

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

MILTON REGO DE PAULA JUNIOR

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO EM PACIENTES
COM MIELOFIBROSE**

Brasília, DF

2018

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

MILTON REGO DE PAULA JUNIOR

**ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO EM PACIENTES
COM MIELOFIBROSE**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília, DF

2018

Tese de autoria de Milton Rego de Paula Junior, intitulada “Análise cromossômica por microarranjo em pacientes com mielofibrose” apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, em 09 de maio de 2018, pela banca examinadora abaixo assinada:

Profª Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo
Universidade de Brasília-UnB
Presidente

Dra. Mariana Hecht
Universidade de Brasília-UnB

Dr. José Carlos Cordoba
Hospital da criança de Brasília José de Alencar-HCB

Dra. Rosangela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília - UCB

Dra. Patricia Natalia Silva Moretti (suplente)
Universidade de Brasília- UnB

AGRADECIMENTOS

À Deus, força que guia o meu caminho e me dá apoio para nunca desanimar;

À professora Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, pelos ensinamentos, acompanhamentos, pelo apoio em todas as horas, paciência, tranquilidade e pela oportunidade oferecida;

Aos meus filhos, Gui, Gu e Gabi, pelo apoio e incentivo;

Aos meus pais, Milton e Enilza e a minha irmã Viviany por toda ajuda necessária e apoio;

Aos médicos hematologistas, Dr. Alexandre Nonino e Dra. Juliana Minuncio, pela seleção dos pacientes, coleta do material de estudo, pela colaboração na elaboração e correção do artigo;

Aos pacientes, pela delicadeza e sensibilidade no compartilhamento deste meu aprendizado;

As professoras doutoras Aline Pic Taylor, Silviene Fabiana de Oliveira, Cintia do Couto Mascarenhas e ao professor Doutor Rinaldo Wellerson Pereira pela ajuda na colaboração, correção e revisão do artigo;

Aos amigos Claudiner e Raphael Bonadio pela ajuda na execução dos exames de microarray durante todo o desenvolvimento da tese;

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Medicina, pela oportunidade da realização do doutorado;

Aos profissionais do laboratório de citogenética do Hospital de Apoio e a Dra. Mara Santos Córdoba pela realização das análises dos cariótipos;

Aos amigos Aluisio e Pollyanna, por todo apoio, incentivo durante todo o período do doutorado.

a Rego de Paula Junior, Milton
 Análise cromossômica por microarranjo em pacientes com
mielofibrose / Milton Rego de Paula Junior; orientador
Juliana Forte Mazzeu de Araújo. -- Brasília, 2018.
 115 p.

 Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2018.

 1. Mielofibrose. 2. microarranjo cromossômico. 3. perda
de heterozigose. 4. rearranjos cromossômicos. I. Forte
Mazzeu de Araújo, Juliana, orient. II. Título.

RESUMO

A Mielofibrose (MF), conhecida também como Metaplasia Mielóide Agnogênica ou Mielofibrose Crônica Idiopática, é a menos frequente das neoplasias mieloproliferativas, sendo uma doença clonal ocasionada pela transformação neoplásica de célula hematopoiética pluripotente acompanhada de alterações reacionais intensas do estroma medular com fibrose colagênica, osteoesclrose e angiogênese. A MF é caracterizada por citopenias e/ou leucocitose, leucoeritroblastose, fibrose progressiva da medula óssea e hematopoiese extramedular com esplenomegalia. A patogênese molecular ainda é desconhecida e envolve várias alterações citogenéticas. O principal objetivo deste estudo foi investigar a presença de rearranjos cromossômicos em pacientes com MF. A análise cromossômica por microarranjos (CMA) permitiu ampliar o alcance e a sensibilidade na detecção de deleções e duplicações submicroscópicas para a compreensão de seus papéis que podem influenciar o diagnóstico, prognóstico e evolução da MF e tem revelado alterações associadas à MF. Foram selecionados 16 pacientes, sendo 13 com mielofibrose primária e 3 pacientes com MF pós TE (MF pós trombocitemia Essencial). Em todos eles foi realizada uma investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio da CMA utilizando a plataforma *Affymetrix CytoScan™750k* (*Affymetrix*, EUA) e *CytoScan* HD. A citogenética convencional revelou anormalidades cromossômicas em 3 dos 16 casos (18,75%), enquanto que a análise de microarranjos cromossômicos detectou variações no número de cópias (CNV) ou segmentos de perda de heterozigose (LOH) em 10 de 16 (62,5%) pacientes. Estes incluíram 48 LOHs, 14 deleções, uma trissomia e uma duplicação. Dez pacientes apresentaram anormalidades cromossômicas múltiplas, variando de duas a treze CNVs ou LOHs. As alterações incluíam um total de 6196 genes, sendo 69 já associados com cânceres e 17 descritos em neoplasias hematológicas. Considerando que a maioria das CNV identificadas foram menores do que a resolução do cariótipo e a alta frequência de LOHs em nosso estudo, propomos que as plataformas de microarranjo cromossômico que combinem oligos e polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) devem ser investigadas como um teste genético de primeira linha para auxiliar o diagnóstico em pacientes com mielofibrose.

