patologias como neoplasias, incorporou alterações citogenéticas e moleculares às suas descrições e adicionou a Leucemia Neutrófila Crônica, a Leucemia Eosinófila Crônica e a Mastocitose Sistêmica ao grupo das NMP.(5)

Desde a adoção da Classificação da OMS houve significativo incremento na padronização diagnóstica e na distinção entre as diversas NMP. Entretanto, a descrição de novas alterações moleculares e a progressiva integração entre dados clínicos, laboratoriais e genéticos motivaram a revisão da classificação de 2008. Publicada em 2016, a revisão reitera a necessidade de padronizar os achados morfológicos, incorporar dados moleculares e distinguir precisamente as entidades do

grupo. (6)

Apesar de as NMP clássicas (i.e., PV, TE e MFP) serem facilmente reconhecíveis em suas formas típicas, as frequentes sobreposições entre fenótipos clínicos e evoluções de uma forma de doença para outra tornam desafiadora a distinção precisa entre seus subtipos, especialmente entre TE e MFP. A fim de facilitar esta discriminação, a nova Classificação orienta a subcategorização da MFP em pré-fibrótica, ou precoce, e MFP com fibrose evidente. Os casos de fibrose medular secundária a progressão de PV ou TE devem ser denominados respectivamente Mielofibrose pós PV, ou Mielofibrose pós TE.(6)

Tabela 1 – Revisão 2016 da Classificação da OMS para Neoplasias Mielóides e Leucemias Agudas

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)
Leucemia Mielóide Crônica (LMC), BCR-ABL1
Leucemia Neutrófila Crônica (LNC)
Policitemia Vera (PV)
Mielofibrose Primária (MFP)
MFP, estágio precoce / pré-fibrótico
MFP, estágio fibrótico
Trombocitemia Essencial (TE)
Leucemia Eosinofílica Crônica, sem outra especificação
NMP, inclassificável

Adaptado de: 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

1.2 EPIDEMIOLOGIA

As NMP são cânceres raros, com incidência inferior a 6 casos por 100.000 indivíduos por ano.(7) Fatores como exposição a radiação ionizante e benzeno, inflamação, gênero, idade e presença de mutações somáticas são importantes para iniciação e progressão dessas neoplasias. (1) A maioria dos casos é esporádico, mas algumas variações genéticas predispõem ao desenvolvimento de NMP. O haplótipo conhecido como 46/1 (GGCC) origina-se de um polimorfismo de único nucleotídeo no gene *JAK2*, e aumenta em três vezes o risco de desenvolvimento de uma NMP *JAK2* mutada. (8)(9)(10) Polimorfismos de único nucleotídeo nos genes *MPL*, *CALR* e *TERT* também predispõem a NMP. (11)

Predisposição familiar é observada em cerca de 7% dos casos.(11) Familiares de primeiro grau de portadores de NMP tem um risco 5 a 7 vezes maior de desenvolver NMP que a população geral. (12)(13)

A Mielofibrose Primária, historicamente conhecida como Metaplasia Mielóide Agnogênica ou Mielofibrose Crônica Idiopática, é a menos frequente das NMP. A mediana de idade ao diagnóstico é de 73,7 anos e a incidência anual (estimada entre 0,1 e 1,0 caso por 100.000 indivíduos) é até 2,4 vezes maior em homens, com tendência a piores desfechos em portadores do sexo masculino. Sua prevalência varia entre 1,76 e 4,05 por 100.000 indivíduos. Cerca de 5% dos pacientes diagnosticados tem menos de 40 anos, e 17% menos de 50 anos. A condição é rara na infância.(14)(15)

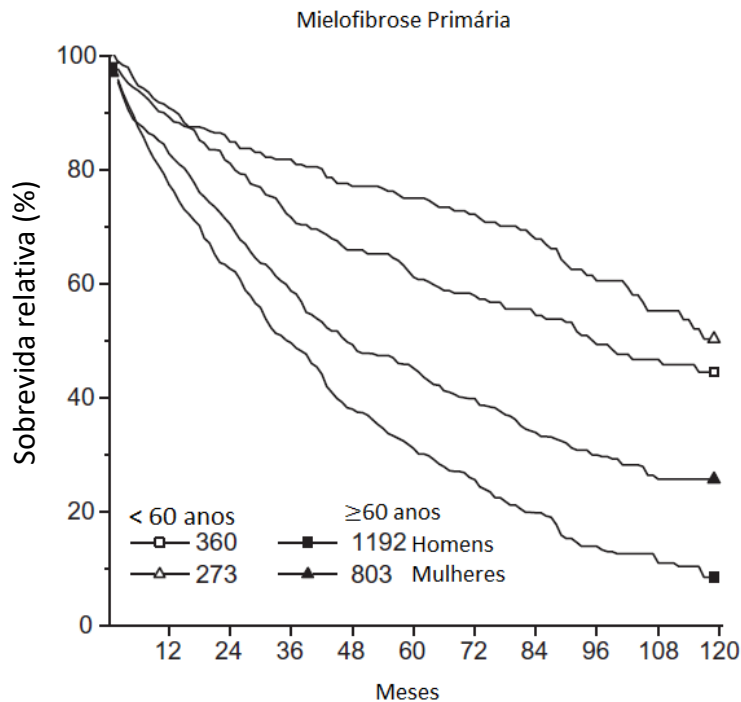
A ampla adoção dos critérios diagnósticos da OMS e a maior disponibilidade de pesquisa de mutações *driver* aperfeiçoaram o diagnóstico da doença, o que contribuiu para o aumento do número de casos observado na última década. Além disso, é possível que a disponibilidade de tratamento alvo específico (Ruxolinitibe, JAKAVI®) a partir de 2011 tenha motivado maior notificação da doença. (15,16)

Contudo, estima-se que a enfermidade ainda seja subdiagnosticada em virtude da heterogeneidade de manifestações clínicas, da semelhança com outras condições (hematológicas ou não), da variedade de nomenclaturas e códigos classificatórios e, eventualmente, da dificuldade de acesso a profissionais treinados e propedêutica adequada.(15,17)

Apesar de mais rara, a MFP é a mais grave das NMP, apresentando sobrevida global em 5 anos de 32%, e sobrevida relativa¹ em 5 anos estimada em 42%. Avalia-se mediana de sobrevida após o diagnóstico entre 4 e 5 anos. As principais causas de óbito são evolução para leucemia aguda e infecções bacterianas, e em jovens, as complicações cardio e cerebrovasculares. (14,16)

¹ Sobrevida Relativa é uma estimativa de como seria a sobrevida dos pacientes com MFP na ausência de outras causas de morte que não o câncer. O cálculo se dá por comparação da sobrevida observada em indivíduos com MFP com a registrada em população do mesmo sexo e idade.(14)

Figura 1 - Sobrevida relativa de indivíduos com Mielofibrose Primária nos Estados Unidos, de 2001 a 2012, de acordo com o sexo e a idade ao diagnóstico



Nota: o número total de casos em cada grupo está indicado na legenda.

Adaptado de: Srour SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. Br J Haematol. 2016 Aug;174(3):382-96

1.3 MUTAÇÕES E ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS

As NMP são marcadas pela ocorrência de mutações somáticas envolvendo a célula tronco hematopoética, que desencadeiam expansão clonal de uma ou várias linhagens mielóides. Estas mutações podem ser classificadas como *driver*, que envolvem os genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* e ditam o fenótipo mieloproliferativo; e como não *driver* ou colaborativas (*LNK*, *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH*, *IKZF1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*), que são mutações adicionais com influência sobre o prognóstico e evolução da doença. (4)(18)

As três mutações *driver* resultam em ativação constitutiva de vias de sinalização intracelular essenciais para a hematopoese, em especial a via JAK-STAT, por mecanismos diversos que levam a ativação dos complexos formados pelos fatores de crescimento hematopoético (EPO, TPO e GCSF), seus receptores, a JAK2 e suas moléculas de sinalização intracelulares.(1) Há evidências de que as mutações surgem em heterozigose e progridem para homozigose por dissomia uniparental (ou perda de heterozigose sem variação no número de cópias – CN LOH - copy-neutral loss of

heterozygosity) adquirida ² (19–21). São mutuamente exclusivas; ocasionalmente duas mutações podem ser encontradas em um mesmo indivíduo, mas acredita-se que derivem de subclones neoplásicos distintos. Mutações subclonais frequentemente associam-se a progressão de doença. (1,22)

Apesar de as mutações *driver* serem fundamentais ao desenvolvimento das NMP, a variabilidade genética individual, influenciada pelo gênero, é o que determina o fenótipo mieloproliferativo. (11) Fatores como a carga de alelos mutados, (20,21,23), a associação a outras mutações (somáticas ou germinativas) e a ordem de aquisição delas podem ser determinantes adicionais do fenótipo nas NMP. (1,11,24)

1.3.1 MUTAÇÕES *DRIVER*

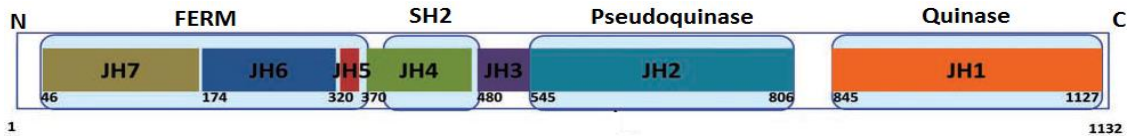
1.3.1.1 JAK2

As JAKs, ou Janus kinases, são uma família de quatro proteínas (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2) com atividade tirosina-quinase essenciais para a hematopoese, imunidade, diferenciação e crescimento celular. Encontram-se constitutivamente ligadas a domínios intracelulares de variados receptores de citocinas, desempenhando papel fundamental nos eventos de sinalização celular e modulação da expressão gênica mediado por citocinas e no tráfego apropriado até a superfície celular. (1,25,26) As JAK2 ativam as vias de sinalização envolvendo as STATs ("signal transducers and activators of transcription", ou tradutores de sinal e ativadores de transcrição), MAPK (mitogen activated protein kinase) e PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase).(27)

As JAKs possuem quatro domínios estruturais: os domínios N-terminal FERM (four-point-one ezrin radixin moesin) e SH2, através dos quais ocorre a ligação da JAK ao receptor de citocina; um domínio pseudoquinase, e um domínio C-terminal quinase, com atividade catalítica. O domínio pseudoquinase impede a auto-ativação do domínio quinase, promovendo a ativação dependente de citocinas.

² A CN-LOH adquirida é um mecanismo de doença comum em neoplasias mielóides. Uma carga alélica da mutação acima de 50% sugere a existência de pelo menos um subclone de células homocigoto para a mutação; a vantagem proliferativa deste subclone homocigoto dominante (que pode refletir mudanças genéticas ou epigenéticas adicionais) geraria eritrocitose e a transição de TE para PV. Com o tempo, a alta carga de mutações leva a fibrose medular secundária.(19)

Figura 2 - Estrutura das Janus Kinases

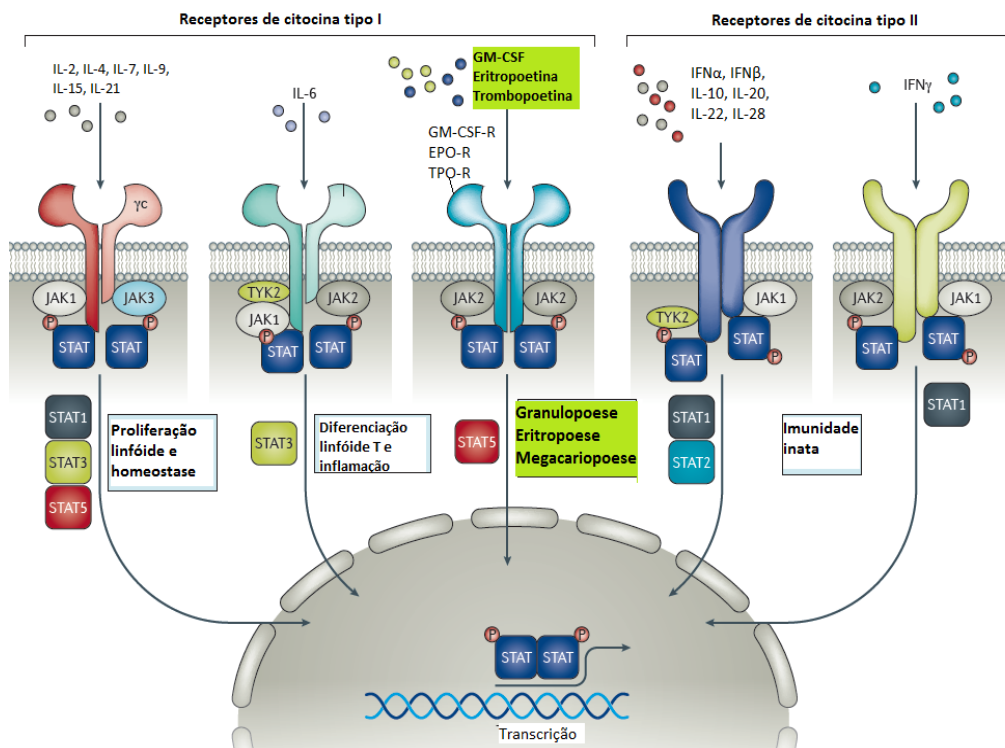


Adaptado de: Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer*. 2010 Oct 1;1(10):979–93.

As proteínas JAK2 ligam-se a receptores homodiméricos, como os receptores de eritropoetina (EPOR), trombopoetina (TPOR, ou MPL) e do fator estimulador da colônia de granulócitos (G-CSFR), enquanto receptores heterodiméricos (como os de IL-3, IL-5, IL-12 e interferon gama) associam-se também a JAK1, JAK3 ou TYK2. (26)

A ligação de citocinas promove mudanças conformacionais em seus receptores, que transfosforilam as JAKs a eles ligadas, ativando-as. As JAKs ativadas fosforilam resíduos citoplasmáticos de tirosina do receptor, que passa a funcionar como sítio de ligação para outras moléculas de sinalização, especialmente as STATs. As STATs ligadas são ativadas pelas JAKs, sendo então homo ou heterodimerizadas e direcionadas ao núcleo celular, onde regulam a transcrição dos genes alvo.

Figura 3 – Via de sinalização JAK-STAT



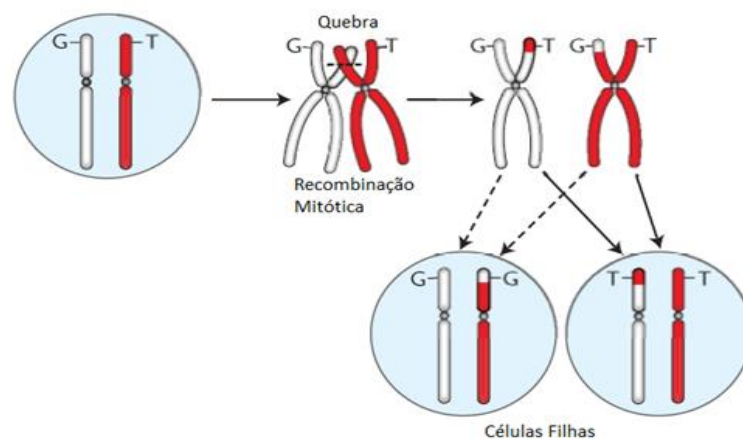
Adaptado de: Winthrop KL. The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Mar 2;13(4):234–43.

Observações sobre a ativação constitutiva das STATs e a recorrente perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 9, e relatos de ação terapêutica de inibidores de tirosinoquinase em portadores de NMP culminaram na descoberta da mutação da V617F da JAK2 em 2005, por quatro grupos de pesquisa independentes (21,28–30) fornecendo pela primeira vez uma base genética comum para as NMPs clássicas.

Trata-se de uma mutação de ponto da célula progenitora hematopoética, em que ocorre a transversão de uma Guanina por uma Timina no nucleotídeo 1849 no éxon 14 do gene *JAK2*, localizado no cromossomo 9p24.1. O resultado é a substituição de um aminoácido valina por uma fenilalanina no códon 617 no domínio pseudoquinase da JAK2, levando a sua mudança conformacional e ativação constitutiva, independente de citocinas, da via de sinalização JAK-STAT. (21) Em baixos níveis, a mutação causa hipersensibilidade do receptor à ação de citocinas. Esta mutação está presente em 95% dos portadores de Policitemia Vera e em 50 a 60% dos portadores de TE e MFP. Eventualmente é encontrada em portadores de outras neoplasias mielóides (1), linfóides ou tumores sólidos. (9) Além disso, pode estar presente em baixos níveis na população normal e é uma das mutações mais frequentes em indivíduos com hematopoese clonal de significado indeterminado. (1)

A mutação inicia-se em heterozigose, e progride para homozigose por recombinação mitótica e perda de heterozigose sem variação no número de cópias (CN-LOH – dissomia uniparental adquirida – duplicação do alelo mutante) ao longo de uma região variável do braço curto do cromossomo 9 (9p24). (21,31)

Figura 4 - Mecanismo de recombinação mitótica levando a 9pLOH



Em branco, cromossomo 9 não mutado; em vermelho, cromossomo 9 com a mutação JAK2.

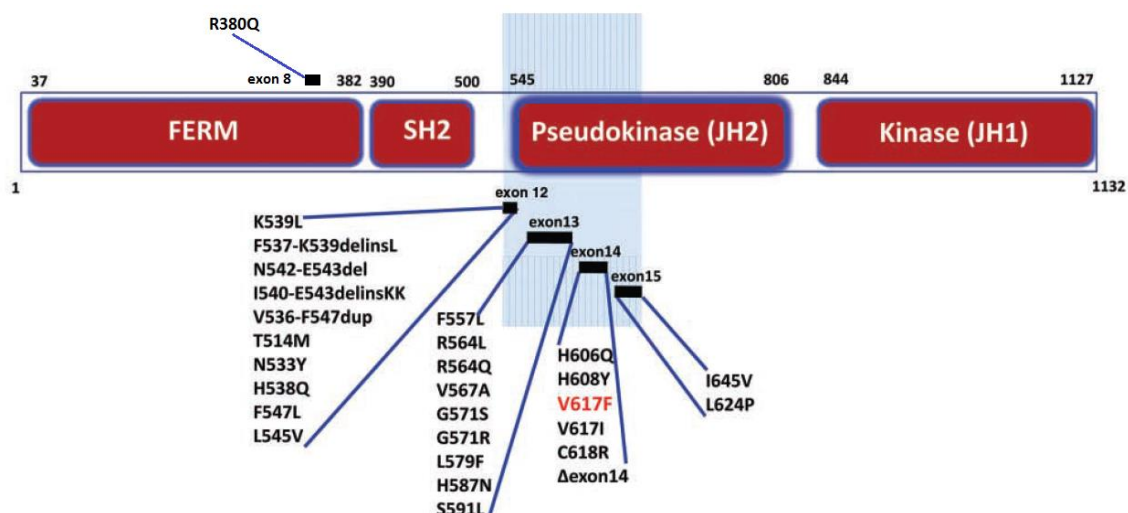
Adaptado de: Kralovics R et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med.* 2005 Apr 28;352(17):1779–90.

A carga alélica da mutação varia amplamente, de 1% a 100%, o que em parte explica como uma única mutação é capaz de originar doenças distintas, ou fenótipos distintos dentro de uma mesma doença. A esse respeito, postula-se que as NMPs JAK2 positivas sejam um contínuo biológico com fenótipo clínico determinado pela sua carga alélica, com TE, PV e MFP representando fases distintas de uma mesma entidade patológica. (1)

Além disso, características intrínsecas da CTH que adquire a mutação podem contribuir para a variabilidade de manifestações clínicas (por exemplo, mutação em uma CTH comprometida com a linhagem mielóide ou megacariocítica desencadeando PV ou TE, respectivamente). (32)

Mutações em outras regiões do gene *JAK2* também foram descritas, envolvendo sítios diversos dos éxons 8, 12, 13, 14 e 15. (33) A maioria dos casos de Policitemia Vera não associados à mutação JAK2V617F apresentam pequenas inserções ou deleções *in-frame* no éxon 12, localizadas na junção entre os domínios SH2 e pseudoquinase da JAK2. Apesar de promoverem maior ativação da via JAK/STAT que a mutação do éxon 14, tais mutações desencadeiam apenas eritrocitose. (34,35)

Figura 5 - Mutações da JAK2



A maioria das mutações de ponto, duplicações e inserções identificadas nas NMP localizam-se nos éxons 12 a 15, revelando a importância do domínio regulatório JH2 para atividade quinase.

Adaptado de: Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer*. 2010 Oct 1;1(10):979–93.

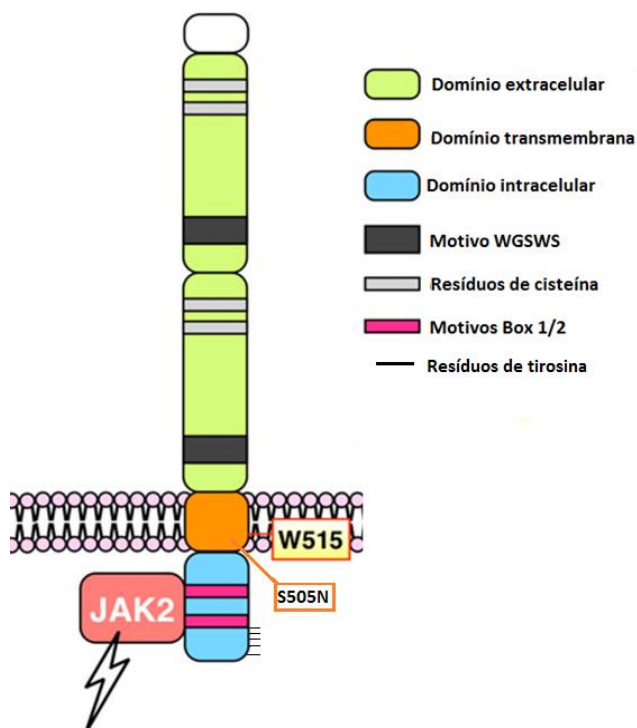
1.3.1.2 MPL

Mesmo os portadores de NMP que não possuem a mutação JAK2V617F apresentam ativação constitutiva da via JAK-STAT. A suspeita de que tal ativação derivasse de mutações ativadoras do receptor de citocinas guiou a descoberta de mutações envolvendo o gene *MPL*, localizado no cromossomo 1p34.2, que codifica o receptor de trombopoetina (MPL/TPOR). (36–39)

O MPL é expresso em células tronco hematopoéticas, megacariócitos e plaquetas da medula óssea, baço e fígado fetal; é o único receptor de citocinas hematopoéticas expresso nas CTH. Através de ligação a ele a trombopoetina regula a megacariopose e controla a expansão e quiescência dos progenitores hematopoéticos. (40) É um receptor de citocinas tipo I, desprovido de atividade tirosina-quinase intrínseca, e, portanto, dependente de interação com a JAK2 para ativação das vias de sinalização intracelular. (41)

É formado por três domínios estruturais. O extracelular compreende dois pares adjacentes de domínios Fibronectina III –like, cada um deles contendo resíduos de cisteína e um motivo WSXWS para direcionar o dobramento adequado. A porção distal liga-se à TPO, e a proximal possui sítios de glicosilação essenciais para expressão do receptor na superfície celular e para sua ativação. O domínio transmembrana ancora o receptor à superfície celular e controla sua dimerização e ativação; o domínio citoplasmático contém os motivos Box 1 e Box 2, essenciais para ligação às JAKs, e cinco resíduos de tirosina que, após fosforilados, servem como sítios de ligação para proteínas de sinalização, como as STATs e LNK (proteína inibitória da via). (39,41)

Figura 6 - Representação esquemática do MPL, receptor de trombopoetina



Adaptado de: Chou F-S, Mulloy JC. The Thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *J Cell Biochem.* 2011 Jun;112(6):1491–8.

As mutações mais comuns do *MPL* ocorrem no éxon 10 e implicam na substituição do aminoácido triptofano do códon 515 do MPL/TPOR, localizado no domínio juxtamembrana e essencial para impedir a ativação espontânea do receptor. As células hematopoéticas que expressam o MPLW515 mutado são hipersensíveis ao estímulo da TPO. (1,37)

Mais comumente ocorre substituição do triptofano por leucina (1544G>T, mutação MPLW515L) ou lisina (1543_1544 TG>AA, mutação MPLW515K), mas substituições por arginina (MPLW515R), alanina (MPLW515A) e glicina (MPLW515G) também foram descritas. As mutações em geral são heterozigotas, mas podem se tornam homozigotas com a progressão da doença, por CN-LOH envolvendo o cromossomo 1p. (19) Mutações no sítio transmembrana (S505N) do receptor podem ser raramente encontradas. (1,11)

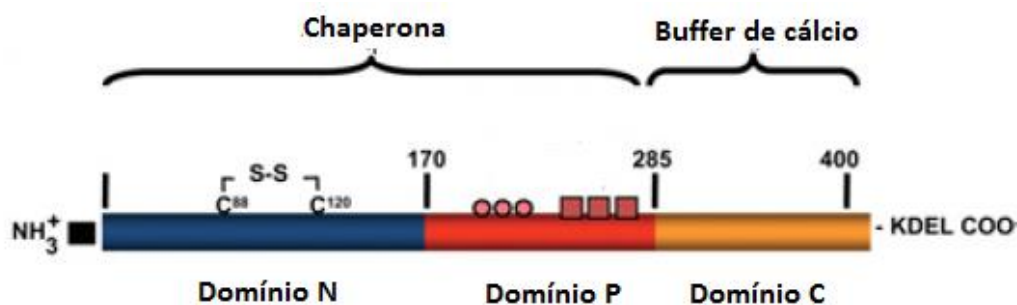
As mutações envolvendo o gene *MPL* não ocorrem em portadores de PV; são encontradas em 3% dos indivíduos com TE e 5% daqueles com MFP, além de ocasionalmente associarem-se a mielodisplasia (ARSA-T). (1,42) A carga alélica é

amplamente variável; cargas mais altas originam-se de CN-LOH do cromossomo 1 e associam-se a fibrose medular. (19)

1.3.1.3 CALR

A calreticulina é uma proteína ubiquamente presente em células eucarióticas (exceto hemácias, que não possuem retículo endoplasmático), sintetizada pelos genes *CALR1* e *CALR2*, localizados no cromossomo 19p13.2. É formada por três domínios: N terminal, responsável pela interação com outras proteínas; domínio P, rico em prolina, que contém sítios de ligação de alta afinidade ao cálcio, sinais de localização nuclear e estruturas lecitina-like responsáveis pela função de enovelamento protéico da CALR; e C terminal, composto por aminoácidos ácidos, sítios de ligação ao cálcio e uma extremidade contendo a sequência peptídica KDEL, responsável por reter a proteína no interior do retículo endoplasmático. (43,44)

Figura 7 - Representação esquemática da calreticulina



A proteína contém uma sequência N-terminal de sinal de aminoácidos, domínio N, domínio P, domínio C e uma sequência KDEL de retenção do sinal C-terminal. Os círculos e quadrados rosa representam sequências repetitivas de aminoácidos.

Adaptado de: Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2009;417(3):651–66.

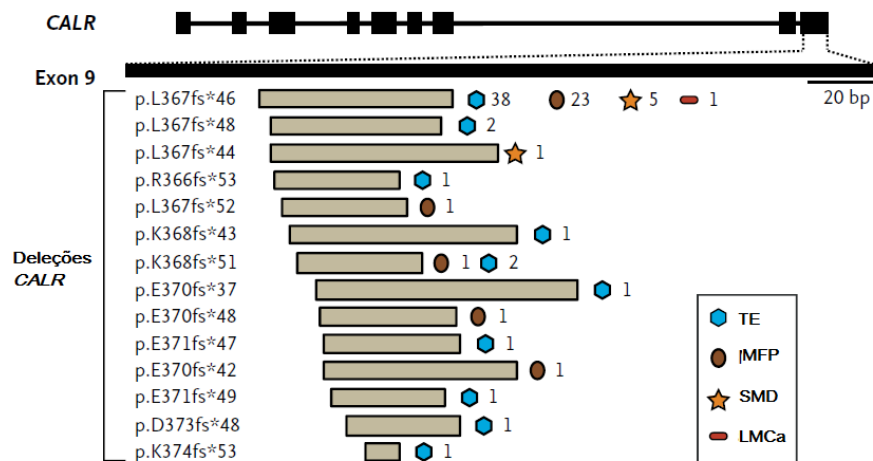
A função da calreticulina depende de sua localização. Quando no interior do retículo endoplasmático a CALR age como uma proteína chaperona, organizando o enovelamento de glicoproteínas recém-sintetizadas, e modula a homeostase do cálcio. Já no citoplasma e na superfície celular modula a adesão celular, expressão gênica e exportação nuclear. Assim, a CALR regula uma ampla variedade de processos celulares, incluindo o processamento e apresentação de antígenos, adesão e proliferação celular e apoptose. (44)

No final de 2013 foram descobertas mutações *frameshift* no gene *CALR* na maioria dos indivíduos com TE e MFP sem mutações *JAK2* ou *MPL*. Há mais de 50 mutações descritas, todas localizadas no éxon 9, induzindo a uma mudança do quadro de leitura. (23,45)

As variações mais comuns do *CALR* (80% dos casos) são uma deleção de 52 pares de bases (p.L367fs*46), ou tipo 1, e a inserção de 5 pares de bases (p.K385fs*47), ou tipo 2. A mudança do quadro de leitura leva à síntese de um novo terminal C contendo polipeptídeos ricos em metionina e arginina, carregado positivamente, em que a sequência *KDEL* é abolida. Consequentemente, a proteína mutante tem localização subcelular alterada e ligação ao cálcio prejudicada. (23,45)

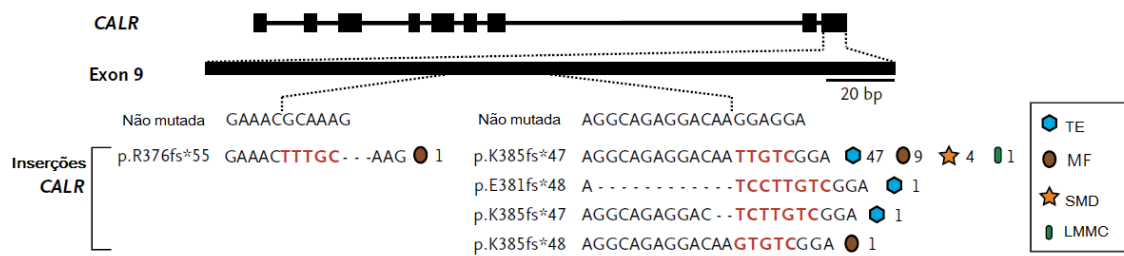
Na del52 ocorre perda de quase toda a sequência normal de aminoácidos e dos sítios ligadores de cálcio, enquanto a ins5 aproxima-se mais da sequência normal e conserva cerca de metade das cargas negativas. As outras mutações descritas são classificadas como tipo 1 ou tipo 2 *-like*, dependendo da alteração estrutural que desencadeiam. (23,45)

Figura 8 - Localização genômica das deleções *CALR* em NMP e SMD



Adaptado de: Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391–405.

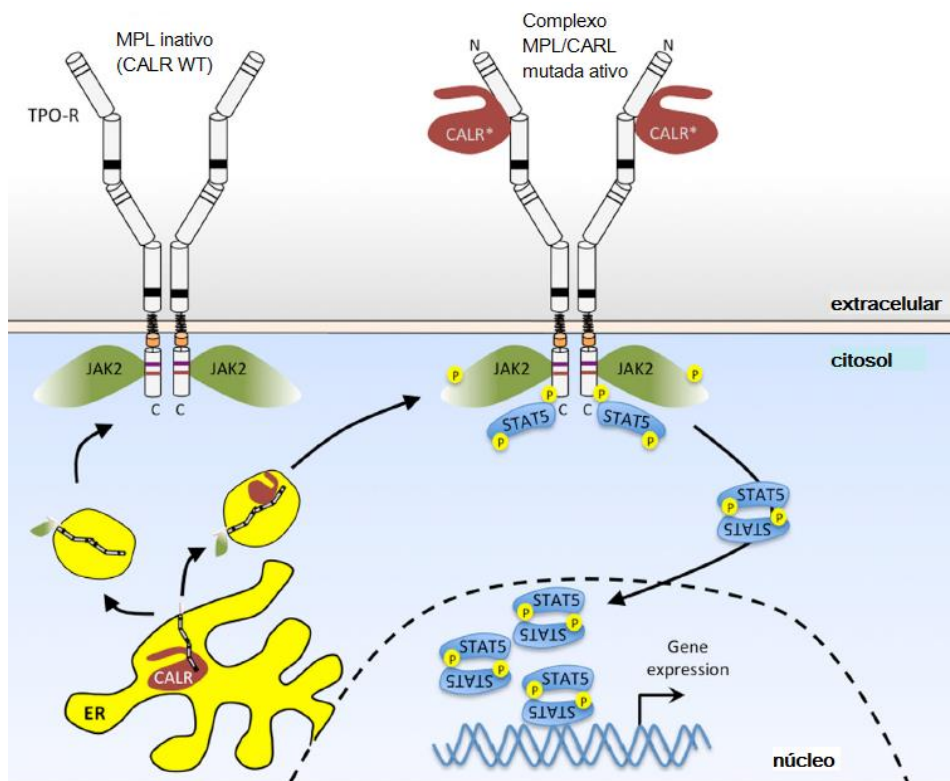
Figura 9 - Localização genômica das inserções CALR em NMP e SMD



Adaptado de: Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2391–405.

A chaperona CALR mutante interage anormalmente com o MPL, ativando constitutivamente a sinalização celular através do receptor. Uma vez ativado o MPL ativa a JAK2, e subsequentemente as STATs. O efeito oncogênico da mutação depende tanto do C terminal mutado quanto da presença do MPL. (1,46,47) As CALR mutantes podem causar discreta ativação do G-CSFR, além de induzirem a secreção de citocinas por monócitos. (41)

Figura 10 - Ligação da calreticulina mutada ao MPL e ativação da JAK2 na ausência de trombopoetina.



As mutações no quadro de leitura do éxon 9 geram calreticulinas com uma nova cauda carregada positivamente, que se ligam ao domínio extracelular N-glicosilado do MPL e promovem ativação da JAK2. Isso resulta em ativação persistente de STAT5 (representada acima), STAT1, STAT3, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) / ERK e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) / AKT. A CALR selvagem, (esquerda), por outro lado, é retida no retículo endoplasmático, devido à presença de sua sequência KDEL, e não ativa TPO-R.

Adaptado de: Varghese LN, Defour J-P, Pecquet C, Constantinescu SN. The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Mar 31;8:1–13.

As mutações da CALR estão presentes em 25 – 35% dos portadores de MFP, sendo encontradas em 75% daqueles sem mutações JAK2 ou MPL. Em geral são heterozigotas; a progressão clonal das NMP com CALR mutada parece estar associada com a expansão progressiva do clone heterozigoto, que eventualmente se torna dominante na medula óssea. (1)

1.3.2 ACHADOS CITOGENÉTICOS

A MFP exhibe características tanto mieloproliferativas quanto mielodisplásicas, que derivam de combinações variadas entre as mutações *driver*, as mutações cooperantes e anormalidades relacionadas ao microambiente da medula óssea. A mutação JAK2V617F é encontrada em 60 a 65% dos pacientes; em 25 a 30% deles há mutações no éxon 9 do *CALR*, e 4-5% no *MPL*. 5 a 10% dos pacientes não possuem nenhuma das mutações *driver*, sendo chamados triplo-negativos. Cerca de um terço dos pacientes tem mutações somáticas em genes não *driver*. (7)

Alterações citogenéticas clonais inespecíficas ao diagnóstico estão presentes em cerca de 30% dos pacientes. As alterações mais frequentes são del(20q) e del(13q) isoladas, que, além da trissomia do 9 e alterações do cromossomo 1, conferem prognóstico favorável. Cariótipo complexo, ou anormalidades incluindo +8, del(7)/ del(7p), del(5)/ del(5q), i(17q), inv(3), del(12p) ou rearranjo 11q23 são associados a desfechos desfavoráveis. (48)(49)

1.3.3 MUTAÇÕES COOPERATIVAS

As três mutações *driver* isoladamente não explicam a heterogeneidade das NMP clássicas. Com o advento de novas técnicas de sequenciamento gênico diversas outras mutações foram identificadas, envolvidas em mudanças fenotípicas e

progressão de doença. Estas mutações também estão presentes em outras neoplasias mielóides, especialmente em síndromes mielodisplásicas. (11)

A maioria delas envolve perda de função de um gene supressor tumoral mielóide, envolvendo reguladores da metilação do DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), modificadores de histona (membros do Polycomb repressor complex 1 and 2 – *EZH2*, *ASXL1* - *IDH1* e 2), fatores de transcrição (*TP53*, *CUX1*, *IKZF1*, *FOXP1*, *ETV6*, *RUNX1*), moléculas de sinalização (*NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *LNK*, *CBL*, *FLT3*) ou splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*). (1)

O número de mutações é um indicador indireto da complexidade genética ou progressão clonal, e identifica pacientes de alto risco. Na MFP é frequente a coexistência de três ou mais mutações. (1)

Mutações do éxon 2 do *LNK* (*SH2B3*), uma proteína adaptora que regula a ativação da *JAK2*, impactam na proliferação celular. Questiona-se se esta seria uma mutação *driver*, mas até o momento acredita-se que predisponha ao surgimento ou aumente a patogenicidade de mutações *JAK2V617F* e *CALR*. (1)

TET2 e *DNMT3A* regulam a metilação do DNA. Mutações nestes genes são encontradas nas três NMPs. As mutações do *TET2* são as mais frequentes; aumentam a capacidade de auto-renovação da CTH *JAK2V617F*, e contribuem para iniciação e progressão de doença. (1)

O gene *EZH2* codifica uma metiltransferase de histona do complexo PRC2. Está mutado em 5 a 10% dos portadores de MFP, particularmente naqueles com *JAK2V617F*. Favorece o aumento da megacariopose em detrimento da eritropose, contribuindo para fibrose medular e mau prognóstico. (1)

O *ASXL1* é um regulador epigenético, que modifica histonas por ligação ao PRC1 e PRC2 e se liga a receptores nucleares (*RARa* e receptor de estrógeno). As mutações do *ASXL1* são encontradas em todas as NMP, mas tem associação especial com MFP, sendo encontradas em até 25% dos casos. Associam-se a prognóstico desfavorável e transformação para leucemia aguda. (1,50,51)

As mutações de proteínas do spliceossoma (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) em NMP são restritas a TE e MF, contribuem para o desenvolvimento de anemia e plaquetopenia e associam-se a mau prognóstico. Mutações do *SRSF2* associam-se a evolução para leucemia aguda. (1)

1.4 FISIOPATOLOGIA E QUADRO CLÍNICO DA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

A MFP caracteriza-se pela hiperplasia clonal de megacariócitos aberrantes, cuja expansão desencadeia a liberação de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias, que por sua vez estimulam a proliferação não clonal de fibroblastos e resultam em fibrose medular. (52)

A mieloproliferação crônica inicia-se na medula óssea, e posteriormente estende-se a outros sítios, como baço, fígado e serosas. As manifestações clínicas são diversas, e incluem graus variados de citopenias, hepatoesplenomegalia, infarto esplênico, prurido, fenômenos hemorrágicos, trombozes arteriais e venosas e evolução para leucemia aguda. (18)

Sintomas constitucionais, como febre baixa, dor óssea, sudorese noturna e caquexia são muito frequentes em MFP, e decorrem do estado pró-inflamatório gerado pela liberação de citocinas. (52) A inflamação crônica contribui para fadiga grave, que acomete de 50 a 70% dos pacientes. (17)

1.4.1 FIBROSE MEDULAR

Os megacariócitos anormais produzem maior quantidade de plaquetas, especialmente de plaquetas reticuladas. (53) Além disso, secretam inúmeras citocinas inflamatórias, como IL-1 α e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β)1; alteram o nicho hematopoiético, desregulando as CTHs e remodelando a medula por secreção de citocinas que conduzem a mielofibrose; e promovem neo-osteogênese, por induzir a diferenciação osteoblástica através do TGF- β 1 e inibir a diferenciação dos osteoclastos através da osteoprotegerina. (1)

Os fibroblastos expandidos na medula óssea não carregam as mutações *driver*. Entretanto, demonstrações de que alguns progenitores endoteliais e células endoteliais dos sinusóides hepáticos e da circulação esplâncnica podem adquirir a mutação JAK2, por mecanismos ainda não completamente elucidados, (54,55) levantam a suspeita de que algumas das células envolvidas no surgimento da fibrose estejam diretamente relacionadas ao clone mutado. (56)

Um mecanismo potencial de ativação dos fibroblastos é emperipolese (isto é, passagem de uma célula através do citoplasma de outra célula). Os megacariócitos aberrantes tem localização anormal de P selectina nos seus vacúolos

intracitoplasmáticos e sistema de demarcação de membrana, o que leva ao aumento da emperipolese de neutrófilos e eosinófilos. Os granulócitos liberam suas enzimas no citoplasma dos megacariócitos, que passam a liberar citocinas como o TGF- β , o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Tais fatores estimulam a produção de fibrose pelos fibroblastos e a neoangiogênese pelas células endoteliais. (56,57)

O TGF β 1 aumenta a síntese de colágeno tipos I, III e IV e a deposição de fibronectina, proteoglicanos e tenascina, que participam da fibrose medular. Também estimula a produção de matriz extracelular (MEC) e inibe sua degradação, por diminuição de metaloproteases como a MMP3 (metaloprotease de matriz tipo 3) e por aumento da síntese de proteases inibidoras de enzimas degradadoras da MEC, particularmente TIMP-1 (inibidor tecidual da metaloprotease tipo 1). (56)

A desregulação do microambiente da medula óssea também contribui para a patogênese da fibrose e a progressão da doença. (58)(11) Neste microambiente, as células tronco hematopoéticas interagem com as células estromais, osteoclastos e células endoteliais que compõe o nicho hematopoético, dividido nos compartimentos endosteal e vascular. O nicho endosteal, ou quiescente, localiza-se próximo à borda óssea, é perfundido por arteríolas e tem inervação simpática. Contém osteoblastos derivados das células tronco mesenquimais, essenciais para suporte das CTH normais e sua manutenção em quiescência. O nicho vascular, ou proliferativo, está localizado na área central rica em oxigênio e regula a proliferação, diferenciação e mobilização das células tronco. Um desequilíbrio entre os dois nichos tem sido implicado na patogênese das neoplasias mieloproliferativas. (58)

As CTH clonais estimulam a produção de células estromais osteoblásticas por contato celular direto e através de citocinas como a trombopoetina e a CCL3. Os osteoblastos expandidos têm maior expressão de genes envolvidos em regulação da matriz extracelular, adesão celular e respostas inflamatórias, incluindo alvos do TGF- β 1, o que compromete sua capacidade de dar suporte à população hematopoética normal.(53) Ademais, a maior expressão de osteoprotegerina inibe a formação de osteoclastos, contribuindo para a osteosclerose característica da doença avançada. (57)

A inflamação e a fibrose lesam as fibras simpáticas e as células de Schwann que inervam a medula óssea, causando neuropatia simpática do nicho endosteal e aumentando a mieloproliferação. (11,32) Assim, um clone maligno de CTH pode

transformar o nicho hematopoético em um ambiente patológico, que favorece a manutenção das células neoplásicas em detrimento das células hematopoéticas normais. (11,58)

1.4.2 HEMATOPOESE EXTRAMEDULAR

A hematopoese extramedular ocorre em geral no fígado e baço, mas pode acometer qualquer órgão. Outros sítios frequentes são linfonodos, superfícies serosas, sistema urogenital, pele e espaços epidural e paraespinal. (56)

A mobilização das células tronco (hematopoéticas, mesenquimais e endoteliais) da medula óssea resulta de defeitos de adesão ao estroma medular, que permitem que as células evadam de seus nichos, ganhem a corrente sanguínea e colonizem baço, fígado e outros órgãos. O processo pode estar relacionado a alteração da expressão de moléculas de adesão de membrana e integrinas, redução da expressão de *CXCR4* nas células CD34+ (relacionada a hipermetilação do promotor do *CXCR4*) e ruptura do eixo *CXCR3/SDF1* por proteólise, gerada por alteração da produção de proteases. A via JAK/STAT está envolvida na ativação de genes responsáveis pela síntese de metaloproteases, o que sugere participação da mutação JAK2 na mobilização de células CD34. (58)

A mutação JAK2 reduz a expressão de MPL na superfície celular, facilitando a migração das CTH mutadas do nicho endosteal para o nicho sinusoidal. O processo é acelerado na presença de CXCL12, secretada por algumas células reticulares. No nicho vascular as CTH podem se diferenciar em resposta a trombopoetina (cujos níveis plasmáticos encontram-se elevados pela redução da expressão de MPL), ou deixar a medula através dos sinusóides para colonização do baço ou outros órgãos. (11)

Os nichos vasculares são adaptáveis, e podem ser criados ou reinicializados em condições patológicas para permitir *homing*, proliferação e diferenciação, possibilitando a sobrevivência celular. Em portadores de MFP os fibroblastos e células mesenquimais do baço possuem expressão anormal de moléculas de adesão, MEC, fatores de crescimento e citocinas, contribuindo para criar um microambiente favorável à proliferação e diferenciação das CTH neoplásicas. (58)

1.4.3 TROMBOSE

As NMP estão associadas com alta prevalência de eventos trombóticos arteriais e venosos, especialmente em sítios pouco usuais como a circulação esplâncnica e cerebral. São as desordens pró-trombóticas mais frequentes em indivíduos com trombose esplâncnica ³ na ausência de cirrose ou malignidade adjacente, respondendo por cerca de 40% dos casos de síndrome de Budd-Chiari e 30% das trombooses de veia porta. (59)

Dentre as NMP, a MFP é o subgrupo com menor frequência de eventos trombóticos. A prevalência de trombose venosa é de cerca de 3 a 7% ao diagnóstico. (59). Excluindo-se a trombose após esplenectomia, a taxa cumulativa global de morte cardiovascular e complicações trombóticas não fatais é de 2,23 eventos por 100 pessoas por ano, sem diferença significativa entre trombose venosa e arterial (0,76% e 0,86% pacientes por ano, respectivamente). A taxa de trombose relativamente mais baixa pode ser atribuída à maior frequência de eventos concorrentes, como o desenvolvimento de leucemia aguda ou outras complicações não cardiovasculares graves, incluindo a morte precoce. A propensão à trombose nas NMP deriva da mieloproliferação clonal e de anormalidades nas células endoteliais normais, que se tornam pró-coagulantes em resposta a estímulos inflamatórios. (60)

A presença de JAK2 em doentes com NMP está associada a um maior risco de eventos trombóticos: os megacariócitos mutados estão hiperativados, com mais mobilidade e agregação; tem maior quimiotaxia e maior produção de plaquetas reticuladas, cuja atividade hemostática é aumentada. As plaquetas formadas circulam em estado ativado, apresentando maior expressão de P-selectina e fator tecidual, além de liberarem mais partículas pró-coagulantes. Ainda, a ativação de leucócitos causa lesão plaquetária e endotelial, levando a secreção de fatores pró-coagulantes e contribuindo para maior ativação e agregação plaquetária. (60)

A osteoprotegerina derivada das células estromais também está envolvida nas complicações vasculares das NMP, reforçando o papel crítico dos componentes endoteliais e estromais dos nichos hematopoéticos na patogênese da MF. (58)

³ i.e., trombose de veias porta, supra-hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), esplênica ou mesentéricas

Os fatores de risco para eventos trombóticos em NMP incluem idade avançada, hemoglobina elevada, trombose prévia, JAK2 mutada e leucocitose. A progressão da plaquetose e leucocitose acompanha a elevação de carga alélica da mutação JAK2, o que condiz com a observação de maior incidência de trombose em indivíduos portadores da mutação JAK2V617F e leucocitose. Até o momento não há evidências de que as mutações CALR ou MPL predisponham a trombose em indivíduos com MFP. (59) A presença de fibrose reticulínica é fator de risco independente para trombose e hemorragia. (59,60)

1.4.4 LEUCEMIA AGUDA

Em 11% dos portadores de MFP ocorre transformação para leucemia aguda, associada a prognóstico muito desfavorável. (11)

O risco de agudização aumenta com a idade, exposição a quimioterápicos, aquisição de dissomia uniparental do 9p, amplificação 1q (que envolve o MDM4, inibidor do TP53) e anomalias citogenéticas e mutações adicionais. (11)

As células neoplásicas podem originar-se da própria CTH clonal ou derivarem de um sub-clone com novas mutações, como ocorre em indivíduos de leucemia aguda *de novo*. (11) Portadores de mutações da CALR tem menor risco de evolução para leucemia aguda, enquanto indivíduos triplo negativos carregam maior risco de leucemização. O tipo de mutação *driver* não interfere na sobrevida após transformação. (61)

1.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

A classificação da OMS atualmente utilizada baseia-se em uma abordagem multiparamétrica para definição de doença, utilizando-se de dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos. (5,6)

A maioria dos pacientes com MFP apresenta-se com trombocitose, portanto a biópsia de medula é fundamental para o diagnóstico diferencial com TE. A classificação da OMS de 2008 incluía a MFP pré-fibrótica como um pródromo da MFP; todavia, a significância prognóstica de diferenciação entre TE, MFP pré-fibrótica e MFP com fibrose fez com que os critérios diagnósticos para MFP pré-fibrótica e MFP com fibrose evidente fossem estabelecidos na revisão de 2016. (6)

A análise microscópica da medula óssea revela acentuada hiperplasia e atipia de megacariócitos, que se apresentam em aglomerados densos adjacentes aos sinusóides e trabéculas ósseas, com retardo maturativo, cromatina densa e núcleos em forma de nuvem ou balão. Com a evolução da doença ocorre progressiva deposição de fibras de reticulina e colágeno, neoangiogênese e espessamento e distorção das trabéculas ósseas, que gradativamente ocupam a medula óssea. Focos de células imaturas (blastos) podem ser encontrados, em geral representando menos de 10% dos elementos celulares. A presença de 10 a 19% de blastos caracteriza a fase acelerada da doença, e 20% ou mais, evolução para leucemia aguda. (5) (62)

Diversos escores foram criados para quantificação da fibrose, o primeiro deles por Bauermeister, em 1971, modificado em 2001, que varia entre zero e quatro.(63) Atualmente a OMS preconiza a adoção do escore proposto pelo Consenso Europeu para Avaliação de Fibrose e Celularidade Medular, de 2005, criado por 150 especialistas a fim de simplificar as descrições anteriores e tornar a classificação mais precisa e reprodutível. A reticulina é detectável por coloração argêntica, e o colágeno por tricromos. (64)

Tabela 2 - Consenso Europeu para Gradação da Fibrose Medular

GRAU	DESCRIÇÃO
MF-0:	Reticulina linear dispersa sem intersecções (crossovers), correspondente a medula óssea normal
MF-1	Rede solta de reticulina com muitas intersecções, especialmente em áreas perivasculares
MF-2:	Aumento difuso e denso da reticulina com intersecções extensas, ocasionalmente com feixes focais de fibras de colágeno e / ou osteosclerose focal *
MF-3	Aumento difuso e denso da reticulina com intersecções extensas e feixes grosseiros de fibras de colágeno, geralmente associado com osteosclerose significativa *
A densidade da fibra deve ser avaliada apenas em áreas hematopoiéticas.	
* Nos graus MF-2 ou MF-3 recomenda-se coloração tricrômica adicional	

Adaptado de: Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, Van Der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128–32.