Palavras chaves: Mielofibrose, microarranjo cromossômico, perda de heterozigose, rearranjos cromossômicos.

ABSTRACT

Myelofibrosis (PM), also known as Agnogenic Myeloid Metaplasia or Idiopathic Chronic Myelofibrosis, is the least frequent of myeloproliferative neoplasms. It is characterized by a clonal disease caused by the neoplastic transformation of pluripotent hematopoietic cells accompanied by intense reactional alterations of the medullary stroma with collagen fibrosis, osteosclerosis and angiogenesis. It is characterized by cytopenias and / or leukocytosis, leukoeritroblastosis, progressive fibrosis of the bone marrow and extramedullary hematopoiesis with splenomegaly. Molecular pathogenesis is still unknown and involves several cytogenetic changes. The main goal of this study was to investigate the presence of chromosomal rearrangements in patients with MF Chromosome Microarray Analysis (CMA) has allowed increasing the sensitivity in the detection of submicroscopic deletions and duplications and the understanding of their roles in the pathogenic processes and has revealed alterations associated with MF. Sixteen patients were selected, 13 of whom had primary myelofibrosis and 3 patients with myelofibrosis pos- ET. In all of them, an investigation of submicroscopic chromosomal alterations was performed using the *Affymetrix CytoScan*™ 750k (*Affymetrix*, USA) and *CytoScan* HD platform. Conventional cytogenetics revealed chromosomal abnormalities in 3 of the 16 cases (18.7%), whereas the analysis of chromosomal microarrays detected variations in number of copies (CNV) or loss of heterozygosity change (LOH) in 10 of 16 (66,5%) patients. These included 48 LOHs, 14 deletions, one trisomy and one duplication. Ten patients had multiple chromosomal abnormalities, ranging from two to thirteen CNVs or LOHs. The alterations encompassed a total of 6196 genes, 69 associated to cancers and 17 described in hematological malignancies. Considering that most of the CNVs identified were smaller than the resolution of the karyotype and the high frequency of LOHs in our study, we propose that chromosomal microarray platforms that combine oligos and single nucleotide polymorphism (SNP) should be used as a genetic test of the first line to aid the diagnosis in patients with myelofibrosis.

Keywords: myelofibrosis, Chromosome microarray, copy-neutral loss of heterozygosity, chromosome rearrangements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patogênese da trombose na PV e TE, mostrando o envolvimento dos eritrócitos, neutrófilos e plaquetas na ativação e formação da fibrina.....	21
Figura 2 - Patogênese da fibrose, demonstrando o envolvimento dos megacariócitos e neutrofilos liberando fatores de crescimento que induzem a osteoesclerose e fibrose.....	22
Figura 3 - Presença das mutações driver nas neoplasias mieloproliferativas clássicas.	25
Figura 4 - Nível de organização e visualização da reação de hibridação com os oligonucleotídeos em microarranjos no GeneChip® da plataforma CytoScan® 750K Array (Affymetrix, EUA).....	38
Figura 5 - Protocolo da plataforma Affymetrix® CytoScan™ 750k Array, com o tempo aproximado para a realização de cada etapa.....	40
Figura 6 - Esquema geral das etapas e dos equipamentos utilizados para a reação de CMA envolvendo as etapas da hibridação, lavagem, marcação, escaneamento, leitura e análise dos dados do GeneChip® da plataforma CytoScan® 750K Array (Affymetrix, EUA).....	46
Figura 7 - Vista geral do software ChAS v.3.0 (Affymetrix, EUA) pós processamento dos dados da CMA, evidenciando na parte superior da tela o carioview com os cromossomos humanos enumerados, na parte inferior as sondas hibridadas no chip. À direita está o detalhamento do cromossomo selecionado para análise, com os dados citogenômicos da alteração encontrada no DNA do paciente evidenciados na parte inferior. As CNVs que envolvem ganho numérico são marcadas por barras de cor azul e as que envolvem perda numérica de segmentos cromossomais estão registradas em barras de cor vermelha. Por se tratar de um SNP-array é possível detectar segmentos cromossômicos com perda de heterozigose (LOH) registradas com barras de cor violeta.....	49
Figura 8 - - Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pelo CMA nos cromossomos 1,4 12,17 e X do paciente 1.. ..	58
Figura 9 - Visualização pelo chAs da perda de heterozigose (barra roxa) detectada pelo CMA no cromossomo 1 do paciente 2.....	60