Tabela 3 - Quantificação da reticulina e do colágeno da medula óssea, Bauermeister modificado

GRAU	DESCRIÇÃO
MF-0	Ausência de fibras de reticulina
MF-1	Fibras individuais finas ocasionais e focos de rede de fibras finas
MF-2	Rede de fibras finas na maior parte da amostra, sem fibras grosseiras
MF-3	Rede de fibras difusa, com fibras grosseiras espessas dispersas, mas sem colágeno maduro (coloração com tricromo negativo)
MF-4	Rede de fibra difusa, muitas vezes grossa, com áreas de colagenização (coloração com tricromo positivo)

Adaptado de: Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. Br J Haematol. 2007;139(3):351–62.

A avaliação da fibrose ainda é subjetiva e semi-quantitativa, sujeita a interferência de artefatos pré-analíticos, de coloração e da variabilidade de fibrose dentro de uma mesma amostra. Métodos de análise computacional e por luminescência tem se mostrado promissores para quantificação mais precisa e uniforme da fibrose. (57)

As mutações *driver* são importantes marcadores clonais nas NMP, mas o perfil mutacional destas doenças não se restringe a elas. As tecnologias de sequenciamento gênico são ferramentas válidas para identificar mutações concomitantes e ratificar a clonalidade da doença. (18) A caracterização molecular permite também avaliar a carga alélica, e assim estimar a ordem de aquisição das mutações em indivíduos que possuem mutações *driver* e não *driver*.

Os diagnósticos de MF pós PV e MF pós TE seguem os critérios publicados pelo International Working Group for Myeloproliferative Neoplasm Research and Treatment (IWG-MRT) em 2008, conforme tabelas número 7 e 8. (65)

Tabela 4 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária, OMS, 2008

Critérios maiores (necessários todos)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferação e atipia megacariocítica*, geralmente acompanhada por fibrose reticulínica e/ou colagênica. Na ausência de fibrose reticulínica importante as atipias de megacariócitos devem ser acompanhadas por aumento da celularidade da medula óssea ajustada pela idade, proliferação granulocítica e frequentemente diminuição da eritropoese (i.e., fase celular pré-fibrótica) 2. Não satisfazer os critérios da OMS para LMC BCR-ABL+, PV, TE, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mielóides 3. Presença de mutação JAK2 V617F ou outro marcador clonal, ou ausência de fibrose reticulínica reacional ‡
Critérios menores (no mínimo 2, em 2 determinações consecutivas)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leucoeritroblastose 2. Anemia não atribuída a uma comorbidade 3. Esplenomegalia palpável 4. DHL elevado

* Pequenos ou grandes megacariócitos com relação núcleo/citoplasma anormal, núcleo hipercromático, bulboso ou irregular e aglomerados densos.

‡ Fibrose reticulínica secundária a infecção, doença auto-imunes ou outras condições inflamatórias crônicas, tricoleucemia ou outras neoplasias linfóides, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crônicas).

Adaptado de: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J. VJW (Eds. . WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008; 2008.

Tabela 5 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária Pré-Fibrótica, OMS, 2016

Critérios maiores (necessários todos)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferação e atipia megacariocítica, sem fibrose reticulínica > grau 1, acompanhada de aumento da celularidade da medula óssea ajustada pela idade, proliferação granulocítica e frequentemente diminuição da eritropoese 2. Não satisfazer os critérios da OMS para LMC BCR-ABL+, PV, TE, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mielóides 3. Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL; na ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal, † ou ausência de fibrose reticulínica discreta reacional ‡
Critérios menores (no mínimo 1, confirmado em 2 determinações consecutivas)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia não atribuída a uma comorbidade 2. Leucocitose > 11 x 10⁹ / L 3. Esplenomegalia palpável 4. DHL elevado

† Na ausência de qualquer das mutações *driver*, a pesquisa das mutações colaborativas mais freqüentes (por exemplo, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1 / IDH2, SRSF2, SF3B1) ajudam na determinação da natureza clonal da doença.

‡ Fibrose reticulínica discreta (grau 1) secundária a infecção, doença auto-imune ou outras condições inflamatórias crônicas, tricoleucemia ou outras neoplasias linfóides, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crônicas).

Adaptado de: 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.

Tabela 6 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose Primária Fibrótica, OMS, 2016

Critérios maiores (necessários todos)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferação e atipia megacariocítica, acompanhada de fibrose reticulínica e / ou colagênica graus 2 ou 3 2. Não satisfazer os critérios da OMS para LMC BCR-ABL+, PV, TE, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mielóides 3. Presença de mutação JAK2, CALR ou MPL; na ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal, † ou ausência de fibrose reticulínica discreta reacional ‡
Critérios menores (mínimo 1, confirmado em 2 determinações consecutivas)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia não atribuída a uma comorbidade 2. Leucocitose > 11 x 10⁹ / L 3. Esplenomegalia palpável 4. DHL elevado 5. Leucoeritroblastose
<p>† Na ausência de qualquer das mutações <i>driver</i>, a pesquisa das mutações colaborativas mais freqüentes (por exemplo, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1 / IDH2, SRSF2, SF3B1) ajudam na determinação da natureza clonal da doença.</p> <p>‡ Fibrose secundária a infecção, doença auto-imune ou outras condições inflamatórias crônicas, leucemia de células pilosas ou outras neoplasias linfóides, malignidade metastática ou mielopatias tóxicas (crônicas).</p>	

Adaptado de: 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.

Tabela 7 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose pós Policitemia Vera, IWG-MRT, 2008

Critérios exigidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico prévio documentado de policitemia vera, definido pelos critérios da OMS 2. Fibrose da medula óssea grau 2-3 (na escala 0-3) ou grau 3-4 (na escala 0-4)
Critérios adicionais (necessários 2):	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia ou perda sustentada da necessidade de flebotomia ou tratamento citorrredutivo para policitemia 2. Leucoeritroblastose em sangue periférico 3. Esplenomegalia crescente, definida como um aumento de 5 cm da esplenomegalia palpável (distância da ponta do baço ao reborso costal esquerdo) ou o surgimento de esplenomegalia palpável 4. DHL elevado 5. Desenvolvimento de sintomas constitucionais: perda ponderal > 10% em 6 meses, sudorese noturna e/ou febre inexplicada

Adaptado de: Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437–8.

Tabela 8 - Critérios diagnósticos para Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial, IWG-MRT, 2008

Critérios exigidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico prévio documentado de trombocitemia essencial, definido pelos critérios da OMS 2. Fibrose da medula óssea grau 2-3 (na escala 0-3) ou grau 3-4 (na escala 0-4)
Critérios adicionais (necessários 2):	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia ** e diminuição de 2 g / dL do nível basal de hemoglobina 2. Esplenomegalia crescente, definida como um aumento de 5 cm da esplenomegalia palpável (distância da ponta do baço ao reborso costal esquerdo) ou o surgimento de esplenomegalia palpável 3. DHL elevado 4. Desenvolvimento de sintomas constitucionais: perda ponderal > 10% em 6 meses, sudorese noturna e/ou febre inexplicada

Adaptado de: Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437–8.

Os 5 a 10% de portadores de MFP triplo negativos tem fenótipo semelhante a síndrome mielodisplásica associada a mielofibrose, apresentando medula óssea hiperclular, displasia multilinhagem, citopenias graves com alta demanda transfusional, citogenética desfavorável e baixa sobrevida. (7)

Na MFP, e na MF pós PV e pós TE, ocorrem intenso tráfego das células tronco e precursores hematopoéticos (células CD34+) entre os compartimentos hematopoéticos. O número de células CD34+ circulantes está elevado na MF, e aumenta com a progressão da fibrose. Apesar de não ser recomendada como critério diagnóstico, a quantificação das células CD34+ ajuda a distinguir a MFP das demais NMP, a estimar indivíduos com MFP pré-fibrótica em risco de desenvolver fibrose medular e a prever evolução para leucemia aguda.(7)

1.6 ESCORES PROGNÓSTICOS

Ao longo dos últimos vinte anos diversos escores prognósticos para estratificação de risco em MFP foram criados, como os de Dupriez (Lille)(66), de Cervantes (67) e da Mayo Clinic.(68)

Em 2009 o consórcio IWG-MRT propôs o IPSS (Sistema Internacional de Pontuação do Prognóstico), com maior poder discriminatório entre os grupos de risco.

O escore foi posteriormente adaptado para o IPSS dinâmico (DIPSS) em 2010, e para o DIPSS-plus em 2011. (69–71)

Aplicável aos pacientes avaliados no diagnóstico inicial, o IPSS utiliza cinco preditores independentes de menor sobrevida: idade > 65 anos, hemoglobina <10 g / dL, contagem leucocitária > 25.000 x 10⁶ / L, blastos circulantes ≥ 1% e presença de sintomas constitucionais. A presença de 0, 1, 2 ou 3 fatores adversos definem o risco em baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto risco, com sobrevidas medianas de 11,3, 7,9, 4 e 2,3 anos, respectivamente. (69)

O DIPSS surgiu como modelo prognóstico dinâmico, que utiliza as mesmas variáveis prognósticas do IPSS, mas que pode ser aplicado a qualquer momento durante o curso da doença. O DIPSS atribui dois, em vez de um, pontos adversos para a hemoglobina <10 g / dL e a categorização do risco é modificada em conformidade: baixa (0 pontos adversos), intermediária 1 (1 ou 2 pontos), intermediária 2 (3 ou 4 pontos) e alta (5 ou 6 pontos). As médias de sobrevivência correspondentes foram não atingida, 14,2, 4 e 1,5 anos.(70)

Fatores de risco independentes do IPSS e DIPSS foram subsequentemente identificados e incorporados, passando a compor o DIPSS plus. Os três dados adicionais são cariótipo desfavorável (i.e., cariótipo complexo ou uma / duas anormalidades que incluem +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- ou rearranjo 11q23), necessidade de transfusão de hemácias e plaquetas < 100.000 10⁹/L. As quatro categorias de risco DIPSS-plus baseadas nestes oito fatores de risco acima mencionados são: baixo (sem fatores de risco), intermediário-1 (um fator de risco), intermediário-2 (dois ou três fatores de risco) e alto (quatro ou mais fatores de risco) com respectivas sobrevivências médias de 15,4, 6,5, 2,9 e 1,3 anos. (71)

Tabela 9 - Estratificação de risco conforme IPSS e DIPSS

FATORES DE RISCO	PONTUAÇÃO IPSS	PONTUAÇÃO DIPSS
Hemoglobina < 10g/dL	1	2
Sintomas constitucionais	1	1
Idade > 65 anos	1	1
Leucócitos > 25 x 10 ⁹ /L	1	1
Blastos circulantes ≥ 1%	1	1

Adaptado de: Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703–8.

Tabela 10 - Estratificação de risco conforme DIPSS plus

FATORES DE RISCO	PONTUAÇÃO
Pontuação DIPSS	0 a 3
Necessidade de transfusão de hemácias	1
Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L	1
Cariótipo desfavorável +8, -7/7q, i(17)q, -5/5q, 12p-, inv(3), rearranjo 11q23	1

Adaptado de: Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011;29(4):392–7.

Tabela 11 - Grupos de risco e sobrevida média conforme IPSS, DIPSS ou DIPSS plus

Grupos de risco	IPSS		DIPSS		DIPSS plus	
	Pontuação	SM*	Pontuação	SM*	Pontuação	SM*
Baixo	0	11,3	0	>20	0	>15
Intermediário 1	1	7,9	1-2	14,2	1	6,6
Intermediário 2	2	4,0	3-4	4,0	2-3	2,9
Alto	≥3	2,3	5-6	1,5	4-6	1,3

*Sobrevida média, em anos

Adaptado de: Passamonti F, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT. *Blood.* 2010 Mar 4;115(9):1703–8.

Tais escores baseiam-se essencialmente em parâmetros clínicos e hematológicos. Entretanto, há evidências de que o tipo de mutação *driver* impacta a sobrevida global e o risco de transformação leucêmica. A mediana global de sobrevida em indivíduos com mutações da CALR, JAK2, MPL ou triplo negativos é respectivamente de 17,7, 9,2, 9,1 e 3,2 anos. Os doentes triplo negativos tem maior incidência de transformação leucêmica. Baseado nestas observações, criou-se um modelo prognóstico que incorpora o perfil mutacional aos dados de IPSS. O MIPSS (*Mutation Enhanced IPSS*) tem maior capacidade de predição de sobrevida global e sobrevida livre de leucemia que o IPSS. (61)(42)(72)

Não obstante, a presença de citogenética desfavorável segue sendo um fator adverso, independente do MIPSS; por isso, foi proposto o GPSS (*Genetics-Based Prognostic Scoring System*), baseado apenas na idade e informações genômicas. Quatro categorias de risco citogenético foram identificadas:(73)

- Muito alto (3): cariótipo monossomal, inv(3), i(17q), -7/7q-, anormalidade do 11q ou 12p

- Alto (1): cariótipo complexo não monossomal, duas anormalidades não incluídas na categoria de risco muito alto, 5q-, +8 e outras trissomias (exceto +9), e outras
- Intermediário: 20q-, 1q+, translocações isoladas, -Y ou outra anormalidade em cromossomo sexual
- Baixo: normal, 13q- ou +9 isolados

Tabela 12 - Estratificação de risco conforme MIPSS

FATORES DE RISCO	PONTUAÇÃO
Idade > 60 anos	1,5
Sintomas constitucionais	0,5
Hemoglobina < 10 g/ dL	0,5
Plaquetas < 200 x 10 ⁹ / L	1,0
Triplo negativo	1,5
Mutação JAK2 ou MPL	0,5
Mutação ASXL1	0,5
Mutação SRSF2	0,5

Adaptado de: Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, Pascutto C, Pardanani A, Ferretti V, et al. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. Blood. 2014 Dec 4;124(21):405 LP-405.

Tabela 13 - Estratificação de risco conforme GPSS

FATORES DE RISCO	PONTUAÇÃO
Idade > 60 anos	2,0
Citogenética de muito alto risco	3,0
Citogenética de alto risco	2,0
Triplo negativo	2,0
Mutação JAK2	2,0
Mutação MPL	2,0
Mutação CALR tipo 2	2,0
Mutação ASXL1	1,0
Mutação SRSF2	1,0

Adaptado de: Tefferi A, Guglielmelli P, Finke C, Lasho TL, Gangat N, Ketterling R, et al. Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis. Blood. 2014 Dec 4;124(21):406 LP-406.

Tabela 14 - Grupos de risco e sobrevida média conforme MIPSS e GPSS

Grupos de risco	MIPSS		GPSS	
	Pontuação	SM*	Pontuação	SM*
Baixo	0 – 0,5	26,4	0	>17
Intermediário 1	1 – 1,5	9,7	1-2	>9
Intermediário 2	2 – 3,5	6,4	3-4	5,0
Alto	≥4	1,9	≥5	2,2

*Sobrevida média, em anos

Adaptado de: Vannucchi AM et al. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. *Blood*. 2014 Dec 4;124(21):405 LP-405, e Tefferi A, et al. Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis. *Blood*. 2014 Dec 4;124(21):406 LP-406.

A MFP é uma doença geneticamente complexa, marcada por combinações diversas de mutações *driver* e colaborativas. As mutações *IDH*, *EZH2*, *SRSF2* ou *ASXL1* estão associadas a menor sobrevida global e maior risco de transformação leucêmica, independentemente do DIPSS plus.(74) Ademais, a simples coexistência de quaisquer duas mutações não *driver* impacta negativamente o prognóstico. (20) A presença de cariótipo monossomal, inv (3) / i (17q), ou a combinação de 2 fatores entre blastos >9%, leucócitos > 40.000 ou outro cariótipo desfavorável está associada a mortalidade em 2 anos acima de 80%. (49)

Outras variáveis de prognóstico independentes incluem nulizigose para haplótipo JAK2 46/1, baixa carga alélica de JAK2V617F, níveis séricos elevados de IL-8, IL-2R e cadeias leves livres e presença de ASXL1+/CALR -. (4)

Fatores de risco para evolução para leucemia aguda incluem blastos circulantes ≥3%, plaquetas <100.000/L, cariótipo desfavorável e as mutações SRSF2, RUNX1, CEBPA, SH2B3, IDH e ASXL1. (4)

Além disso, graus mais elevados de fibrose medular representam uma variável adversa independente em pacientes com MFP, (75) associados a menor sobrevida global, mais sintomas constitucionais, maior esplenomegalia, maior risco de anemia e plaquetopenia e maior IPSS score. Não foi demonstrada associação de nenhuma mutação *driver* com o grau de fibrose, mas as mutações ASXL1 e EZH2 estão associadas a fibrose mais severa. Em indivíduos com TE a presença de fibrose medular associa-se a maior risco de evolução para MF, maior risco de trombose arterial e de hemorragia. (53)

As mutações de CALR estão associadas a idade mais jovem, maior contagem de plaquetas e menor escore DIPSS-plus, além de menor probabilidade de anemia, de necessidade transfusional ou de leucocitose. Mutações do spliceosoma são infrequentes em pacientes mutados com CALR. (7)

1.7 TRATAMENTO

A correta estratificação de risco auxilia na tomada de decisões terapêuticas, permitindo otimizar os benefícios das terapias disponíveis e evitar toxicidades desnecessárias. (18,76)

A única modalidade de tratamento potencialmente curativa em MFP é o transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (TACTH). Entretanto, menos de 10% dos pacientes são candidatos ao transplante, em virtude das altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas ao procedimento (20 a 50%), das frequentes comorbidades coexistentes e da escassez de potenciais doadores familiares, que em geral também são idosos. (76)

Atualmente recomenda-se o TACTH a pacientes menores de 70 anos com risco intermediário 2 ou alto (pelo IPSS, DIPSS ou DIPSS-plus), ou em casos selecionados de indivíduos de risco intermediário 1 com anemia severa, blastos circulantes ou perfil citogenético ou molecular desfavorável. (76)

Para a vasta maioria de não candidatos ao transplante, o tratamento é direcionado ao controle da anemia, da esplenomegalia e dos sintomas sistêmicos. A anemia ocorre em mais de um terço dos pacientes e é um forte preditor de pior sobrevida. As drogas empregadas para controle incluem androgênios, corticoesteróides, danazol, talidomida, lenalidomida e eritropoetina, mas oferecem respostas transitórias que variam de 20 a 40% e significativos efeitos colaterais. (11,76) A leucocitose, trombocitose e esplenomegalia podem ser manejados com Hidroxiuréia, um agente citorredutor amplamente utilizado. (11,76)

A esplenectomia está reservada a esplenomegalia refratária, ou em casos selecionados de hipertensão portal sintomática ou anemia com grande demanda transfusional. A melhora das citopenias dura em média 1 ano, mas o procedimento associa-se a complicações como infecção, trombose e hemorragias em 30 a 40% dos casos, e a mortalidade perioperatória de 9%. Há controvérsia sobre aumento do risco de transformação leucêmica após esplenectomia. (18,76)

A irradiação esplênica pode promover redução transitória do tamanho do baço, mas associa-se a pancitopenia severa. Doses baixas de radiação podem ser empregadas para tratamento de hematopoese extra-medular localizada, e para hipertensão pulmonar associada a MFP. (18,76)

O Interferon é um medicamento utilizado há décadas para tratamento de NMP. É o único agente disponível que age na CTH, estimulando as CTH quiescentes a proliferarem. Como a proliferação é mais acentuada nas CTH com mutação JAK2V617F, a droga desencadearia depleção preferencial da população neoplásica e erradicação da doença. A medicação alivia sintomas constitucionais, reduz a esplenomegalia e pode eventualmente induzir remissão molecular, mas as respostas são erráticas e os efeitos colaterais, como imunossupressão, mielotoxicidade e neurotoxicidade, limitam seu uso em alguns indivíduos. (11,32)

Uma grande revolução no tratamento das NMPs foi a introdução de terapia alvo, com os inibidores de JAK. O Ruxolitinibe, um inibidor de JAK1 e JAK2, suprime a produção de citocinas inflamatórias e a mieloproliferação, desencadeando redução da esplenomegalia e dos sintomas constitucionais e possível aumento de sobrevida. Entretanto, a medicação pode desencadear infecções oportunistas e citopenias, que frequentemente levam à suspensão do tratamento e eventual surgimento de sintomas rebote. A medicação não age diretamente na CTH mutada. Ainda que seu uso prolongado possa reduzir o grau de fibrose medular e a carga de alelos mutados, raramente ocorre completa remissão histopatológica ou molecular. A probabilidade de resposta favorável ao Ruxolitinib diminui consideravelmente na presença de mutações adversas. (11,76)

Atualmente, a droga está indicada para indivíduos de risco intermediário 2 ou alto não candidatos a TACTH, e em casos selecionados de baixo risco pelos escores convencionais (por exemplo, esplenomegalia maciça refratária, sintomas constitucionais severos ou perfil mutacional adverso).(76)

Outros inibidores de JAK, como o Momelotinib, e drogas que têm como alvo diversas vias ativadas em NMP, além da JAK2, vem sendo testadas em ensaios clínicos, em combinações diversas. Destacam-se os inibidores da via PI3K/Akt/mTOR, secundariamente ativada com a ativação JAK-STAT; inibidores de histona deacetilase; agentes hipometilantes; inibidores de telomerase; inibidores da via hedgehog; agentes antiangiogênicos e anticorpos monoclonais contra TGFb e LOXL2, envolvidos na fibrose medular. (76)

Apesar dos avanços, o arsenal terapêutico na MFP ainda é insuficiente para sobrepor-se a alta morbimortalidade relacionada à doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo é analisar o perfil de mutações *driver* (i.e., *JAK2*, *CALR* e *MPL*) em portadores de Mielofibrose Primária ou Secundária atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital de Base do Distrito Federal, e correlacioná-lo ao desfecho clínico destes doentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência das mutações *driver* em uma amostra de pacientes brasileiros com Mielofibrose;
- Avaliar características clínicas e citogenéticas, variáveis prognósticas e modalidades de tratamento dos pacientes incluídos no estudo;
- Investigar diferenças clínicas e mutacionais entre portadores de Mielofibrose Primária ou Secundária;
- Testar e impulsionar o uso da técnica de MLPA como ferramenta diagnóstica em portadores de neoplasias hematológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo observacional analítico, transversal.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos neste estudo pacientes portadores de Mielofibrose Primária ou Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial, provenientes do Serviço de Hematologia do Hospital de Base do Distrito Federal, acompanhados regularmente de agosto de 2015 a outubro de 2017.