Figura 10 - Visualização pelo chAs do mosaicismo detectada pela CMA no cromossomo 11 do paciente 2..	61
Figura 11 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 13 do paciente 2..	61
Figura 12 - Visualização pelo chAs da microduplicação (barra azul) detectada pela CMA no cromossomo 14 do paciente 2..	62
Figura 13 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra escuro) detectada pela CMA no cromossomo 19 do paciente 2..	63
Figura 14 - Visualização pelo chAS da microduplicação (barra azul escuro) detectada pela CMA no cromossomo 8 do paciente 3.	64
Figura 15 - Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectada pela CMA no cromossomo 3 do paciente 4.....	65
Figura 16 - <i>Visualização pelo chAS das microdeleções (barra vermelha) detectadas pela CMA nos cromossomos 7, 12 e 20 do paciente 4.</i>	66
Figura 17 - <i>Visualização pelo chAS da análise por CMA do cromossomo 7 da paciente 4. Os retângulos vermelhos representam os segmentos deletados. O círculo vermelho indica o segmento de perda de heterozigose em mosaico.</i>	67
Figura 18 - Visualização pelo chAs da perda de heterozigose (barra roxa) detectada pela CMA no cromossomo 11 do paciente 5.	68
Figura 19 - Visualização pelo chAS do mosaicismo detectada pela CMA no cromossomo 11 do paciente 6.	69
Figura 20 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 1 do paciente 7.....	70
Figura 21 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 14 do paciente 7.....	70
Figura 22 - Visualização pelo chAs das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 1, 9, 11 e X do paciente 9.....	72
Figura 23 - Visualização pelo chAs da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 13 do paciente 9.....	72

Figura 24 - Visualização pelo chAs das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas nos cromossomos 4,5,9,12,19 e 22 do paciente 12.....	75
Figura 25 - Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 2, 6, 7, 11 e 13 do paciente 14.....	77
Figura 26 - Visualizações pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 15, 16 e X do paciente 15.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico de Mielofibrose Primária, divididos em critérios maiores e menores, OMS 2008.....	35
Tabela 2 - Critérios de diagnóstico de MF pós TE, OMS 2008.....	36
Tabela 3 - Alterações genômicas identificadas por cariótipo e CMA em pacientes com mielofibrose primária e MF pós TE.....	53
Tabela 4 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 1.....	57
Tabela 5 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 2.....	59
Tabela 6 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 3.....	63
Tabela 7 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 4.....	64
Tabela 8 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 5.....	67
Tabela 9 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 6.....	68
Tabela 10 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 7.....	69
Tabela 11 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 9.....	71
Tabela 12 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 12.....	74
Tabela 13 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 14.....	76
Tabela 14 - Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 15.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASXL1	Gene Additional Sex Combs Like 1
BCR-ABL1	Gene híbrido correspondente ao cromossomo Philadelphia
CALR	Gene da calreticulina
CEBPA	CAAT/enhancer-binding protein-alpha
CTH	Célula Tronco Hematopoética
CMA	Análise por microarranjos
CNV	Variação no número de cópias
CXCR4	Quimiocina de receptor 4
CUX-1	Cut like homeobox 1
DIPSS	Sistema de escore prognóstico internacional dinâmico
DIPSS Plus	Sistema de escore prognóstico internacional dinâmico Plus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT3A	DNA (citocina 5) metiltransferase 3 alfas
EDTA	ácido etilenodiamino tetra- acético
EPO	Eritropoetina
EZH2	Gene que codifica um membro da família polycomb responsável pela manutenção do estado repressivo de transdução de gene
FGF-2	Fator Básico de crescimento de fibroblastos
GCSF	Fator estimulador do crescimento de colônia de granulócitos
IDH	Isocitrate dehydrogenase 1
IKZF1	Ikaros family zinc finger 1
IL 1	Interleucina 1
Il 1-a	Interleucina 1 alfa
IL-8	Interleucina 8
IL-2R	receptor da interleucina 2
IPSS	Sistema de escore prognóstico internacional
IWG-MRT	Grupo de trabalho internacional para pesquisa e tratamento das neoplasias mieloproliferativas
JAK	Janus Kinase
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica

LOH	Perda de heterozigose
MF	Mielofibrose
MF pós TE	Mielofibrose pós Trombocitemia Essencial
MFP	Mielofibrose primária
MPL	Gene do receptor de trombopoetina
NMP	Neoplasia Mieloproliferativa Crônica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PV	Policitemia Vera
SMD	Síndrome Mielodisplásica
STAT	Tradutores de sinal e ativadores da transcrição
TE	Trombocitemia Essencial
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TGF beta	fator de transformação de crescimento beta
TPO	Trombopoetina
TSP 1 e 2	Fator estimulador de megacariócitos, trombopostina
UPD	Dissomia Uniparental adquirida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 LOH em neoplasias hematológicas.....	16
1.2 Neoplasias Mieloproliferativas clássicas	17
1.2.1 Fisiopatologia da Mielofibrose primária	19
1.2.2 Trombose	19
1.2.3 Fibrose Medular	20
1.2.4 Evolução para as leucemias.....	22
1.3 Alterações citogenéticas e mutações nas NMP clássicas	23
1.3.1 Mutações driver	24
1.3.1.1 JAK2.....	25
1.3.1.2 MPL.....	26
1.3.1.3 CARL.....	27
1.3.2 Mutações não driver	28
1.4 Escores para prognósticos na Mielofibrose.....	29
1.5 Emprego da CMA em pacientes com mielofibrose	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 População estudada.....	34
3.2 Coleta das amostras	34
3.3 Extração e quantificação do DNA genômico	36
3.4 Busca de alterações cromossômicas submicroscópicas através da Análise cromossômica por microarranjos (CMA).....	37
3.4.1 Preparação do DNA genômico.....	40
3.4.2 Digestão com Nspl, ligação de adaptadores e amplificação	41
3.4.3 Mistura dos produtos dos PCRs, purificação e quantificação	42
3.4.4 Fragmentação dos produtos dos PCRs	42

3.4.5	Marcação do DNA fragmentado com biotina.....	43
3.4.6	Hibridização.....	43
3.4.7	Lavagens do GeneChip® e marcação com fluoróforos.....	43
3.4.8	Escaneamento dos GeneChip®, captação de imagens e análise no software Chromosome Analysis Suíte 1.2.2 (Afflymetrix®).....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1.	Paciente 1.....	55
4.2	Paciente 2.....	60
4.3	Paciente 3.....	64
<u>4.4</u>	Paciente 4.....	65
<u>4.5</u>	Paciente 5.....	68
<u>4.6</u>	Paciente 6.....	69
<u>4.7</u>	Paciente 7.....	70
<u>4.8</u>	Paciente 8.....	71
<u>4.9</u>	Paciente 9.....	72
<u>4.10</u>	Paciente 10.....	74
<u>4.11</u>	Paciente 11.....	76
<u>4.12</u>	Paciente 12.....	77
<u>4.13</u>	Paciente 13.....	78
<u>4.14</u>	Paciente 14.....	79
<u>4.15</u>	Paciente 15.....	81
<u>4.16</u>	Paciente 16.....	84
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
6	CONCLUSÃO.....	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8	ANEXOS.....	108
8.1	Parecer consubstanciado do CEP.....	103
8.2	Artigo.....	108

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do cromossomo *Philadelphia* na leucemia mieloide crônica (LMC) por Peter Nowell e David Hungerford em 1960, centenas de alterações genéticas têm sido identificadas e descritas em cânceres humanos, não somente em malignidades hematológicas, mas em uma grande variedade de cânceres sólidos (Sato-Otsubo e cols, 2012).