Todos os pacientes foram diagnosticados conforme os Critérios Diagnósticos da OMS de 2008.

Todos os sujeitos incluídos eram maiores de 18 anos, legalmente capazes, e concordaram com a participação no estudo e assinatura do TCLE.

As informações clínico-laboratoriais foram obtidas durante consulta médica, e/ou por revisão de prontuários eletrônicos.

As amostras de material biológico consistiram em alíquotas de sangue periférico, coletadas por profissional de saúde devidamente habilitado através de venopunção de membro superior, obedecendo técnica asséptica. Foram incluídas ainda amostras de material biológico de cinco indivíduos saudáveis para controle interno.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), sob número de registro CAAE 19493613.5.0000.5553 e parecer número 525.330.

3.3 PARÂMETROS AVALIADOS

3.3.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

Foram coletadas informações referentes ao diagnóstico (MF primária ou secundária), gênero, idade ao diagnóstico, tempo de seguimento, presença de hematopoese extramedular, estratificação de risco de acordo com IPSS, DIPSS e

DIPSS plus, dependência transfusional, tratamentos instituídos e desfechos clínicos (fenômenos tromboembólicos e hemorrágicos, evolução para leucemia aguda e óbito).

3.3.2 PARÂMETROS LABORATORIAIS

Foram analisados valores de Hemoglobina, Leucócitos Totais, Plaquetas e Blastos circulantes ao diagnóstico, e ao longo do tempo de seguimento (até a data de óbito ou última avaliação clínica).

Averiguaram-se também dados de prontuário referentes a Desidrogenase Láctica, Proteína C Reativa, Velocidade de Hemossedimentação, Citogenética (cariótipo de medula óssea por bandas G, e/ou aCHG/SNP array de sangue periférico) e status da mutação JAK2 por metodologia de PCR.

3.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES *DRIVER* POR MLPA

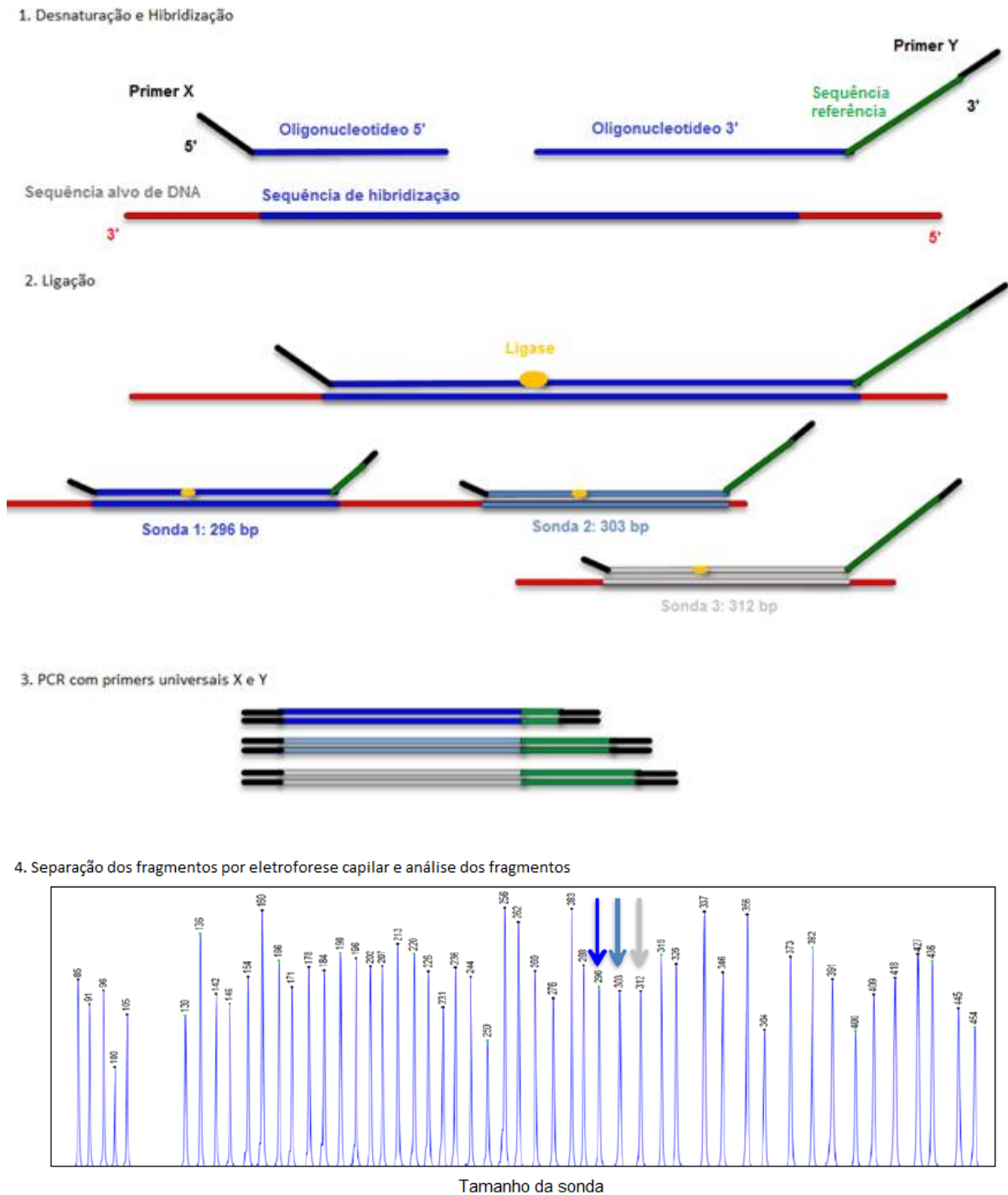
A técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) foi utilizada para investigação de deleções ou duplicações nos genes JAK2, CALR e MPL.

Trata-se de uma técnica semi-quantitativa designada para determinação de número de cópias relativo de até 60 sequências de DNA, por meio de hibridação a sondas específicas e amplificação por única reação de PCR multiplex.

Cada sonda consiste em dois oligonucleotídeos que devem se hibridizar a sequências alvo imediatamente adjacentes, para serem então fundidos em uma única sonda através de uma ligase. Somente sondas perfeitamente complementares ao DNA alvo serão ligadas, o que permite a detecção de mutações de ponto na região de ligação. Todos os fragmentos formados pela junção das sondas são amplificados por PCR, em uma reação que utiliza um único par de *primers*, comum a todas as sondas. Um dos *primers* é marcado com uma sequência de referência, que confere à sonda um tamanho específico e permite a visualização dos produtos amplificados durante a separação dos fragmentos.

A separação dos fragmentos é feita por eletroforese capilar, gerando um eletroferograma específico, posteriormente analisado através de software eletrônico. A altura relativa de cada pico de sonda, comparada à altura do pico no DNA de referência, reflete o número de cópias relativo da sequência alvo da amostra. Redução do pico indica deleção, e aumento do pico indica amplificação. (77,78)

Figura 11 - Visão geral da reação de MLPA



(1) As sondas MLPA são formadas por 2 hemissondas, cada uma ligada a um primer, que devem se hibridar a sequências complementares adjacentes. O segmento 3' possui uma sequência marcadora não-hibridante (verde), que dá à sonda um comprimento específico. Para iniciar a reação, a mistura de sondas MLPA é adicionada ao DNA desnaturado durante aproximadamente 16 horas para hibridação. (2) Após hibridação ao DNA alvo os dois oligonucleótidos são ligados enzimaticamente, formando uma única sonda e criando um modelo para a reação de PCR subsequente. (3) O par de primers de PCR é comum a todas as sondas MLPA (X e Y); a reação de PCR amplifica os primers e, conseqüentemente, as sondas a eles ligadas. (4) Devido aos diferentes comprimentos das sequências marcadoras, os produtos de amplificação de diferentes sondas MLPA podem ser separados, identificados e quantificados por eletroforese capilar. Quantidades relativas dos produtos de amplificação, em

comparação com uma amostra de DNA de referência, refletem o número de cópias relativo das sequências alvo.

Adaptado de: Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Mol Pathol.* 2012 Dec;21(4):189–206.

Neste estudo foram utilizados os kits SALSA® MLPA® probemix P420-A1 MPN mix 1 e SALSA® MLPA® P520-A1-0115 MPN mix 2, fornecidos pela MRC-Holland. (79,80) O mix P420-A1 contém 27 sondas de MLPA, sendo nove sondas para oito mutações relacionadas a NMP (tabela abaixo) e 18 sondas de referência, que geram produtos de amplificação de 115 a 338 nt. Contém ainda nove fragmentos de controle, que geram produtos com menos de 120 nt: quatro fragmentos de controle de quantidade de DNA (fragmentos Q) em 64-70-76-82 nt, três fragmentos de controle de denaturação do DNA (fragmentos D) em 88-92-96 nt, um fragmento X em 100 nt e um fragmento Y em 105 nt.

Tabela 15 - Mutações pesquisadas

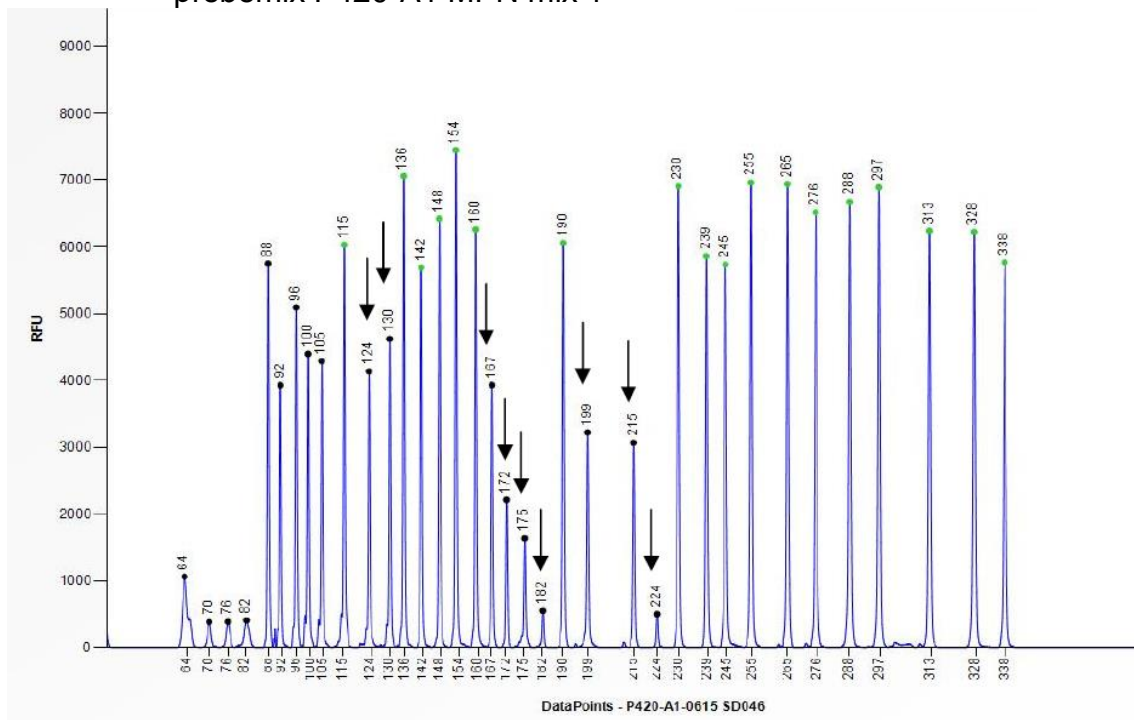
JAK2 V617F = c.1849G>T
JAK2 E543-D544del = c.1627_1632delGAAGAT
JAK2 N542-E543del = c.1624_1629delAATGAA
MPL W515L = c.1544G>T
MPL W515K = c.1543_1544TG>AA
KIT D816V = c.2447A>T
CALR L367fs*46 = c.1092_1143del52
CALR K385fs*47 = c.1154_1155insTTGTC

Tabela 16 - Mix de sondas SALSA MLPA P420-A1 MPN mix 1

Tamanho (nt)	Sonda	Posição cromossômica		
		Referência	Banda	Mutação
64-70-76-82	Fragmentos Q: quantidade de DNA; visíveis apenas com menos de 100 ng de DNA na amostra			
88-92-96	Fragmentos D: sinal baixo nos fragmentos de 88 ou 96 nt indica desnaturação incompleta			
100	Fragmento X: Específico para cromossomo X			
105	Fragmento Y: Específico para cromossomo Y			
115	Sonda referência S0973-L26704	4p13		
124	Sonda CALR S0999-L26702		19p13.2	L367fs*46=c.1092_1143del52
130	Sonda CALR S1001-L26517		19p13.2	K385fs*47=c.1154_1155insTTGTC
136	Sonda referência 16316-L25926	3q21.3		
142	Sonda referência 07387-L26769	12q13.11		
148	Sonda referência 10663-L11245	6p12.2		
154	Sonda referência 13781-L15275	11p14.1		
160	Sonda referência 17621-L21665	10q22.2		
167	Sonda JAK2 16924-L21237		9p24.1	N542_E543del=c.1624_1629delAATGAA

172	Sonda JAK2 16924-L21238		9p24.1	E543_D544del=c.1627_1632delGAAGAT
175	Sonda MPL S1048-SP0405-L21261		1p34.2	W515K=c.1543_1544TG>AA
182	Sonda MPL S1048-SP0405-L23898		1p34.2	W515L=c.1544G>T
190	Sonda referência 11556-L26717	5q31.2		
199	Sonda KIT 17722-SP0542-L23707		4q12	D816V=c.2447A>T
215	Sonda JAK2 05672-L21576		9p24.1	V617F=c.1849G>T
224	Sonda JAK2 05672-L21791		9p24.1	V617F=c.1849G>T (sinal 5x mais baixo)
230	Sonda referência 17130-L26574	11p11.2		
239	Sonda referência 05386-L26770	12p11.21		
245	Sonda referência 13572-L26953	1q23.2		
255	Sonda referência 08728-L26718	9q21.13		
265	Sonda referência 12434-L26073	14q24.3		
276	Sonda referência 16270-L26771	20q11.23		
288	Sonda referência 05713-L20268	2p11.2		
297	Sonda referência 04570-L20036	16q13		
313	Sonda referência 04833-L20693	5p13.2		
328	Sonda referência 13397-L26608	6q12		
338	Sonda referência 12785-L15496	2q12.3		

Figura 12 - Eletroferograma de DNA controle, feminino, analisado com SALSA MLPA probemix P420-A1 MPN mix 1



Estão indicadas as localizações das sondas específicas para as mutações em 124 nt (CALR tipo 1), 130 nt (CALR tipo 2), 167 nt (JAK2 éxon 12), 172 nt (JAK2 éxon 12), 175 nt (MPL W515K), 182 nt (MPL W515L), 199 nt (KIT), 215 nt (JAK2 V617F) e 224 nt (JAK2 V617F).

Fonte: MRC-Holland. SALSA MLPA probemix P420-A1 MPN mix 1. 2015 p. 7.

O mix P420-A1 detecta mutações presentes em no mínimo 10 a 20% dos alelos. Para cargas alélicas mais baixas é utilizado o mix P520-A1, que contém sondas para as mesmas mutações, mas maior sensibilidade, permitindo a detecção de mutações de ponto com carga alélica de apenas 1%.

3.4.1 ETAPAS DO PROCEDIMENTO

3.4.1.1 *Obtenção de DNA*

Foram coletados 4 ml de sangue periférico por punção venosa, em tubo contendo EDTA.

3.4.1.2 *Extração e quantificação de DNA*

O DNA genômico foi extraído da amostra de sangue total através do método Puregene – “Salting out” (Gentra, Minneapolis, MN, USA).

A primeira etapa do método consiste em lise celular, através de reações com uma solução de 5mM MgCl₂ + 1mM EDTA pH 8,0, e outra de 10mM Tris pH 7,5 + 1mM EDTA pH 8,0 + 1% SDS, cada uma centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos.

A seguir, ao lisado celular é adicionado 1 ml da solução de precipitação de proteína, que contém 7,5M de NH₄ Ac. Centrifuga-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante é transferido para um tubo falcon contendo 3ml de isopropanol. O tubo é invertido lentamente até que se forme um novelo de DNA. A amostra é centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos; o sobrenadante é retirado, adiciona-se 3ml de etanol absoluto e procede-se a nova centrifugação. Após, o tubo é drenado e o DNA permanece em temperatura ambiente por 15 minutos para secagem.

Finalmente, acrescenta-se ao tubo com o DNA 200-250 µl de TE 1x ou água milliQ, que resulta em uma concentração aproximada de 400 ng/µl. O DNA é armazenado a 2-8°C.

As quantificações foram feitas no espectrofotômetro Nanovue® (GE) e Qubit® (Life Technologies). No primeiro foi possível obter a razão 260/280 nm, que se pode observar a pureza da amostra. No segundo, a quantificação de DNA foi dada de maneira mais precisa.

3.4.1.3 *Preparação da amostra*

Para cada reação de MLPA utiliza-se uma amostra de 5 μ L, contendo 50-250 ng de DNA. A amostra pode ser preparada por diluição do DNA em solução tampão TE 0.1 (10 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 mM EDTA) ou água.

Além das amostras teste, são incluídas no experimento amostras de referência, um controle negativo contendo apenas a solução tampão, e um controle positivo (SD046 Sample DNA, MRC-Holland) que contém sondas específicas para todas as mutações.

3.4.1.4 *Desnaturação do DNA da amostra*

As amostras de DNA e as amostras controle foram colocadas no termociclador a 98°C por 5 minutos para desnaturação. Após, foram resfriadas até a 25°C e removidas do termociclador.

3.4.1.5 *Hibridização das sondas ao DNA*

O mix de hibridização foi preparado a partir da mistura de 1,5 μ L de MLPA buffer e 1,5 μ L do mix de sondas, previamente vortexado, por reação. Em cada amostra foram adicionados os 3 μ L da mistura, seguindo-se desnaturação a 95 °C por 1 minuto e hibridização overnight a 60°C.

3.4.1.6 *Ligação das sondas hibridizadas*

Após 16 a 20 horas de hibridização, as amostras foram resfriadas a 54°C e a cada uma foram adicionados 32 μ L do mix de ligação, contendo 25 μ L de H₂O, 3 μ L de Ligase Buffer A, 3 μ L de Ligase Buffer B e 1 μ L de enzima Ligase-65. Os tubos foram então incubados a 54° por 15 minutos, para ligação, e a 98 °C por 5 minutos para inativação da Ligase-65. Após resfriados a 20°C foram removidos do termociclador e seguiram para amplificação.

3.4.1.7 *Amplificação das sondas ligadas por PCR*

Para a reação de PCR foi preparada uma solução contendo 7,5µL de H₂O, 2 µL do mix de primers de PCR e 0,5 µL de polimerase. 10 µL da solução foram adicionados em cada amostra, que seguiram para o termociclador para amplificação. O protocolo de amplificação consistiu em 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, hibridização a 60 °C por 30 segundos e extensão de 30 segundos a 72°C, seguidos de extensão final a 72°C por 20 minutos e pausa a 15°C.

3.4.1.8 *Eletroforese capilar dos produtos de PCR*

Após amplificação, 0,7 µL da reação de PCR foram misturados a 0,2 µL do marcador de peso molecular GS500 LIZ® (Applied Biosystems, EUA) e 9 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA) e submetidos à eletroforese capilar, utilizando-se o sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems).

3.4.2 ANÁLISE DE DADOS

3.4.2.1 *Interpretação do MLPA*

Para interpretação dos resultados de MLPA foi utilizado o software Coffalyser.net (MRC-Holland), que determina os picos relativos de cada amostra e os compara às amostras de referência.

3.4.2.2 *Análise estatística*

As variáveis numéricas foram sumarizadas por mediana e variação, e as variáveis categóricas por contagem e frequência relativa (%) de cada categoria.

Comparações entre variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste exato de Kruskal-Wallis, e as associações entre variáveis qualitativas foram testadas empregando-se o teste exato de Qui-quadrado.

As distribuições das variáveis quantitativas entre os diferentes grupos durante o seguimento foram comparadas por Análises de Covariância (ANCOVA). Nos modelos ANCOVA, considerou-se como variável dependente as medidas obtidas ao

final do seguimento, os diagnósticos (MF primária ou secundária) como variável independente e as medidas no basal como covariável.

A associação entre variáveis categóricas foi avaliada através do teste exato de Fisher.

A comparação das distribuições dos grupos de risco DIPSS ao final do acompanhamento com os tipos de mutação foi realizada usando-se um modelo de equações generalizadas (GEE), com função *logito* acumulado. Nos modelos GEE, considerou-se como variável dependente os resultados obtidos no final do acompanhamento, o tipo de mutação como variável independente e os resultados basais como covariáveis.

As incidências acumuladas de trombose e sangramento foram estimadas empregando-se a abordagem de riscos competitivos, considerando o óbito por qualquer causa como o evento competitivo. As curvas de incidência foram comparadas através do teste de Gray.

As funções de sobrevivência para pacientes subdivididos em tipos de mutações foram estimadas por Kaplan-Meier, e comparadas através do teste de log-rank.

O critério de informação de Akaike (AIC) foi aplicado para comparar a qualidade dos modelos de estratificação. Este critério mede a qualidade e aplicabilidade de um modelo estatístico e permite comparações entre modelos – um menor valor de AIC reflete melhor ajuste entre complexidade e adaptação do modelo.

Considerou-se estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. A análise foi realizada usando-se SAS v 9.4 (SAS Institute, Inc., 2012).

4 RESULTADOS

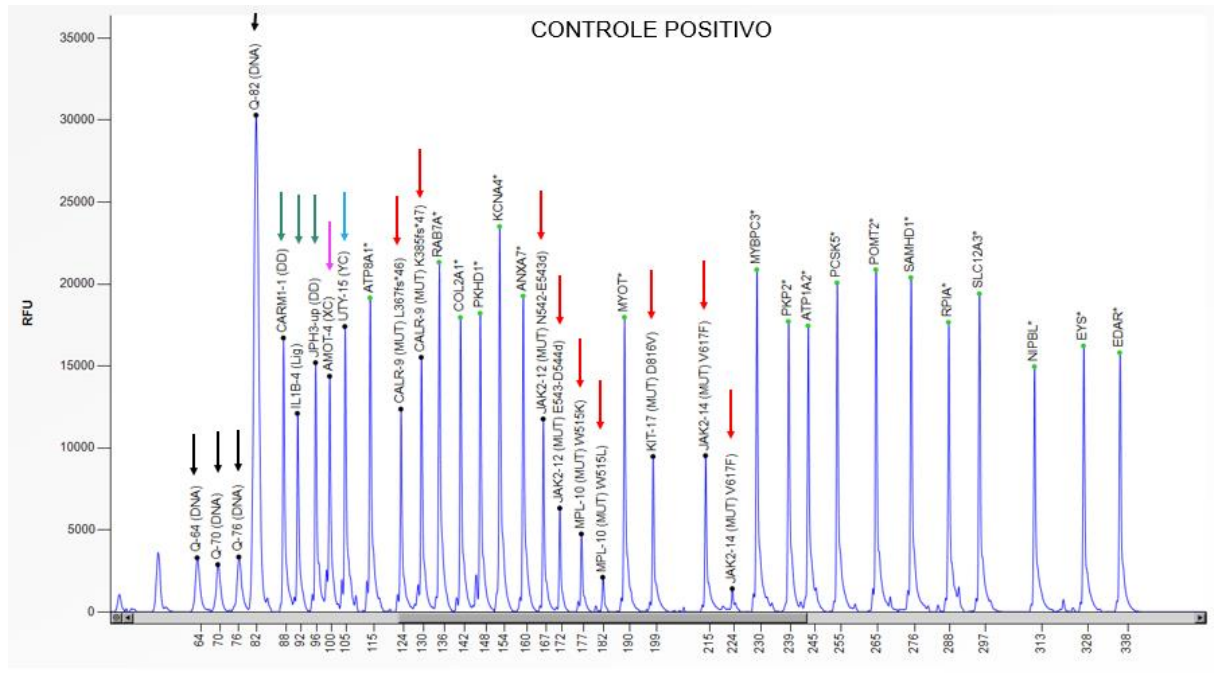
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES JAK2, MPL OU CALR

Diversas fontes de registro foram buscadas para identificação dos portadores de Mielofibrose em acompanhamento na Unidade de Hematologia e Hemoterapia do HBDF. Foram inventariados cadastros de APAC (Autorização de Procedimentos Ambulatoriais de Alta Complexidade), de coleta de amostras do laboratório de Biologia Molecular da UHH, de transfusão de hemocomponentes e registros pessoais dos médicos assistentes.

Após triagem inicial de 44 pacientes, 31 puderam ser incluídos no presente estudo. Os demais sujeitos foram excluídos por não apresentarem diagnóstico preciso, seguimento clínico regular e/ou registros em prontuário eletrônico que permitissem avaliação.