Os cânceres humanos mostram uma diversidade de alterações genéticas variando, de lesões na escala cromossômica, como translocações, duplicações, perdas de grandes segmentos cromossômicos, a substituição de pequenos nucleotídeos, inserções e deleções (Nannya e cols, 2005; Sato-Otsubo e cols, 2012)

Tem sido estabelecido que alterações genéticas são o centro do desenvolvimento de cânceres, determinando comportamentos clínicos e biológicos. Algumas alterações genéticas, como translocações recorrentes, são altamente específicas para determinados tipos de doenças ou ligadas a tumores histológicos, enquanto outras são comumente observadas em um amplo espectro de tipos de cânceres, indicando papéis mais gerais dessas alterações genéticas na carcinogênese (Nannya e cols, 2005; Sato-Otsubo e cols, 2012). Essas alterações têm sido melhor exemplificadas nos cânceres hematológicos em que as mudanças genéticas subjacentes foram estudadas de forma mais abrangente (Grinwade e cols, 1998; Santos e cols, 2011).

A identificação dessas alterações genéticas não só contribuiu para revelar a patogênese molecular subjacente dos cânceres, mas também possibilitou o desenvolvimento de novos diagnósticos, terapêuticas e monitorização sensível do tumor que visam essas alterações específicas (Sato-Otsubo e cols, 2012).

Nos pacientes que apresentam suspeitas de alterações genéticas o exame inicial para a investigação de análises das anormalidades cromossômicas encontradas é o cariótipo com bandeamento G, uma técnica de citogenética convencional (Hussein e cols, 2009; Pratte-Santos e cols,2016).

A análise da citogenética convencional tem sido útil para obter informações sobre o prognóstico e/ou diagnóstico de muitas malignidades hematológicas, incluindo a leucemia mielóide aguda (LMA), síndrome mielodisplásicas (SMD) e nas neoplasias mieloproliferativas (NMP) (Tefferi e cols, 2009; Stegelmann e cols, 2010; Hahn e cols, 2014). Essas NMP são doenças de uma ativação clonal da célula tronco hematopoiética que apresentam como características uma proliferação aumentada das células da linhagem mielóide por uma mutação somática (Visani e cols, 2011; Vainchenker e Kralovics, 2017).

A citogenética convencional apresenta limitações técnicas, pois não consegue detectar deleções ou duplicações genômicas com dimensões menores do que 4-10 megabases (Mb), dependendo da região cromossômica (Siggberg e cols, 2010; Visani e cols, 2011; Brecqueville e cols, 2014).

Para a detecção de alterações cromossômicas menores que 4-10 Mb é demandada a utilização de técnicas com maior poder de resolução (Visani e cols, 2011; Sato-Otsubo e cols, 2012). O desenvolvimento de novas técnicas de investigação cromossômica, tais como a análise por microarranjos (CMA), tem permitido o reconhecimento de alterações no número de cópias do genoma. Com isto, tornou-se possível detectar microdeleções ou microduplicações de até 40 Kb, uma resolução no mínimo 100 vezes superior a do cariótipo convencional (Hastings e cols., 2009; Wain e cols, 2009; Song e Shao, 2016). É reconhecido que rearranjos cromossômicos submicroscópicos estão envolvidas no desenvolvimento do câncer e podem surgir durante a progressão do tumor, influenciando o fenótipo e o prognóstico (Visani e cols, 2011; Sato-Otsubo e cols, 2012).

Com o advento destes exames que analisam o genoma completo foi possível reconhecer que parte da diversidade do genoma se deve à presença de variantes de números de cópias (CNVs) nas regiões genômicas. As CNVs são regiões ampliadas ou deletadas que variam em tamanho de intermediário (1-50 Kb) para grandes (50Kb-3 Mb) e são reconhecidas como uma importante fonte de variabilidade do genoma humano (Sebat e cols, 2004; Redon e cols, 2006).

A CMA apresenta maior resolução em relação ao cariótipo, sendo assim, deleções e duplicações pequenas podem ser visualizadas (Stegelmann e cols, 2010; Visani e cols, 2011). O refinamento dos segmentos pode também permitir mapear os genes que podem estar envolvidos nas malignidades hematológicas (O'Keefe e cols, 2010; Visani e cols, 2011).