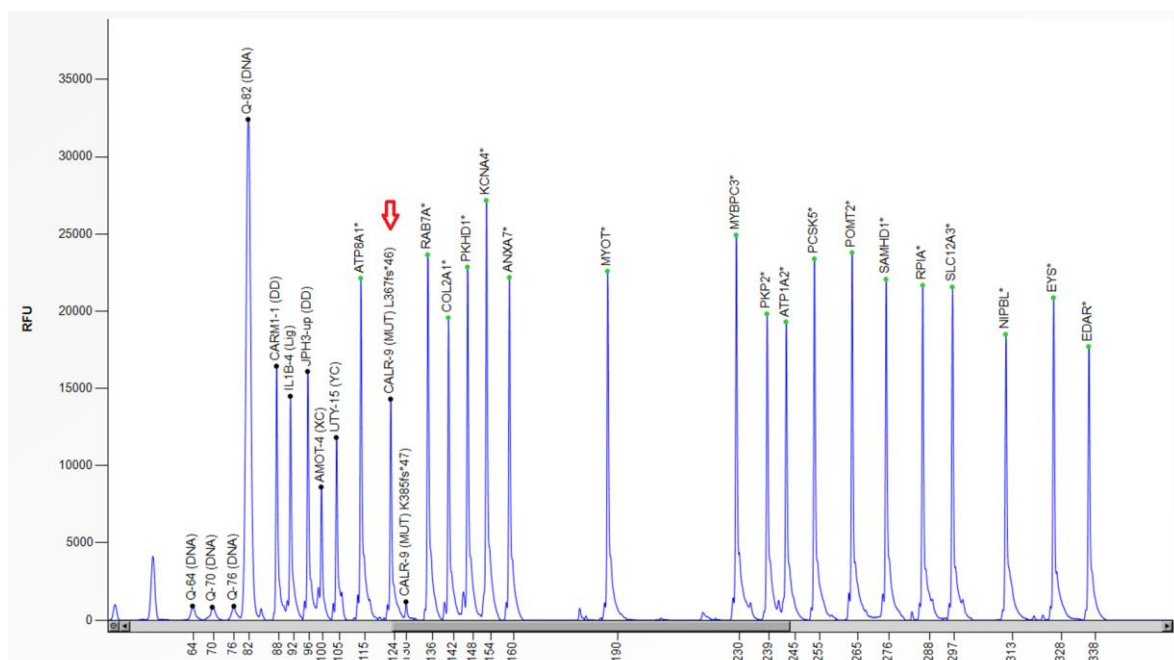
As amostras de sangue periférico foram analisadas por MLPA para pesquisa de mutações driver. Todos os pacientes foram analisados através do kit SALSA MLPA probemix P420-A1 MPN mix 1®, que permite detectar mutações presentes em no mínimo 10% do DNA da amostra. As amostras de indivíduos em que nenhuma mutação foi identificada, ou cujos eletroferogramas foram duvidosos, foram submetidas a análise confirmatória com o kit SALSA MLPA probemix P520-A1 MPN mix 2®, que apresenta maior sensibilidade.

Figura 13 – Eletroferograma de indivíduo masculino, controle positivo da reação de MLPA



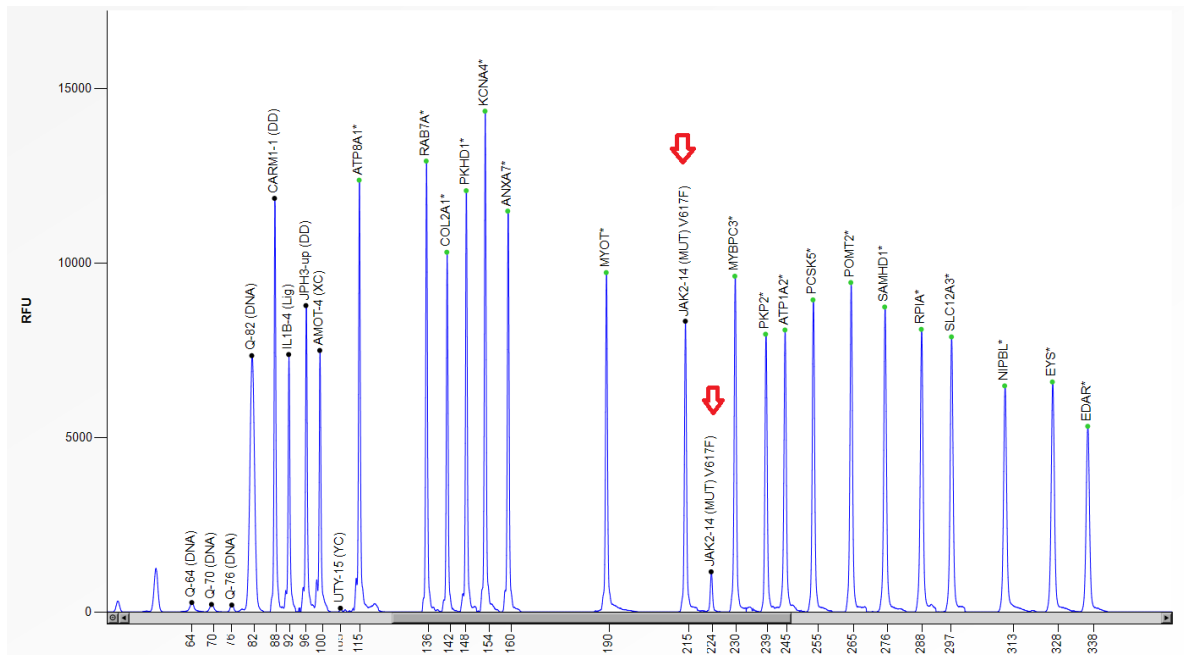
Além das sondas para mutações, o mix de sondas contém fragmentos Q, de controle de quantidade de DNA (setas pretas); fragmentos D, de controle de desnaturação do DNA (setas verdes); fragmento X, específico para o cromossomo X (seta rosa); fragmento Y, específico para o cromossomo Y (seta azul), e sondas de referência posicionadas em regiões conservadas do DNA (esferas verdes) que servem para validação interna da reação e de controle de qualidade. As setas vermelhas indicam os picos referentes às mutações. A altura dos picos referentes aos fragmentos Q e D indicam quantidade suficiente de DNA e desnaturação adequada.

Figura 14 – Eletroferograma de paciente masculino com a mutação CALR tipo 1



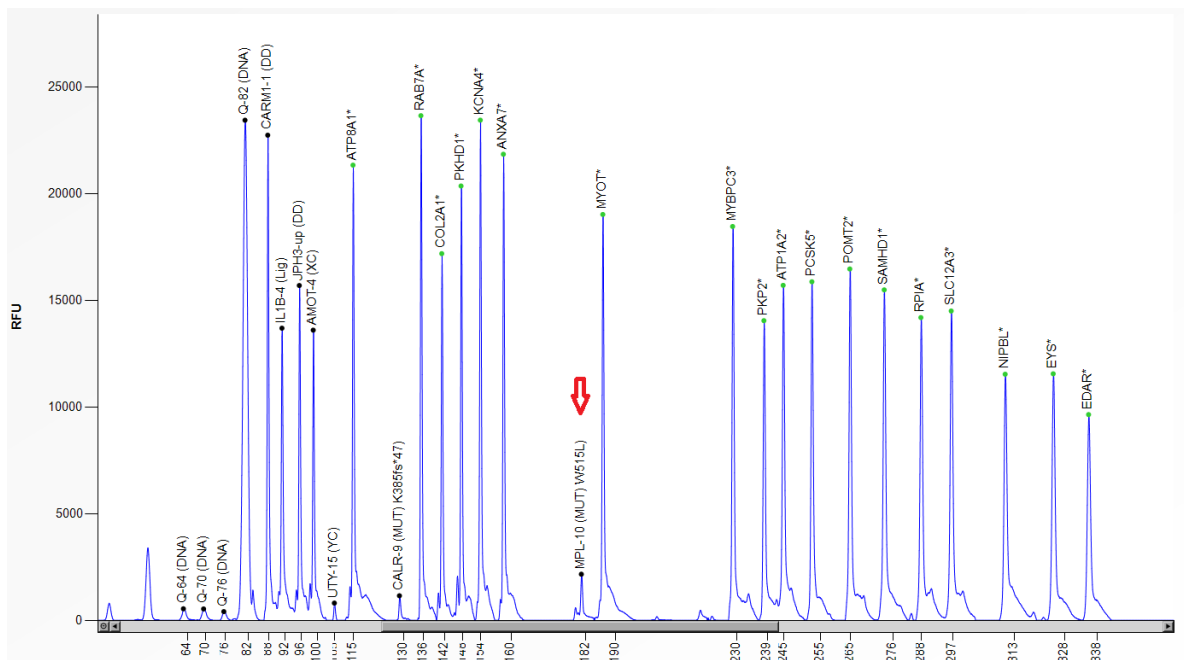
Pico em 124 nt, correspondente à mutação del52 da CALR, indicado pela seta vermelha.

Figura 15 - Eletroferograma de paciente feminino com a mutação JAK2 V617F



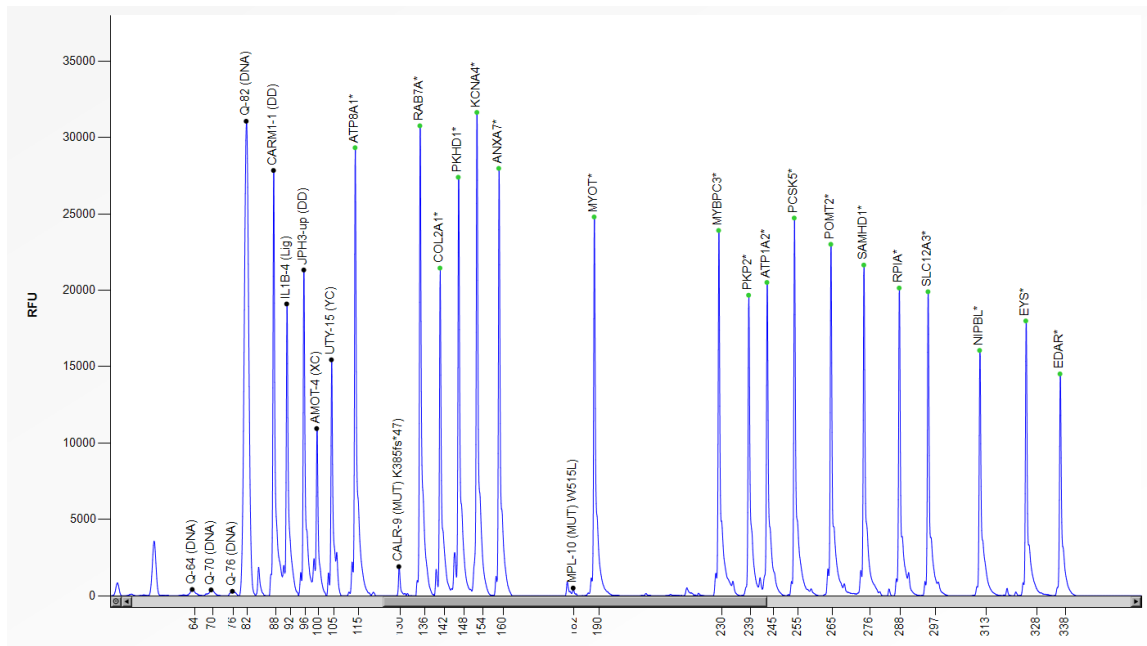
Picos em 215 nt e 224 nt, correspondentes à mutação V617F da JAK2. O pico em 215 nt tem intensidade de sinal 5 vezes maior que o pico em 224nt.

Figura 16 - Eletroferograma de paciente feminino com a mutação MPL W515L



Pico em 182 nt, correspondente à mutação MPL W515L.

Figura 17 - Eletroferograma de paciente masculino, triplo negativo



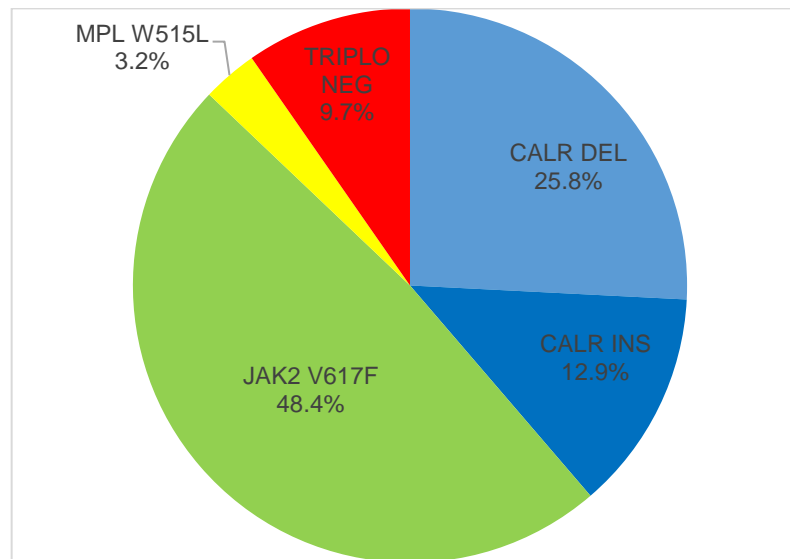
Indivíduo triplo negativo, analisado através dos kits P420-A1 MPN mix 1® e P520-A1 MPN mix 2®.

Dos 31 indivíduos analisados, 48,4% (15) apresentaram a mutação JAK2V617F, 38,7% (12) uma mutação do éxon 9 da CALR, 3,2% (1) a mutação MPL W515L e 9,7% (3) não apresentavam nenhuma mutação, sendo, portanto, triplo negativos.

Dentre os portadores de mutação da CALR, 66,7% apresentaram a mutação del52, ou tipo 1, e 33,3% a mutação insTTGTC, ou tipo 2.

As mutações MPL W515K, do éxon 12 da JAK2 e KIT não foram encontradas em nenhum paciente.

Figura 18 - Distribuição das mutações *driver* entre os pacientes da amostra



4.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A mediana de idade na amostra foi de 62 anos, variando entre 35 e 84 anos. A distribuição de gênero foi bastante similar, com discreto predomínio do sexo masculino – 16 homens (52%), e 15 mulheres (48%).

Os indivíduos com Mielofibrose Primária corresponderam a 87% da amostra, sendo os demais (13%) portadores de Mielofibrose Pós Trombocitemia Essencial. A mediana de seguimento foi de 32 meses, variando de 4 meses a 13,5 anos.

As características demográficas e laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17 - Características demográficas e laboratoriais basais de 31 pacientes com Mielofibrose

CARACTERÍSTICAS	NÚMERO (%) DE PACIENTES
Diagnóstico, N. (%)	
MFP	27 (87)
MF pós TE	4 (13)
MF pós PV	0 (0)
Sexo, N. (%)	
Feminino	15 (48)
Masculino	16 (52)

Idade, mediana (variação)	62 (35-84)
Hemoglobina, mediana (variação) (g/dL)	11,9 (5,9 - 14,4)
Leucócitos, mediana (variação) (x 10⁹/L)	14,2 (2,2 -51,1)
Plaquetas, mediana (variação) (x 10⁹/L)	302 (6,5 - 2838,0)
Esplenomegalia, N. (%)	
Sim	27 (87)
Não	2 (6,5)
Esplenectomia prévia	2 (6,5)
Sítios de hematopoese extra medular, N. (%) *	
Baço	27 (100)
Fígado	14 (52)
Ossos	3 (11)
Outros	4 (15)
Idade > 65 anos, N. (%)	13 (42)
Sintomas constitucionais, N. (%)	16 (52)
Hemoglobina abaixo de 10 g/dL, N. (%)	18 (58)
Leucócitos acima de 25 x 10⁹/L, N. (%)	3 (10)
Plaquetas abaixo de 100 x 10⁹/L, N. (%)	10 (32)
Blastos circulantes ≥ 1%, N. (%)	9 (29)
Desidrogenase láctica elevada, N. (%), N avaliável=29#	25 (86)
PCR e/ou VHS elevados, N. (%), N avaliável=11 &	9 (82)
Necessidade transfusional, N. (%)	13 (42)
Citogenética de medula óssea, por bandas G, N. (%)	
Cariótipo normal	11 (35)
Cariótipo alterado	4 (13)
Indisponível	16 (52)
Mutação JAK2 V617F, por técnica de PCR, N. (%)	
Presente	15 (48)
Ausente	13 (42)
Indisponível	3 (10)
DIPSS inicial, N. (%)	
Baixo	5 (16)
Intermediário 1	15 (48)
Intermediário 2	10 (33)
Alto	1 (3)

*Hematopoese extra medular presente em 27 pacientes

Dado disponível em 29 pacientes

& Dados disponíveis em 11 pacientes

Quinze indivíduos foram submetidos a avaliação citogenética por cariótipo convencional de medula óssea ao diagnóstico, como parte da rotina propedêutica, que evidenciou alterações em 4 (27%) casos. Um dos pacientes apresentava citogenética favorável (del13q isolada), dois apresentavam alterações de mau prognóstico

(cariótipo complexo e trissomia do cromossomo 8), e um deles apresentava cariótipo triploide, geralmente associado a mau prognóstico.(73)

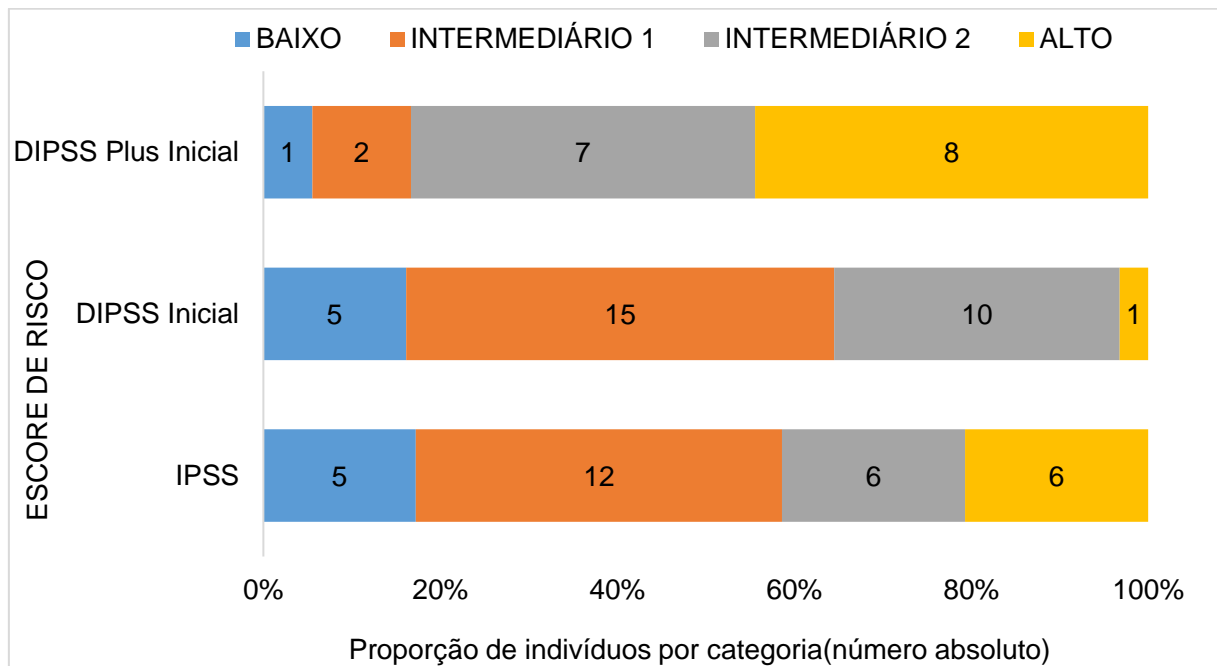
A revisão de prontuários permitiu a estratificação de risco por IPSS, DIPSS ou DIPSS plus em 29, 31 e 18 indivíduos da amostra, respectivamente. A divisão de grupos de risco para cada um dos escores é apresentado a seguir.

Tabela 18 - Estratificação de risco inicial dos 31 indivíduos da amostra, de acordo com IPSS, DIPSS ou DIPSS plus

GRUPO DE RISCO	ESCORE PROGNÓSTICO					
	IPSS		DIPSS		DIPSS Plus	
	N (%)	% relativa*	N (%)	%relativa	N (%)	%relativa
Baixo	5 (16)	17%	5 (16)	16%	1 (2)	6%
Intermediário 1	12 (39)	41%	15 (48)	48%	2 (7)	11%
Intermediário 2	6 (19)	21%	10 (33)	33%	7 (23)	39%
Alto	6 (19)	21%	1 (3)	1%	8 (26)	44%
Não disponível	2 (7)	-	0 (0)	-	13 (42)	-

*% em relação ao total de pacientes avaliáveis

Figura 19 - Estratificação de risco dos pacientes segundo IPSS, DIPSS ou DIPSS plus, ao diagnóstico



O único tratamento potencialmente curativo em Mielofibrose é o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoéticas. Nenhum dos pacientes da amostra foi submetido a TCTH; as modalidades terapêuticas empregadas ao longo do seguimento

basearam-se nas manifestações clínicas individuais, sendo essencialmente direcionadas ao controle de sintomas e estabilização clínico-laboratorial. Os tratamentos variaram entre conduta expectante em indivíduos oligossintomáticos, uso de agentes citorreduzores, imunossupressores, imunomoduladores, fatores de crescimento e androgênios, esplenectomia, radioterapia esplênica e/ou suporte transfusional.

O objetivo primordial do tratamento de suporte é a melhoria da qualidade de vida, mas não é esperado impacto em sobrevida ou evolução para leucemia aguda, portanto esta análise não foi realizada. O uso de inibidor de JAK (Ruxolinitibe) pode associar-se a ganho de sobrevida, mas nenhum dos pacientes acompanhados teve acesso à droga.

Tabela 19 - Tratamentos instituídos e desfechos clínicos

	Número de indivíduos (%)
Tempo de seguimento em meses (variação)	32 (10 - 163)
Eventos trombóticos, N. (%)	6 (19,3)
Fenômenos hemorrágicos maiores, N. (%)	3 (9,6)
Evolução para leucemia aguda, N. (%)	2 (6,4)
Tratamentos instituídos, N. (%)	
Nenhum	5 (16,1)
Hidroxiuréia	22 (70,9)
Prednisona	8 (25,8)
Talidomida	7 (22,5)
Radioterapia esplênica	4 (12,9)
Esplenectomia	2 (6,4)
Androgênios	3 (9,6)
Fatores de crescimento	1 (3,2)
Imunossupressores	2 (6,4)
Inibidor de JAK	0 (0)
Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas	0 (0)
Óbitos, N. (%)	9 (29,0)

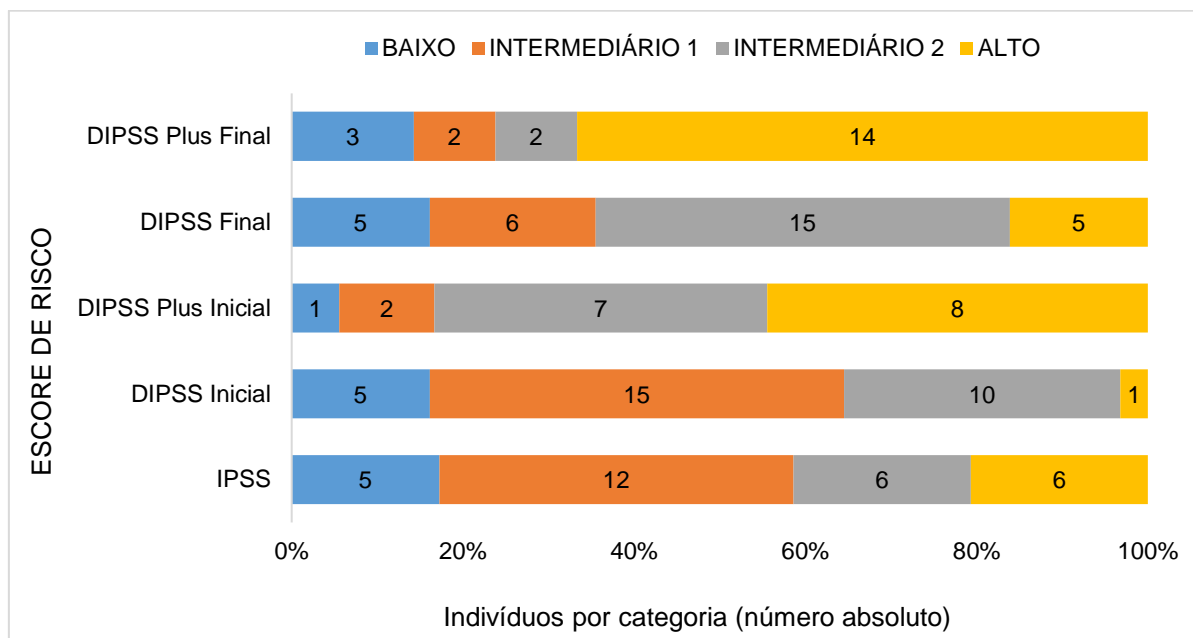
Apesar de nenhum dos pacientes ter realizado avaliação cromossômica convencional durante o seguimento, por meio de projeto de pesquisa 16 pacientes foram analisados por aCGH/SNP array ao longo do acompanhamento, sendo encontradas alterações em 69% deles (n = 11). Foram observadas 43 CN-LOH, 14 deleções, uma trissomia e uma duplicação. Esses dados permitiram o cálculo do DIPSS plus em parte da amostra. A estratificação por DIPSS e DIPSS plus ao final do acompanhamento encontra-se na tabela a seguir.

Tabela 20 - Estratificação de risco final dos 31 indivíduos da amostra, de acordo com DIPSS ou DIPSS plus final

GRUPO DE RISCO	ESCORE PROGNÓSTICO			
	DIPSS		DIPSS Plus	
	N (%)	%relativa*	N (%)	%relativa*
Baixo	5 (16)	16	3 (10)	14
Intermediário 1	6 (19)	19	2 (6,5)	9,5
Intermediário 2	15 (49)	49	2 (6,5)	9,5
Alto	5 (16)	16	14 (45)	67
Não disponível	0	-	10 (32)	-

*% em relação ao total de pacientes avaliáveis

Figura 20 - Distribuição dos pacientes de acordo com IPSS, DIPSS e DIPSS Plus ao diagnóstico e ao final do acompanhamento



4.3 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL

Foram comparados parâmetros de hemograma, idade, gênero, sintomas constitucionais e DIPSS entre as diferentes mutações. A mutação MPL foi detectada em apenas um indivíduo, o que não impossibilitou a realização de análises comparativas.

Os pacientes com mutação da JAK2 são significativamente mais idosos e com maior contagem leucocitária. Por outro lado, os indivíduos triplo-negativos são mais

jovens, em com menor contagem leucocitária ($p = 0,0227$ para a idade e $p = 0,0018$ para a contagem leucocitária).

Observou-se maior contagem plaquetária nos portadores de mutação CALR, e menores valores de hemoglobina e plaquetometria naqueles triplo-negativos, ainda que esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Não houve diferença de estratificação de risco por DIPSS de acordo com o perfil mutacional. Não foi demonstrada associação significativa de presença ou ausência de blastos circulantes e distribuição por gênero com os tipos de mutação.

Tabela 21 - Características demográficas e clínicas subdivididas por tipo de mutações

VARIÁVEIS*	MUTAÇÕES					p-valor#
	Total	MPL£	CALR <i>indel</i>	JAK2 V617F	Triplo Negativo	
N (%)	30	1	12 (40,0)	15 (50,0)	3 (10,0)	-
Sexo						0,6671
Masculino	14 (46,7)		6 (50,0)	6 (40,0)	2 (66,7)	
Feminino	16 (53,3)	1	6 (50,0)	9 (60,0)	1 (33,3)	
Idade	60,7 ± 13,3	62	55,9 ± 12,9	66,9 ± 11,7	49,3 ± 8,5	0,0227
Hemoglobina, (g/dL)	11,0 ± 2,6	12,8	10,9 ± 2,4	11,4 ± 2,9	9,3 ± 1,1	0,3995
Leucócitos (x 10⁹ /L)	16,1 ± 11,7	34	10,2 ± 5,4	22,1 ± 12,6	6,0 ± 2,0	0,0018
Plaquetas (x 10⁹ /L)	535,0 ± 633,9	154	800,7 ± 835,5	453,8 ± 493,1	116,3 ± 153,0	0,0600
Blastos circulantes						0,2216
Ausência	20 (76,9)		9 (90,0)	8 (61,5)	3 (100,0)	
Presença	6 (23,1)	1	1 (10,0)	5 (38,5)	0 (0,0)	
DIPSS						0,1580
Baixo	5 (16,7)		5 (41,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Intermediário 1	14 (46,7)	1	4 (33,3)	8 (53,3)	2 (66,7)	
Intermediário 2	10 (33,3)		3 (25,0)	6 (40,0)	1 (33,3)	
Alto	1 (3,3)		0 (0,0)	1 (6,7)	0 (0,0)	

* Valores expressos em média ± desvio padrão ou frequência (%)

p – valor calculado pelo teste exato de Kruskal-Wallis ou exato de qui-quadrado

£ Dados excluídos da análise comparativa

4.4 OCORRÊNCIA DE ANEMIA, LEUCOCITOSE, PLAQUETOPENIA OU DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL

A associação entre o desenvolvimento de hemoglobina abaixo de 10 g/dL, leucócitos > 25.000 x 10⁶/L, plaquetas < 100.000 x 10⁶/L, sintomas constitucionais, blastos circulantes e necessidade transfusional e os tipos de mutações foi avaliada

pelo teste exato de Fisher. Não houve associação significativa de nenhum tipo de mutação a esses desfechos.

Tabela 22 – Ocorrência de desfechos clínicos de acordo com o perfil mutacional

Variáveis	Mutações			p-valor*
	CALR, n(%)	JAK2, n(%)	TRIPLO NEGATIVO, n(%)	
Hemoglobina				0,3685
< 10 g/dL	6 (50,00)	8 (53,33)	3 (100,00)	
≥ 10 g/dL	6 (50,00)	7 (46,67)	0 (0,00)	
Leucócitos				0,5862
≤ 25 x 10 ⁹ /L	12 (100,00)	13 (86,67)	3 (100,00)	
> 25 x 10 ⁹ /L	0 (100,00)	2 (13,33)	0 (0,00)	
Plaquetas				0,2831
< 100 x 10 ⁹ /L	4 (33,33)	10 (66,67)	2 (66,67)	
≥ 100 x 10 ⁹ /L	8 (66,67)	5 (33,33)	1 (33,33)	
Sintomas Constitucionais				0,2831
Não	8 (66,67)	5 (33,33)	1 (33,33)	
Sim	4 (33,33)	10 (66,67)	2 (66,67)	
Blastos				0,2452
Ausente	10 (83,33)	9 (60,00)	3 (100,00)	
Presente	2 (16,67)	6 (40,00)	0 (0,00)	
Necessidade de Transusão				1,0000
Não	7 (58,33)	8 (53,33)	2 (66,67)	
Sim	5 (41,67)	7 (46,67)	1 (33,33)	

4.5 DISTRIBUIÇÃO DO DIPSS AO FINAL DO ACOMPANHAMENTO, DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL

Os grupos de risco DIPSS (baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco) ao final do acompanhamento foram comparados entre os tipos de mutação, usando-se um modelo de equações generalizadas (GEE), com função logito acumulado.

Não houve diferença de distribuição de grupos de risco pelo DIPSS ao final do acompanhamento entre os diferentes perfis mutacionais (p-valor = 0,9240).

Tabela 23 - Distribuição de DIPSS entre os portadores de mutações CALR

INICIAL	FINAL				Total (%)
	Baixo	Intermediário 1	Intermediário 2	Alto	
Baixo	3	1	1	0	5 (41,67)
Intermediário 1	0	2	2	0	4 (33,33)
Intermediário 2	0	0	3	0	3 (25,00)
Alto	0	0	0	0	0 (0,00)
Total	3 (25,00)	3 (25,00)	6 (50,00)	0 (0,00)	12 (100,00)

Tabela 24 - Distribuição de DIPSS entre os portadores da mutação JAK2

INICIAL	FINAL				Total
	Baixo	Intermediário1	Intermediário2	Alto	
Baixo	0	0	0	0	0 (0,00)
Intermediário1	3	2	3	0	8 (53,33)
Intermediário2	0	0	2	4	6 (40,00)
Alto	0	0	0	1	1 (6,67)
Total	3 (20,00)	2 (13,33)	5 (3,33)	5 (3,33)	15 (100,00)

Tabela 25 - Distribuição de DIPSS entre triplo-negativos

INICIAL	FINAL				Total
	Baixo	Intermediário1	Intermediário2	Alto	
Baixo	0	0	0	0	0 (0,00)
Intermediário1	0	1	1	0	2 (66,67)
Intermediário2	0	0	1	0	1 (33,33)
Alto	0	0	0	0	0 (0,00)
Total	0 (0,00)	1 (33,33)	2 (66,67)	0	3 (100,00)

4.6 ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO POR MODELO PROGNÓSTICO CLÍNICO-MOLECULAR

A partir das informações de perfil mutacional obtido por MLPA foi calculado o escore de risco clínico-molecular para cada um dos indivíduos da amostra, conforme definido por Rumi et al. (61)

De acordo com este modelo, 12,9% (4) pacientes foram caracterizados como de muito baixo risco, 9,7% (3) como de baixo risco, 35,4% (11) como risco de intermediário, 29,1% (9) como de alto risco, e 12,9% (4) como de muito alto risco.

4.7 RISCO CUMULATIVO DE TROMBOSE, FENÔMENOS HEMORRÁGICOS E EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA DE ACORDO COM O PERFIL MUTACIONAL

As incidências acumuladas de trombose e sangramento foram estimadas empregando-se a abordagem de riscos competitivos, considerando o óbito por qualquer causa como o evento competitivo. As curvas de incidência foram comparadas pelo teste de Gray.

Não houve registros de evolução para leucemia aguda em portadores de CALR, MPL ou triplo negativos, portanto não foi possível realizar comparações de risco entre

os grupos. Apenas um paciente era portador da mutação MPL, e portanto foi excluído das análises comparativas.

4.7.1 RISCO CUMULATIVO DE TROMBOSE

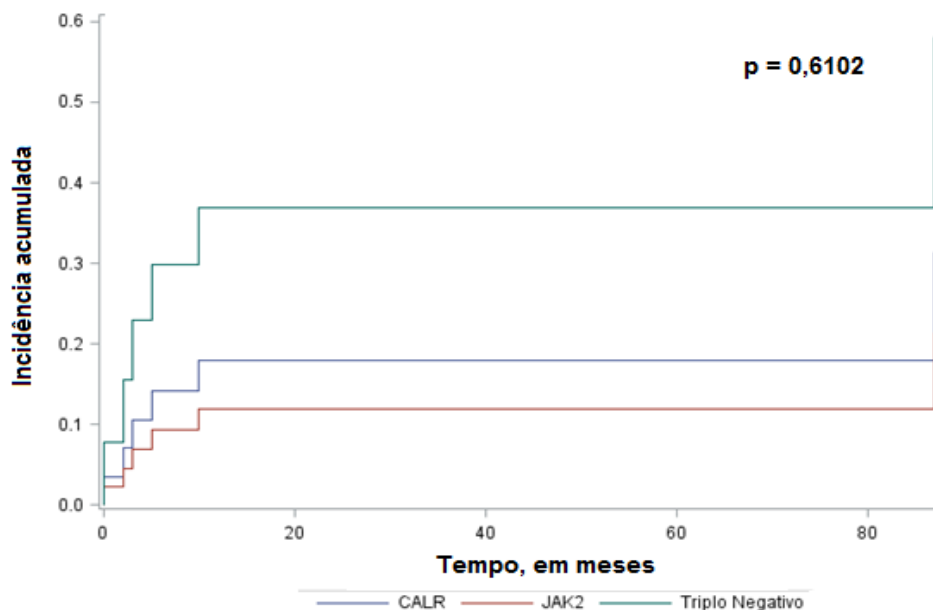
Foram registrados fenômenos tromboembólicos em 19,3% (n = 6) dos pacientes ao longo do seguimento. Três (9,6%) pacientes da amostra já haviam apresentado eventos trombóticos, arteriais ou venosos, antes do diagnóstico de NMPC (mediana de 58 meses antes do diagnóstico). É notável que 75% dos indivíduos com Mielofibrose Pós TE apresentaram eventos trombóticos em algum momento da doença.

Dos seis pacientes com trombose, 2 (33,3%) apresentavam a mutação JAK2, três (50%) uma mutação CALR e um (16,7%) não apresentava nenhuma mutação. Não houve diferença estatística de incidência de trombose entre os diferentes perfis mutacionais (p = 0,6102).

Tabela 26 - Comparações das Razões de Riscos de ocorrência de trombose entre mutações *driver*

COMPARAÇÃO	Razão de Risco	Intervalo de Confiança 95%
CALR vs JAK2	1.567	0.288 – 8.515
Triplo Negativo vs CALR	2.316	0.212 – 25.326
Triplo Negativo vs JAK2	3.630	0.281 – 46.847

Figura 21 - Incidência cumulativa de trombose, de acordo com a mutação *driver*



4.7.2 RISCO CUMULATIVO DE SANGRAMENTOS

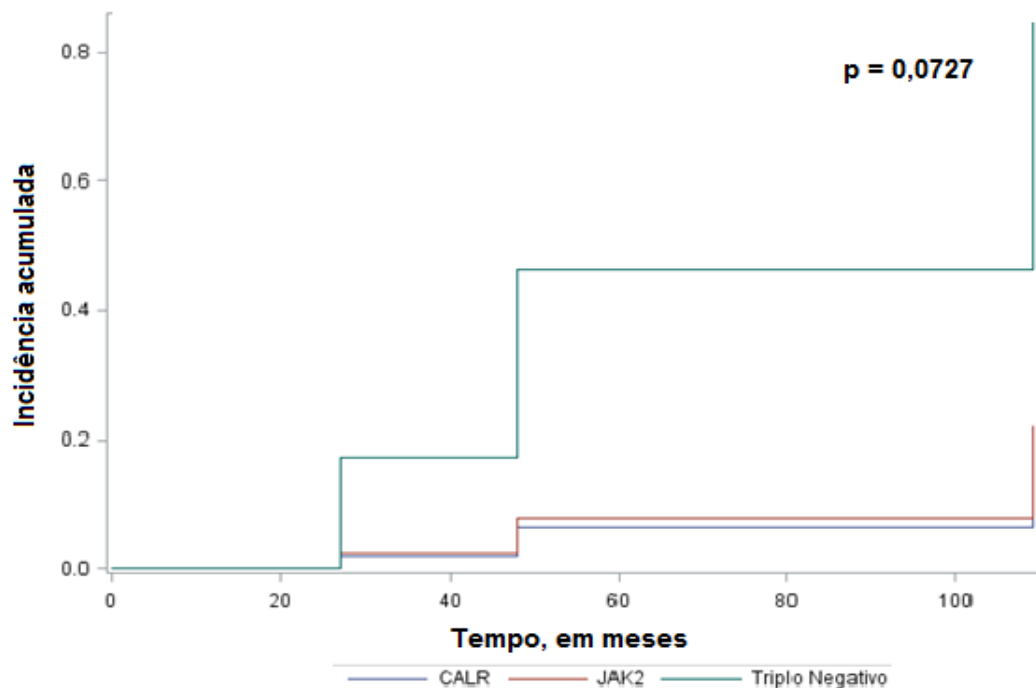
Três indivíduos (9,6%) apresentaram eventos hemorrágicos maiores durante o acompanhamento, após mediana de 48 meses do diagnóstico.

Não houve diferença estatística das curvas de incidência de sangramento entre os tipos de mutações ($p = 0,0727$).

Tabela 27 - Comparações das Razões de Riscos de ocorrência de sangramento entre os tipos de Mutações

COMPARAÇÃO	Razão de Risco	Intervalo de Confiança 95%
JAK2 vs CALR	1.279	0.136 – 12.001
Triplo Negativo vs CALR	9.675	0.335 – 70.138
Triplo Negativo vs JAK2	7.564	0.328 – 174.222

Figura 22 - Incidência cumulativa de sangramentos, de acordo com a mutação *driver*



4.8 ASSOCIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS COM EVOLUÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA

A associação entre os parâmetros clínico-laboratoriais do DIPSS e a demanda transfusional, ao diagnóstico, com a ocorrência de Leucemia Aguda foi avaliada através do teste exato de Fisher.

Não houve diferença significativa desses parâmetros entre os pacientes que evoluíram ou não para Leucemia Aguda.

Tabela 28 - Distribuição das variáveis clínicas segundo a ocorrência de Leucemia

Variáveis	Evolução para Leucemia Aguda		p-valor
	Não, n (%)	Sim, n (%)	
Hemoglobina			0,1793
< 10 g/dl	17 (60,71)	0 (0,00)	
≥ 10 g/dL	11 (39,29)	2 (100,00)	
Leucócitos			0,1310
≤ 25 x 10 ⁹ /L	27 (96,43)	1 (50,00)	
> 25 x 10 ⁹ /L	1 (3,57)	1 (50,00)	
Plaquetas			0,5655
< 100 x 10 ⁹ /L	9 (32,14)	0 (0,00)	
≥ 100 x 10 ⁹ /L	19 (67,86)	2 (100,00)	
Sintomas Constitucionais			1,0000
Não	13 (46,43)	1 (50,00)	
Sim	15 (53,57)	1 (50,00)	
Blastos Circulantes			1,0000
< 1%	21 (75,00)	1 (50,00)	
≥ 1%	7 (25,00)	1 (50,00)	
Necessidade de Transfusão			1,0000
Não	16 (57,14)	1 (50,00)	
Sim	12 (42,86)	1 (50,00)	

4.9 DIFERENÇAS CLÍNICO-LABORATORIAIS ENTRE PORTADORES DE MIELOFIBROSE PRIMÁRIA E MIELOFIBROSE PÓS TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

Os valores médios de hemoglobina, leucócitos e plaquetas ao final do acompanhamento foram comparados entre os tipos de diagnósticos usando-se modelos de análise de covariância (ANCOVA).

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos valores de hemoglobina ($p = 0,3230$), leucócitos ($p = 0,8982$) ou plaquetas ($p = 0,7945$).

Tabela 29 - Comparações das médias de hemoglobina, leucócitos e plaquetas entre MFP e MF pós TE

Variáveis	Diagnóstico – Média [IC 95%]		p-valor
	MFP	MFP pós TE	
Hemoglobina			
Inicial	10,83 [9,63; 12,04]	11,73 [10,31; 13,14]	0,3230
Final (ajustado)	9,44 [8,10; 10,78]	11,12 [7,96; 14,29]	
Leucócitos			
Inicial	16,70 [11,14; 22,27]	12,92 [6,33; 19,51]	0,8982
Final (ajustado)	17,06 [5,50; 28,61]	15,24 [0; 41,85]	
Plaquetas			
Inicial	527,59 [226,87; 828,30]	575,50 [10,47; 1140,53]	0,7945
Final (ajustado)	365,83 [107,20; 624,46]	282,97 [0; 879,34]	

A associação entre a presença de blastos circulantes, necessidade transfusional e sintomas constitucionais e os tipos de diagnósticos foi avaliada através do teste exato de Fisher.

Os indivíduos com MFP apresentam sintomas constitucionais com frequência significativamente maior que aqueles com MF pós TE ($p = 0,0365$). Não houve diferença entre os grupos quanto a blastos circulantes ($p = 1,0000$) ou necessidade de transfusão ($p = 0,1129$).

Tabela 30 - Associação de blastos circulantes, necessidade de transfusão e sintomas constitucionais com MFP ou MFP pós TE, no final do acompanhamento

Variáveis	Diagnóstico – Média [IC 95%]		p-valor*
	MFP, n (%)	MFP pós TE, n (%)	
Blastos Circulantes			1,0000
Ausência	19 (73,08)	3 (75,00)	
Presença	7 (26,92)	1 (25,00)	
Necessidade de Transfusão			0,1129
Não	13 (50,00)	4 (100,00)	
Sim	13 (50,00)	0 (0,00)	
Sintomas Constitucionais			0,0365
Ausência	10 (38,46)	4 (100,00)	
Presença	16 (61,54)	0 (0,00)	

4.10 CORRELAÇÃO ENTRE ESPLENOMEGALIA E PARÂMETROS CLÍNICOS

A presença de esplenomegalia está significativamente associada a menos anemia (p -valor = 0,0261), e a maior frequência de sintomas constitucionais (p -valor = 0,0365). Não houve associação significativa entre esplenomegalia e as demais variáveis clínicas.

Tabela 31 - Distribuição das variáveis clínicas segundo a presença de esplenomegalia

Variáveis	Esplenomegalia		p-valor*
	Não, n (%)	Sim, n (%)	
Hemoglobina			0,0261
< 10 g/dL	4 (100,00)	9 (34,62)	
≥ 10 g/dL	0 (0,00)	17 (65,38)	
Leucócitos			1,0000
≤ 25 x 10 ⁹ /L	4 (100,00)	24 (92,31)	
> 25 x 10 ⁹ /L	0 (0,00)	2 (7,69)	
Plaquetas			0,2874
< 100 x 10 ⁹ /L	0 (0,00)	9 (34,62)	
≥ 100 x 10 ⁹ /L	4 (100,00)	17 (65,38)	
Sintomas Constitucionais			0,0365
Não	4 (100,00)	10 (38,46)	
Sim	0 (0,00)	16 (61,54)	
Blastos Circulantes			0,3144
< 1%	4 (100,00)	18 (69,23)	
≥ 1%	0 (0,00)	8 (30,77)	
Necessidade de Transusão			0,1129
Não	4 (100,00)	13 (50,00)	
Sim	0 (0,00)	13 (50,00)	

4.11 ANÁLISES DE SOBREVIDA

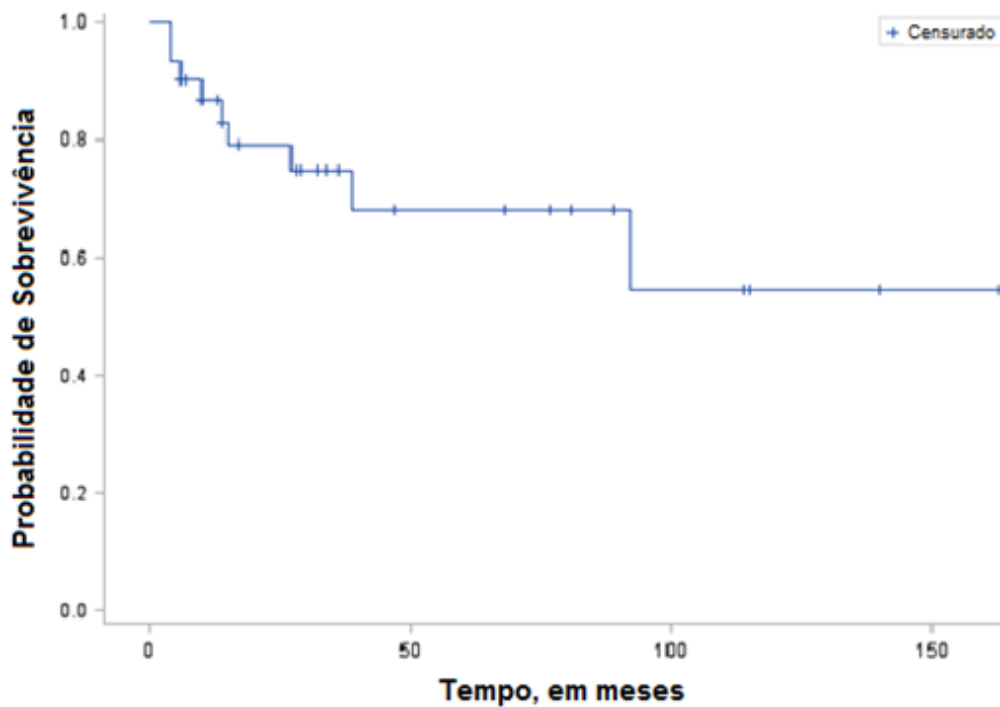
4.11.1 SOBREVIDA GLOBAL

A mediana de seguimento da população do estudo foi de 32 meses, variando de 10 a 163 meses. Óbitos ocorreram em 9 pacientes (29%), incluindo 6 de 15 pacientes com mutação JAK2 V617F (40%) e 3 de 12 pacientes (25%) com uma mutação *indel* do éxon 9 da CALR. Não foram registrados óbitos naqueles indivíduos com mutação MPL ou triplo-negativos.

As causas de morte foram tromboembolismo pulmonar (2 pacientes), complicações de hipertensão portal e cirrose hepática (2 pacientes) e infecções associadas a falência medular (5 indivíduos, dois deles com Leucemia Mielóide Aguda secundária). Dois desses pacientes desenvolveram síndrome nefrótica no decorrer do acompanhamento.

A sobrevida média da população do estudo foi de 68,3 meses. O tempo estimado para ocorrência de óbito em 25% dos indivíduos foi de 27 meses.

Figura 23 – Sobrevida global dos 31 pacientes com Mielofibrose



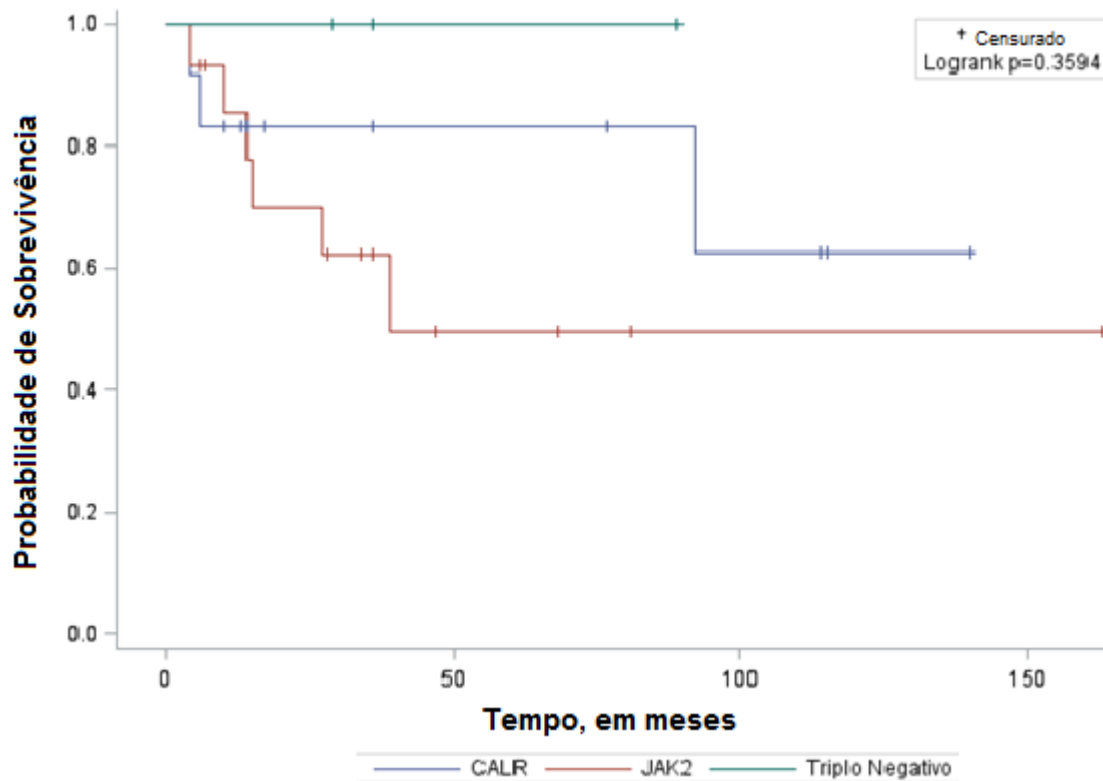
4.11.2 SOBREVIDA GLOBAL DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES *DRIVER*

A média de sobrevida global foi de 77,5 meses para portadores de mutação CALR e de 31,4 meses para portadores de mutação JAK2. Não foi possível estimar a sobrevida global para a mutação MPL ou para triplo-negativos.

O tempo para ocorrência de óbito em 25% dos indivíduos foi estimado em 27 meses para portadores de mutação JAK2, e em 92 meses para aqueles com mutação CALR.

As funções de sobrevivência foram comparadas através do teste de log-rank. As curvas de sobrevidas não diferem entre os tipos de mutações ($p=0,3594$).

Figura 24 - Sobrevida Global, de acordo com a mutação *driver*



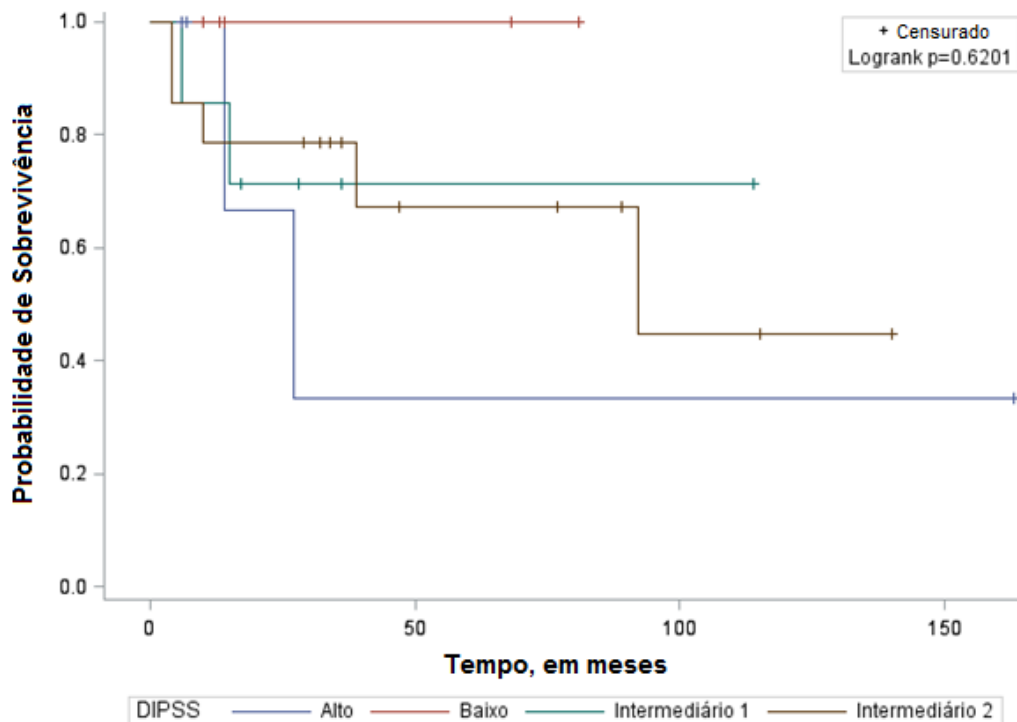
4.11.3 SOBREVIDA GLOBAL DE ACORDO COM O DIPSS INICIAL

A mediana de sobrevida nos pacientes foi de 27 meses para os pacientes de alto risco, 92 meses para os de risco intermediário 2, e não estimada para os de risco intermediário 1 e baixo.

O tempo para ocorrência de óbito em 25% dos indivíduos foi estimado em 14 meses para os indivíduos de alto risco, 39 meses para os de risco intermediário 2, 15 meses para os de risco intermediário 1, e não estimado para os de baixo risco.

Nesta amostra, as curvas de sobrevidas por grupo de risco não diferem entre si, quando comparadas através do teste de log-rank ($p = 0,6201$).

Figura 25 - Sobrevida Global, de acordo com o DIPSS inicial



4.11.4 SOBREVIDA GLOBAL DE ACORDO COM O ESCORE CLÍNICO-MUTACIONAL

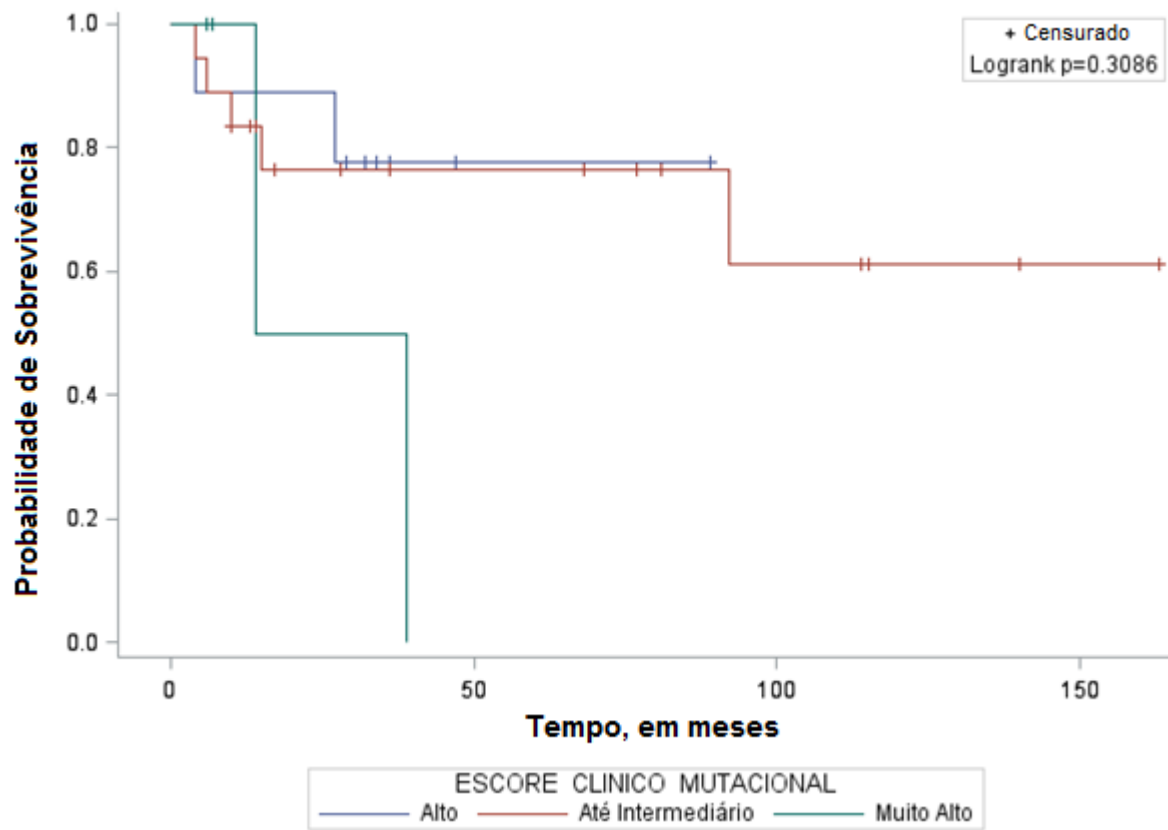
As funções de sobrevivência para pacientes subdivididos por risco clínico-mutacional foram estimadas por Kaplan-Meier e comparadas através do teste de log-rank.

Para possibilitar análises comparativas, os pacientes de risco muito baixo, baixo e intermediário foram agrupados em uma única categoria.

A sobrevida média para os pacientes de muito alto risco foi de 26,5 meses, de 24,4 meses para os de alto risco, e de 72,4 meses para os de risco intermediário ou menor. A mediana de sobrevida no grupo de muito alto risco foi de 26,5 meses.

Não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevida nos diferentes grupos ($p = 0,3086$).

Figura 26 - Sobrevida Global, de acordo com o escore clínico-mutacional



5 DISCUSSÃO

O panorama genético das NMPC Philadelphia-negativas e suas implicações clínicas e potencialidades terapêuticas tem sido alvo de crescente interesse. A nova classificação da OMS para neoplasias mielóides enfatiza a necessidade de demonstração de clonalidade (i.e, da presença de mutações *driver* ou mutações colaborativas) para a confirmação diagnóstica das NMPC.

Este estudo visou a caracterização mutacional de uma população brasileira com Mielofibrose, e a comparação dos atributos desta população com os daquelas descritas em estudos internacionais de estratificação prognóstica, como o IPSS, DIPSS, DIPSS Plus e outros.

As informações clínicas e laboratoriais foram obtidas por meio de revisão de prontuário eletrônico. Ainda que se tratassem de informações bastante simples, e essenciais à avaliação inicial e diagnóstico dos pacientes, os registros em prontuário foram bastante irregulares e estavam incompletos em parte da amostra, comprometendo a utilização de escores de estratificação de risco e a comparação com outras populações. Não foi encontrado registro de hemograma inicial de 10% dos indivíduos; em 7% dos pacientes não foi possível resgatar, ou calcular, o IPSS. Mesmo sem os dados de hemograma, o DIPSS inicial constava em todos os prontuários analisados.

O sistema TrakCare foi implementado na Secretaria de Saúde do Distrito Federal a partir de 2010, mas as informações prévias à implantação, anotadas em prontuário físico, não foram incorporadas ao prontuário eletrônico e não puderam ser acessadas. Assim, o cadastro do histórico dos pacientes com diagnóstico anterior a esta data dependeu de iniciativa pessoal dos médicos assistentes, o que em parte justifica os dados faltantes.

Alguns aspectos devem ser considerados na caracterização de risco pelos escores clássicos (IPSS, DIPSS e DIPSS Plus) da população deste estudo.

Dentre os indivíduos avaliáveis pelo IPSS, 58% eram de risco baixo ou intermediário 1 (17% baixo risco, 41% de risco intermediário 1, 21% de risco intermediário 2 e 21% de alto risco). Todos os pacientes foram estratificados pelo DIPSS ao diagnóstico; 64% deles apresentavam risco baixo ou intermediário 1. Tais resultados assemelham-se aos previamente descritos em uma outra amostra de

pacientes brasileiros (81) e à amostra de validação do IPSS, em que os pacientes de IPSS baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco corresponderam, respectivamente, a 11% / 22%; 44% / 29%; 29% / 28%, e 16% / 21%.

Entretanto, estes dados diferem substancialmente dos apresentados no estudo de validação do DIPSS Plus. Naquela população os indivíduos de risco baixo e intermediário 1 correspondiam a 30% do total pelo IPSS, e a 41% pelo DIPSS. Há que se considerar, porém, que naquele estudo, conduzido por pesquisadores da Mayo Clinic, os pacientes foram considerados a partir do momento do encaminhamento ao serviço e não do diagnóstico, portanto apresentavam maior tempo de evolução de doença. Além disso, por tratar-se de um serviço de alta complexidade, espera-se que casos de maior gravidade sejam referenciados para acompanhamento.

Com relação ao DIPSS Plus, observou-se nesta amostra uma fração de indivíduos de alto risco significativamente superior à outras descritas (44%, contra 24% em um estudo brasileiro e na própria população de estudo do escore). Ainda que contribuam para delineamento prognóstico e planejamento terapêutico, as informações citogenéticas não são primordiais ao diagnóstico das NMP. O cariótipo por bandas G foi realizado em menos de metade (48%) dos pacientes ao diagnóstico, possivelmente por tratar-se de exame não essencial, com oferta inconstante no sistema público de saúde do DF, e pela dificuldade de obtenção de aspirado de medula óssea imposta pela fibrose medular. Assim, o cálculo do DIPSS Plus foi possível apenas nestes indivíduos ou naqueles que já seriam classificados como alto risco pelos demais critérios (isto é, plaquetopenia $< 100 \times 10^9 / L$ e/ou necessidade transfusional), o que provavelmente superestimou a fração de pacientes de alto risco.

A mediana de idade dos pacientes foi de 62 anos, semelhante ao grupo de estudo do IPSS, de 63 anos. Apesar de a Mielofibrose ser mais prevalente em homens, não houve predominância de gênero nesta amostra.

Com relação às mutações *driver*, ressaltam-se algumas particularidades observadas neste estudo.

Espera-se que a mutação JAK2 V617F esteja presente em 60 a 65% dos indivíduos com Mielofibrose, porém esta mutação foi identificada em apenas 48% dos pacientes. Em contrapartida, a frequência observada de mutações indel da CALR, de 38%, foi superior à classicamente descrita, de 25 a 30%. (1) A proporção de mutação do tipo 2 (ins 5-bp) foi também maior que o esperado, 33,6%.

A distribuição de indivíduos com mutação MPL (3,2%) e triplo negativos (9,7%) foi semelhante à previamente descrita (4 – 5 % e 5 – 10% , respectivamente).(7)

Há que se considerar que os pacientes com Mielofibrose Primária e Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial foram avaliados em conjunto; 75% dos pacientes com Mielofibrose pós TE apresentavam CALR mutada. Estudos prévios identificam maior risco de evolução para Mielofibrose em pacientes com TE portadores de mutação da CALR, (7) especialmente a mutação tipo 1, (82) porém a distribuição das mutações *driver* em MF pós TE e MFP aparenta ser semelhante. (83) Além disso, o padrão de distribuição das mutações na nossa população é mantido mesmo que apenas os casos primários sejam considerados: JAK2 mutada em 51,8% dos casos (n = 14, total de 27 pacientes), e CALR mutada em 33,3% (n = 9, total de 27 pacientes).

Com relação aos subtipos de mutação da CALR, a mutação tipo 1 (deleção 52-bp) é observada em até 80% dos casos de MFP, mas tem frequência semelhante à tipo 2 (inserção 5-bp) em pacientes com Trombocitemia Essencial. (1) O agrupamento de pacientes com MF primária e pós TE pode ter contribuído para a maior incidência de mutação CALR tipo 2 observada nesta amostra, embora bastante superior à frequência de 13% descrita por Cabagnols et. al em uma população também mista. (84) A mutação tipo 1 foi observada em 66% dos nossos pacientes com MF pós TE e CALR mutada, mas o pequeno número de indivíduos no estudo não permite estimar o impacto desta mutação na evolução da doença. O impacto dos subtipos de mutação da CALR em desfechos clínicos não foi avaliado.

A maior prevalência de mutações da CALR e a maior proporção de mutações tipo 2 aqui descrita também foi reportada em outras duas populações brasileiras. (85,86) Nossa fração de pacientes CALR-mutados é bastante superior às descritas em populações asiáticas, europeias, norte-americanas (87) e argentina. (88) Polimorfismos genéticos tem variabilidade geográfica e são implicados em predisposição a NMP e a diferenças fenotípicas e de resposta terapêutica entre diferentes etnias. As características genéticas peculiares da população brasileira, essencialmente derivada da miscigenação entre três grupos ancestrais (ameríndios, europeus e africanos), pode em parte explicar a discrepante distribuição mutacional, mas estudos específicos são necessários para validação desta tese.

Cabe ressaltar que as mutações do éxon 9 da CALR envolvidas na MF não se limitam às duas mutações indel pesquisadas neste estudo. Estas correspondem a

85% das mais de 50 descritas, mas é possível que haja indivíduos portando mutações não cobertas pelo painel de MLPA utilizado, notadamente entre os pacientes triplo-negativos.

As mutações MPL W515K, do éxon 12 da JAK2 e KIT não foram encontradas em nenhum paciente.

A ausência de mutação MPL W515K pode ser explicada pelo tamanho da amostra. As mutações MPL são raras, e mesmo em grandes amostras a mutação W515K é bastante incomum. (89)

As mutações envolvendo o éxon 12 desencadeiam eritrocitose, e, portanto, estão associadas a Policitemia Vera. As mutações do KIT são frequentemente associadas à Mastocitose Sistêmica, e não se relacionam a Mielofibrose Primária ou secundária. Os kits fornecidos pela MRC-Holland para a realização do MLPA incluem sondas para estas duas mutações, porém já era esperado que nenhum dos indivíduos estudados as apresentasse.

As características clínico-laboratoriais dos pacientes foram fortemente influenciadas pelo tipo de mutação *driver*.

Os portadores de mutação da CALR são mais jovens e tem menos leucocitose que aqueles com mutação JAK2. Observou-se maior contagem plaquetária, não estatisticamente significativa, entre os indivíduos com CALR mutada. A calreticulina mutada ativa a via JAK-STAT através do receptor de trombopoetina; sua capacidade de ligação aos íons de cálcio no citoplasma dos megacariócitos mutados é comprometida, promovendo maior concentração de cálcio livre e consequente ativação de megacariócitos e plaquetas. A ativação megacariocítica desencadeia trombocitose, e a instalação progressiva de fibrose medular. A deleção de 52bp afeta com maior severidade a função da calreticulina que a inserção de 5bp, desencadeando mais fibrose medular. Assim, nossos achados corroboram observações prévias de que a mutação da CALR gera essencialmente trombocitose.

Os pacientes com mutação da JAK2 são significativamente mais idosos e com maior contagem leucocitária; apresentam também maiores valores de hemoglobina, ainda que esta diferença não tenha se mostrado estatisticamente relevante. O fenótipo observado é semelhante ao descrito por Vanucchi et al, (90) e pode estar relacionado à alta carga alélica mutacional presente na Mielofibrose. A mutação JAK2 V617F ativa a via JAK-STAT através dos receptores EPOR, TPOR e G-CSFR, sendo capaz de gerar, portanto, eritrocitose, trombocitose e neutrofilia. Presume-se, todavia, que o

fenótipo mieloproliferativo resulte da proporção de células com a mutação JAK2: maiores cargas alélicas, como as encontradas na Mielofibrose primária e secundária, relacionam-se a mais eritrocitose e leucocitose.

É razoável supor que o tempo necessário para progressão de heterozigose para homozigose e, portanto, para expressão clínica e diagnóstico da Mielofibrose, tenha contribuído para que estes pacientes fossem diagnosticados em idades mais avançadas.

Este estudo identificou apenas um indivíduo com mutação MPL, o que não permitiu delinear as características clínicas associadas a esta mutação. Os portadores desta mutação em geral apresentam quadro clínico semelhante aos JAK2 mutados.(61)

A menor contagem leucocitária foi observada no grupo de indivíduos triplo-negativos. Além de não apresentarem leucocitose, estes pacientes exibiram mais anemia e plaquetopenia, com fenótipo de falência medular semelhante ao encontrado em Síndromes Mielodisplásicas. A MFP triplo-negativa é uma neoplasia mielóide agressiva, semelhante à síndrome mielodisplásica associada a fibrose, com alto risco de evolução para leucemia aguda, mesmo em pacientes jovens. (61) Nenhum óbito ou evolução para leucemia aguda foi registrado em nossos pacientes, mas isto provavelmente se deve ao pequeno número de indivíduos e menor tempo de seguimento deste grupo

Ressalta-se que este foi o subgrupo de pacientes mais jovens de nossa amostra, cuja média de idade, de 49,3 anos, foi significativamente inferior aos demais. Nossos achados contrapõe-se aos de Rumi et al (61) e Teferi et al (91), que observaram que os indivíduos triplo-negativos tinham idade avançada, e atribuíram o complexo panorama mutacional destes sujeitos à desregulação das CTH e prejuízo dos mecanismos de reparo do DNA associados ao envelhecimento.

Mutações não *driver* são muito mais prevalentes e numerosas nos indivíduos triplo-negativos, notadamente mutações ASXL1 e do spliceossoma, consideradas de alto risco.(91). Em nossos pacientes TN o cariótipo convencional não evidenciou alterações; entretanto, a análise de um dos indivíduos por array CGH identificou regiões de deleção e perda de heterozigose possivelmente envolvidas no surgimento e evolução tumoral. Assim, especialmente neste subgrupo de pacientes, o sequenciamento de genoma ou exoma seria de grande relevância para apuração do perfil mutacional. Sobretudo tratando-se de pacientes jovens e candidatos a TCTH

alogênico, a identificação de genes mutados contribuiria para ratificar a clonalidade da doença e excluir síndromes hereditárias, estimar o prognóstico e validar as intervenções terapêuticas. Além do impacto individual, a identificação de novas mutações *driver* ou de mutações cooperativas também contribuiria para o entendimento das vias moleculares implicadas na patogênese da MF.

Apesar das diferenças clínicas observadas, a estratificação de risco por DIPSS ao diagnóstico não variou entre as mutações. Como era esperado, a proporção de indivíduos nas categorias de risco intermediário 2 e alto aumentou no decorrer do acompanhamento, mas este aumento também não se correlacionou ao perfil mutacional.

Rumi et al observaram menor incidência acumulada de anemia, plaquetopenia e leucocitose em portadores de mutação da CALR, e maior risco de anemia e leucocitose em indivíduos TN. (61) Talvez pelo tamanho da amostra, não demonstramos diferença significativa no surgimento de anemia, leucocitose, plaquetopenia, sintomas constitucionais, blastos circulantes ou necessidade transfusional entre as mutações. Notamos que apenas 33,3% dos indivíduos com mutação da CALR evoluíram com contagem plaquetária $< 100 \times 10^9 / L$, contra 66,6% daqueles com JAK2 mutada ou TN, mas esta observação necessita ser validada em uma população maior.

Registramos prevalência de 29,6% de eventos tromboembólicos, considerando aqueles ocorridos antes, no momento ou após o diagnóstico de MF. A incidência cumulativa, ou seja, a frequência de eventos ocorridos a partir do diagnóstico, foi de 19,3%.

Trombose venosa profunda de membros inferiores foi o evento mais comum (33,3%), seguido de tromboembolismo pulmonar e trombose esplâncnica (22,2% cada), AVC isquêmico e oclusão arterial periférica (11,1% cada). Em conjunto, TEP e hipertensão portal causaram 44,4% dos óbitos testemunhados.

A incidência de trombose que registramos é superior à descrita por Cervantes et al, que observaram 20% de eventos ao longo da doença, (92) e à de Barbui et al, que descreveram incidência cumulativa de 7,2%. (93)

A mieloproliferação clonal determina maior propensão a trombose, portanto as NMP são consideradas trombofilias. A presença de mutação JAK2, especialmente com carga alélica acima de 75% ou associada a leucocitose, confere maior risco de eventos cardiovasculares nas NMP. (60) Além de elevar a contagem plaquetária, a

mutação JAK2 promove alterações funcionais nas plaquetas que contribuem para a trombogênese. Idade acima de 60 anos, hemoglobina acima de 11 g/dL e fase celular da MF (ou seja, MF pré fibrótica) são fatores também associados a trombose. (94)

Diversos trabalhos apontam que a frequência de eventos trombóticos na MFP parece estar subestimada pela alta prevalência de eventos concorrentes (como sangramentos, evolução para leucemia aguda e óbito),(59,60) e sugerem que o risco desses eventos na MFP seja semelhante a TE. (93) Corroborando estas alegações, a fibrose medular é um fator de risco independente para trombose, (59,60) e a mutação JAK2, quando presente na MFP, apresenta-se com alta carga alélica. Desde a revisão de 2016 da Classificação da OMS, estudos de caracterização da MF pré-fibrótica identificaram alto risco trombótico associado a esta condição, que aparenta ser superior a MF fibrótica e até mesmo a Trombocitemia Essencial. (94) Mesmo assim, o risco de trombose é valorizado pelos escores de estratificação utilizados na PV e TE, mas não na MFP.

Este estudo não identificou correlação entre o status mutacional e a ocorrência de eventos trombóticos, possivelmente pelo pequeno número de indivíduos representado. Os pacientes foram diagnosticados conforme os critérios da OMS 2008, que não distinguia as fases de evolução da MF; é possível que o agrupamento de pacientes com MF pré-fibrótica e fibrótica tenha contribuído para a alta frequência de eventos que observamos. Outras possíveis variáveis de risco, como idade avançada e leucocitose, não foram especificamente correlacionadas com a ocorrência de trombose. De qualquer maneira, a grande frequência de eventos registrada endossa a natureza trombofílica da MFP e a necessidade de contemplá-la no planejamento terapêutico dos pacientes, especialmente quando o uso androgênicos e agentes imunomoduladores – intrinsecamente associados a complicações vasculares – é considerado.

Evolução para leucemia aguda foi registrada em 6,4% dos pacientes, sendo responsável por 22,2% dos óbitos nesta população. Não identificamos correlação entre nenhuma variável do DIPSS, demanda transfusional ou perfil mutacional com a evolução para leucemia aguda.

A frequência de progressão para fase blástica é estimada em 7% a 12% (42,61,71), com maior incidência cumulativa em indivíduos triplo-negativos, e a menor em portadores de mutação *CALR*. (61) A maior proporção de indivíduos com *CALR* mutada na amostra pode ter contribuído uma frequência global discretamente inferior,

além da não ocorrência de crise blástica em indivíduos TN (como já exposto, provavelmente pelo menor número e tempo de seguimento desses pacientes).

O estudo de validação do DIPSS Plus identificou apenas plaquetopenia $<100 \times 10^9/L$ e cariótipo desfavorável como preditores independentes de evolução para LMA; de forma semelhante ao que observamos, nenhum parâmetro do DIPSS ou demanda transfusional relacionou-se a este evento. (71) Estudos mais recentes, como os de Rumi(61), Rozovski (42), Vannucchi (72) e Tefferi (73) et al, propõe a combinação de dados citogenéticos, de status mutacional *driver* e de mutações *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* and *IDH* para distinção de grupos sob alto risco de progressão leucêmica e óbito.

Os dois pacientes deste estudo que evoluíram para leucemia apresentavam cariótipo normal, mas possivelmente alterações clonais submicroscópicas não documentadas contribuíram para este desfecho. Logo, a integração de dados clínicos a parâmetros moleculares é fundamental para a identificar pacientes sob alto risco de evolução desfavorável, e permitir intervenções terapêuticas mais precoces.

Algumas características dos indivíduos com MFP e MF pós TE foram comparadas.

Os valores de hemoglobina, leucócitos, plaquetas e blastos circulantes, ao diagnóstico e ao final do acompanhamento, foram semelhantes entre os dois grupos. De forma semelhante, o estudo MySEC, que acompanhou 781 pacientes com Mielofibrose secundária, não observou diferenças em relação a indivíduos com MFP.(83)

Notamos que nenhum dos indivíduos com MF pós TE apresentou necessidade transfusional durante o seguimento, contra 50% daqueles com MF primária, ainda que esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Esta diferença já havia sido descrita por Pemmaraju et al, que demonstraram também menor predisposição a plaquetopenia em portadores de MF pós TE, provavelmente relacionada às particularidades intrínsecas à TE prévia. (95)

A prevalência de sintomas constitucionais foi significativamente maior em pacientes com MFP. Sintomas constitucionais refletem a tempestade de citocinas pró-inflamatórias presente nas NMP, que, ao mesmo tempo que retrata a desregulação do nicho hematopoético desencadeada pelo clone neoplásico, promove evolução clonal e progressão tumoral. Pacientes com TE tem nível sérico elevado de diversas interleucinas e fatores de crescimento ligados a inflamação crônica, mas este aumento

é ainda mais proeminente em indivíduos com MFP – especialmente valores de IL-8, associada ao desenvolvimento de sintomas constitucionais. (52)

Tefferi et al avaliaram cada uma das variáveis clínico-laboratoriais que compõe os escores prognósticos IPSS, DIPSS e DIPSS Plus para estimar a aplicabilidade desses escores em pacientes com Mielofibrose secundária. A presença de sintomas constitucionais foi a única variável sem significância prognóstica no contexto da MF secundária. Apesar da menor prevalência de sintomas constitucionais nessa população, o estudo demonstrou que os escores prognósticos classicamente empregados na MFP são também válidos na MF pós TE. (96)

Esplenomegalia foi observada em 84% dos nossos pacientes, e hepatomegalia em 45% – valores semelhantes aos encontrados na população de estudo do IPSS, de 89% e 50%, respectivamente. Os indivíduos com esplenomegalia apresentam significativamente menos anemia e mais sintomas constitucionais.

Já é sabida a relação entre homozigose para mutação JAK2 e fenótipo mais mieloproliferativo (ou seja, maiores valores de hemoglobina e mais esplenomegalia), (42) e a maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias.(52) Este efeito parece estar mais relacionado à ativação da via JAK-STAT que ao tipo de mutação *driver*, uma vez que a inflamação crônica na MF ocorre de forma irrestrita, e o uso de inibidores de JAK, como o Ruxolitinib, associa-se a redução concomitante da esplenomegalia e dos sintomas constitucionais mesmo em pacientes com JAK2 não mutada. (76) Assim sendo, nossos achados reforçam que a complexa interação entre os fatores de crescimento, os nichos hematopoéticos e as citocinas inflamatórias está implicada na patogênese da Mielofibrose.

Óbitos foram registrados em 29% dos pacientes, frequência semelhante à de Rumi et al, de 28,5%, mas significativamente inferior à observada pelos estudos DIPSS, de 53%, e DIPSS Plus, de 63%. Conforme já ressaltado, neste último estudo predominavam indivíduos de risco intermediário 2 e alto, o que certamente contribuiu para a maior frequência de óbitos descrita. De forma semelhante, o estudo de desenvolvimento e validação do escore MIPSS avaliou dois grupos de pacientes: um italiano, cujas análises foram realizadas considerando o tempo de evolução da doença, e um norte-americano, que considerou o tempo de encaminhamento ao serviço. No primeiro grupo, 54% dos pacientes apresentava IPSS baixo ou intermediário 1, e a taxa de mortalidade observada foi de 33%. Já no segundo grupo,

apenas 31% dos pacientes era de risco baixo ou intermediário 1 pelo DIPSS Plus, e taxa de mortalidade foi de 68%.

Analisados em conjunto, os dados nos permitem concluir que a distribuição de grupos de risco e a taxa de mortalidade observada em nosso serviço não difere da relatada por outros centros.

Apesar disto, a mediana de sobrevida de nossos pacientes de acordo com o DIPSS foi superior à prevista pelo modelo prognóstico. Registramos mediana de sobrevida nos pacientes de risco intermediário 2 e alto risco de respectivamente de 7,6 e 2,3 anos, contra 4,0 e 1,5 anos do estudo original.

Não pudemos estimar a sobrevida mediana de acordo com o perfil mutacional, mas notamos que a sobrevida média e o tempo para óbito dos portadores de mutação da CALR foram expressivamente superiores aos mutados para JAK2. Como já ressaltamos, os pacientes com mutação da CALR foram mais frequentes em nossa amostra que o historicamente observado, o que pode justificar a maior sobrevida registrada em nossa amostra.

Ainda para avaliar o impacto das mutações na sobrevida global, nos propusemos a associar nossos dados clínico-laboratoriais aos obtidos por MLPA seguindo o modelo prognóstico descrito por Rumi et al. (61) Dentre outros modelos já descritos, a opção por esta ferramenta baseou-se na disponibilidade de todos os dados necessários para seu cálculo.

De acordo com este modelo, 42% dos pacientes avaliados era de risco alto ou muito alto, contra 32% do estudo original. A mediana de sobrevida foi atingida apenas no grupo de alto risco, equivalente a 26,5 meses, e as curvas de sobrevida por Kaplan-Meier não diferiram entre os grupos. Entretanto, observamos que a sobrevida média dos indivíduos de risco muito baixo a intermediário foi quase três vezes maior que a dos demais.

Este escore prognóstico ainda não foi validado como ferramenta de uso clínico, mas nossos achados reforçam sua legitimidade e encorajam novos estudos com maior número de pacientes. Ademais, a pesquisa simultânea de mutações *driver* e não *driver*, especialmente do *ASXL1* e *SRSF2*, pode contribuir para refinamento do modelo, como já sugerido nos estudos do GPSS e MIPSS. (72,73)

As diversas categorias de risco que emergiram a partir da integração de dados clínicos e genéticos reforçam o complexo panorama envolvido na iniciação e progressão da Mielofibrose. Entretanto, para efetiva incorporação desses escores na

prática clínica são necessárias ferramentas diagnósticas que permitam avaliação genética precisa e eficaz, a um custo acessível.

O MLPA é um método que permite avaliar, em uma única reação, múltiplas variações de número de cópias e mutações de ponto (mesmo que pequenas, e em DNA fragmentado), simultaneamente em várias amostras. (77) É uma técnica já validada para uso em tumores sólidos e hematológicos, (97–101) capaz de fornecer resultados robustos em curto espaço de tempo (cerca de 24 horas) através de um termociclador convencional, um equipamento de eletroforese capilar e relativamente pouco trabalho manual. Além disso, no *mix* de sondas há fragmentos de controle de quantidade e de desnaturação do DNA e sondas de referência, que permitem controle interno da reação e aumentam a confiabilidade do resultado. Utilizando-se kits de alta sensibilidade, é possível detectar mutações presentes em até 1% das células. (78,80)

Algumas limitações da técnica de MLPA são o uso restrito a mutações já conhecidas, a dificuldade de combinar em um mesmo painel sondas para mutações de ponto localizadas muito próximas, e a necessidade de no mínimo 20 ng de DNA para a reação. Para investigação de novas mutações, ou para inversões e translocações balanceadas, metodologias como o *array* CGH ou o FISH são mais apropriadas. (78)

Não obstante, logramos avaliar de forma robusta o perfil de mutações *driver* utilizando MLPA em pacientes com Mielofibrose. Grande parte dos pacientes incluídos neste estudo havia sido submetido a pesquisa de mutação JAK2V617F por método de PCR durante a investigação diagnóstica; todos os resultados de PCR para JAK2 V617F disponíveis, positivos e negativos, foram concordantes com os de MLPA.

Ressaltamos, porém, que atualmente a realização de PCR para JAK2 na SES-DF ocorre de forma excepcional, por iniciativa pessoal de alguns profissionais da Unidade de Hematologia e Hemoterapia do HBDF. Além disso, a avaliação das demais mutações *driver* não está disponível. Por meio deste projeto, os pacientes selecionados puderam ampliar sua caracterização mutacional, dado especialmente importante naqueles sujeitos JAK2 negativos, que corresponderam a mais de metade da amostra. Espera-se que a informação mutacional obtida auxilie no delineamento prognóstico e planejamento terapêutico desses indivíduos.

Além de consolidar a utilização do MLPA em neoplasias mieloproliferativas crônicas, nossos resultados incitam a ampliação do painel de sondas para abranger também mutações colaborativas, como as do *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*,

SRSF2 e *SF3B1*. Uma vez que as complexas interações mutacionais determinam fenótipos clínicos e prognósticos distintos, a caracterização simultânea do perfil de mutações *driver* e não *driver*, além de otimizar recursos, poderia contribuir para individualização do tratamento e, possivelmente, melhores desfechos clínicos.

6 CONCLUSÃO

A integração dos dados nos permite concluir que:

- O fenótipo de pacientes com Mielofibrose é fortemente influenciado pela mutação *driver*. Portadores de mutação da calreticulina são mais jovens, apresentam menos leucocitose e maior contagem plaquetária; indivíduos com JAK2 mutada são mais idosos, têm mais leucocitose e menos anemia;
- Os indivíduos Triplo Negativos apresentaram-se mais jovens (mediana de idade de 49,3 anos), e com fenótipo clínico que se assemelha mais a SMD que a NMP;
- A população do Hospital de Base do DF apresenta maior prevalência de mutações da CALR que o classicamente descrito, o que parece ser uma característica da população brasileira;
- A distribuição por DIPSS e a taxa de mortalidade global desta população não difere da relatada por outros centros;
- A sobrevida mediana após o diagnóstico é maior que a prevista pelo modelo prognóstico DIPSS;
- Indivíduos com MF secundária apresentam menos sintomas constitucionais e tendem a menor demanda transfusional que aqueles com MFP;
- Os indivíduos com esplenomegalia apresentam menos anemia, mas maior frequência de sintomas constitucionais;
- Eventos tromboembólicos são tão prevalentes em Mielofibrose quanto nas demais NMP, e este risco deve ser considerado no planejamento terapêutico individual;
- A integração de dados clínicos e mutacionais aumenta a acurácia dos modelos de estratificação prognóstica;
- O MLPA é um método eficaz de caracterização genética em Mielofibrose.

Em suma, este estudo revela características peculiares da Mielofibrose na população do Distrito Federal, reforça o valor da demonstração das mutações *driver* e estimula a ampliação da caracterização genética, através de integração com informações citogenéticas e de mutações não *driver*.

A grande frequência observada de mutações da CALR instiga a investigação de maior número de indivíduos, e a realização de estudos populacionais para busca de polimorfismos genéticos potencialmente associados.

Espera-se que a difusão de técnicas como o MLPA amplie o acesso a caracterização genética na prática clínica, o que contribuiria para acurácia diagnóstica e, hipoteticamente, para melhor planejamento terapêutico e melhores desfechos clínicos.

Por fim, almeja-se que este estudo fomente uma base de dados epidemiológicos que colabore com o direcionamento de políticas públicas de atenção à saúde e contingenciamento adequado de recursos e insumos a esta população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–79.
2. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(6):2190–8.
3. Dameshek W. Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood*. 1951;6:372–5.
4. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):50–8.
5. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J. VJW (Eds. . WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J. VJW (Eds. ., editor. 4th Editio. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008; 2008.
6. 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.
7. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):680–92.
8. Andrikovics H, Nahajevszky S, Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Halm G, et al. JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(10):1809–13.
9. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2010;24(1):105–9.
10. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450–4.
11. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2017 Jun;376(22):2168–81.
12. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir E a, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008;112(6):2199–204.
13. Team TU of CHMCR. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016 Oct 6;128(14):1800–13.

14. Srour SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br J Haematol*. 2016 Aug;174(3):382–96.
15. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rourke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2014 Jun;89(6):581–7.
16. Roman E, Smith A, Appleton S, Crouch S, Kelly R, Kinsey S, et al. Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004-15. *Cancer Epidemiol*. Elsevier Ltd; 2016;42:186–98.
17. Conchon M, Tavares RS, Pagnano KB, Datoguia TS, Bendit I, Leão D, et al. Primary Myelofibrosis Brazilian Patient Journey: From Initial Symptoms to Treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(September):S57–8.
18. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016 Dec;91(12):1262–71.
19. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013;121(21):4388–95.
20. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2013 Sep 26;27(9):1861–9.
21. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.
22. Ahmed RZ, Rashid M, Ahmed N, Nadeem M, Shamsi TS. Coexisting JAK2V617F and CALR Exon 9 Mutations in Myeloproliferative Neoplasms - Do They Designate a New Subtype? *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2016 Apr 11;17(3):923–6.
23. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379–90.
24. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601–12.
25. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer*. 2010 Oct 1;1(10):979–93.
26. McNally R, Toms A V, Eck MJ. Crystal Structure of the FERM-SH2 Module of

- Human Jak2. Boggon TJ, editor. PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156218.
27. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders. *Hematology*. 2006 Jan 1;2006(1):233–9.
 28. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar;365(9464):1054–61.
 29. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387–97.
 30. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
 31. Vilaine M, Olcaydu D, Harutyunyan A, Bergeman J, Tiab M, Ramee J-F, et al. Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6468–70.
 32. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1607–16.
 33. Gnanasambandan K, Sayeski PP. A structure-function perspective of Jak2 mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken. *Curr Med Chem*. 2011;18(30):4659–73.
 34. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2007 Oct 25;111(3):1686–9.
 35. Linda M. Scott, Wei Tong, Ross L. Levine, Mike A. Scott, Philip A. Beer, Michael R. Stratton PAF, Wendy N. Erber, Mary Frances McMullin, Claire N. Harrison, Alan J. Warren, D. Gary Gilliland, Harvey F. Lodish and ARG. Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459–68.
 36. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(10):3735–43.
 37. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):1140–51.
 38. Defour J-P, Chachoua I, Pecquet C, Constantinescu SN. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015;2000(October):1–3.

39. Chou F-S, Mulloy JC. The Thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *J Cell Biochem.* 2011 Jun;112(6):1491–8.
40. Chotinantakul K, Leraanansaksiri W. Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Res.* 2012;2012(May):1–16.
41. Varghese LN, Defour J-P, Pecquet C, Constantinescu SN. The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Mar 31;8(MAR):1–13.
42. Rozovski U, Verstovsek S, Manshour T, Dembitz V, Bozinovic K, Newberry K, et al. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2 , CALR , and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2017 Jan;102(1):79–84.
43. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2009;417(3):651–66.
44. Clinton A, McMullin MF. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol.* 2016 Oct;69(10):841–5.
45. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013 Dec 19;369(25):2391–405.
46. Han L, Schubert C, Köhler J, Schemionek M, Isfort S, Brümmendorf TH, et al. Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J Hematol Oncol. Journal of Hematology & Oncology;* 2016;1–14.
47. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood.* 2016;127(10):1325–35.
48. Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood.* 2010 Jan 21;115(3):496–9.
49. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia. Nature Publishing Group;* 2011 Jan 14;25(1):82–8.
50. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia. Nature Publishing Group;* 2014 Jul 5;28(7):1494–500.
51. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Gangat N, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutation types and allele burden in

- myelofibrosis. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2017 Nov 1;(November):1–14.
52. Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun*. Elsevier Ltd; 2017 Jun;6–11.
 53. Zahr AA, Salama ME, Carreau N, Tremblay D, Verstovsek S, Mesa R, et al. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: Pathogenesis, prognosis and targeted strategies. *Haematologica*. 2016;101(6):660–71.
 54. Rosti V, Villani L, Riboni R, Poletto V, Bonetti E, Tozzi L, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. *Blood*. 2013 Jan 10;121(2):360–8.
 55. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Torti L, et al. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2V617F mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2700–7.
 56. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao ZJ, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF- β . *Stem cell Investig*. 2016;3:5.
 57. Nazha A, Khoury JD, Rampal RK, Daver N. Fibrogenesis in Primary Myelofibrosis: Diagnostic, Clinical, and Therapeutic Implications. *Oncologist*. 2015;20(10):1154–60.
 58. Lataillade J-J, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyre M-C, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3026–35.
 59. How J, Zhou A, Oh ST. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: pathophysiology and molecular mechanisms of disease. *Ther Adv Hematol*. 2017;8(3):107–18.
 60. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013;122(13):2176–84.
 61. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062–9.
 62. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: Morphology and clinical practice. *Am J Hematol*. 2016 Jun;91(4):430–3.
 63. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol*. 2007;139(3):351–62.
 64. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, Van Der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128–32.

65. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437–8.
66. Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):1013–8.
67. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*. 1998 Aug;102(3):684–90.
68. Tefferi A, Huang J, Schwager S, Li C-Y, Wu W, Pardanani A, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis. *Cancer*. 2007 May 15;109(10):2083–8.
69. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895–901.
70. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703–8.
71. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):392–7.
72. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, Pascutto C, Pardanani A, Ferretti V, et al. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. *Blood*. 2014 Dec 4;124(21):405 LP-405.
73. Tefferi A, Guglielmelli P, Finke C, Lasho TL, Gangat N, Ketterling R, et al. Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis. *Blood*. 2014 Dec 4;124(21):406 LP-406.
74. Bose P, Verstovsek S. Prognosis of Primary Myelofibrosis in the Genomic Era. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016 Aug;16(August):S105–13.
75. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am J Hematol*. 2016;91(9):918–22.
76. Vannucchi AM, Harrison CN. Emerging treatments for classical

- myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):693–704.
77. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):57e–57.
 78. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Mol Pathol*. 2012 Dec;21(4):189–206.
 79. MRC-Holland. SALSA MLPA probemix P420-A1 MPN mix 1. 2015 p. 1–7.
 80. MRC-Holland. SALSA MLPA probemix P520-A1 MPN mix 2. 2015 p. 1–11.
 81. Souza MC, Rodrigues CA, Silva MRR, Ribeiro J, Tognon R, Castro FA, et al. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. *Med Oncol*. 2013 Jun 9;30(2):555.
 82. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V, Buduo CA Di, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431–8.
 83. Passamonti F, Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, Cazzola M, Maffioli M, et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2017 Apr 25;31(4):970–3.
 84. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249–52.
 85. Nunes DPT, de Lima LT, Chauffaille M de L, Mitne-Neto M, dos Santos MT, Cliquet MG, et al. CALR mutations screening in wild type JAK2V617F and MPLW515K/L Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood Cells, Mol Dis*. Elsevier B.V.; 2015 Oct;55(3):236–40.
 86. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, de Albuquerque DM, Costa FF, Lorand-Metze I, Olalla Saad ST, et al. Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015 May;37(3):211–4.
 87. Kong H, Liu Y, Luo S, Li Q, Wang Q. Frequency of Calreticulin (CALR) Mutation and Its Clinical Prognostic Significance in Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis: A Meta-analysis. *Intern Med*. 2016;55(15):1977–84.
 88. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL, Williams GM, Carbonell MM, Pratti AF. CALR , JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1 - negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2017 Oct 9;5332(October):1–4.
 89. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, et al.

- Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2010 Apr;149(2):250–7.
90. Vannucchi a M, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani a, Tefferi a. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.* 2008;22(May):1299–307.
 91. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2014 Jul 9;28(7):1472–7.
 92. Cervantes F, Alvarez-Larrán a, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo a, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia.* 2006;20(1):55–60.
 93. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood.* 2010;115(4):778.
 94. KC D, Falchi L, Verstovsek S. The underappreciated risk of thrombosis and bleeding in patients with myelofibrosis: a review. *Ann Hematol. Annals of Hematology;* 2017 Oct 14;96(10):1595–604.
 95. Masarova L, Bose P, Daver N, Pemmaraju N, Newberry KJ, Manshour T, et al. Patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera differ from patients with primary myelofibrosis. *Leuk Res. Elsevier Ltd;* 2017 Aug;59:110–6.
 96. Tefferi A, Saeed L, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Gangat N. Application of current prognostic models for primary myelofibrosis in the setting of post-polycythemia vera or post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2017;(August):1–2.
 97. Marcinkowska-Swojak M, Handschuh L, Wojciechowski P, Goralski M, Tomaszewski K, Kazmierczak M, et al. Simultaneous detection of mutations and copy number variation of NPM1 in the acute myeloid leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mutat Res Mol Mech Mutagen. Elsevier B.V.;* 2016;786:14–26.
 98. Zang M, Zou D, Yu Z, Li F, Yi S, Ai X, et al. Detection of recurrent cytogenetic aberrations in multiple myeloma: A comparison between MLPA and iFISH. *Oncotarget.* 2015 Oct 26;6(33).
 99. Buijs A, Krijtenburg PJ, Meijer E, Arjan Buijs, Pieter Jaap Krijtenburg EM. Detection of risk-identifying chromosomal abnormalities and genomic profiling by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2006;91(10):1434–5.

100. Coll-Mulet L, Santidrián AF, Cosialls AM, Iglesias-Serret D, De Frias M, Grau J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2008;142(5):793–801.
101. Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, Wohlgemuth JG, Yeh CH. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res. Elsevier Ltd;* 2011;35(11):1477–83.