A introdução de Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) às plataformas de análise por microarranjo permitiu que, além das CNVs, sejam detectados segmentos de ausência (AOH) ou perda de heterozigose (LOH). Esses segmentos correspondem a regiões onde há dissomia uniparental (UPD), sem alterações simultâneas no número de cópias de genes. Esses defeitos são atribuídos a erros de recombinação mitótica em células somáticas e estão sendo cada vez mais associados a uma variedade de neoplasias (O'Keefe e cols, 2010; Visani e cols, 2011; Sato-Otsubo e cols, 2012; Brecqueville e cols, 2014).

As LOHs, bem como CNVs, constituem marcadores de clonalidade. As áreas anteriormente detectadas são frequentemente identificadas em vários tipos de câncer, incluindo malignidades hematológicas (Maciejewski e Mufti, 2008).

A LOH tem sido foco de atenção recente na genética do câncer, especialmente nas neoplasias hematopoiéticas. Representa um estado alélico anormal, no qual ambos os alelos existentes têm uma única origem parental e, portanto, sendo também chamada de UPD (O'Keefe e cols, 2010; Visani e cols, 2011; Brecqueville e cols, 2014).

A LOH pode ser classificada quanto a sua origem ou sua localização. LOH pode ter uma derivação clonal adquirida ou uma derivação constitucional e não clonal. O LOH não-clonal pode ser o resultado de um evento mitótico embrionário precoce, levando a um mosaïcismo, ou pode ser verdadeiramente constitucional. A LOH constitucional pode surgir de autozigose ou eventos meióticos, como alteração de trissomias, duplicação ou monossomia (McQuilan e cols, 2008; O'Keefe e cols, 2010). As regiões de AOH e LOH podem ser encontradas em populações saudáveis entretanto são regiões de até 4 Mb, em particular em grupos étnicos consanguíneos (McQuilan e cols, 2008),

1.1. LOH em neoplasias hematológicas

A recombinação mitótica é considerada a maior contribuição para adquirir a LOH (Young e cols, 2006). Na leucemia linfocítica crônica (LLC), a neoplasia mieloproliferativa (NMP), síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mielóide aguda (LMA) estão associadas a um aumento significativo da incidência da LOH com a idade (O'Keefe e cols, 2010).

Os processos extrínsecos que levam dano ao DNA estão sendo implicados na geração da LOH, pois, se o tratamento com quimioterapia prejudica DNA, também pode contribuir para o aumento da LOH, como já observado na leucemia mielóide aguda, linfoma folicular ou leucemia linfóide aguda (O'Keefe e cols, 2010).

1.2. Neoplasias Mieloproliferativas clássicas (NMP)

As Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) são um grupo de diferentes doenças que são caracterizadas pela proliferação anormal de células da linhagem mielóide diferenciadas com a origem clonal numa célula progenitora hematopoiética (Visani e cols, 2011; Salati e cols, 2016; Thoenissen e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017; Zhou e cols, 2018).

O conceito de distúrbios mieloproliferativos foi desenvolvido por Dameshek em 1951, no qual ele descreveu essas condições como sendo caracterizadas pela proliferação excessiva de precursores hematopoiéticos na medula óssea e produção excessiva de células sanguíneas maduras. O termo neoplasia mieloproliferativa foi introduzido em 2008 na 4ª edição da Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfóides para sublinhar a natureza clonal dos distúrbios mieloproliferativos (Swerdlow e cols, 2008). Uma revisão foi feita em 2016 e são classificadas em: leucemia mieloide crônica (LMC), BCR-ABL1 +; leucemia neutrofílica crônica (LNC); policitemia vera (PV); mielofibrose primária (MFP), com estágio precoce/ pré fibrótico e MFP (estágio fibrótico); trombocitemia essencial (TE); leucemia eosinofílica crônica não especificada (LECNE); e MPN, inclassificável (Arber e cols, 2016; Rumi e Cazzola, 2017)

Dentro das NMPs, temos as chamadas NMPs clássicas que são classificadas em três tipos: Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e a Mielofibrose primária (MFP), que apresentam complicações frequentes relacionadas à doença, como trombose venosa e arterial, hemorragias e o risco para a transformação leucêmica (Brecqueville e cols, 2014; Vainchenker e Kralovics, 2017).

As NMPs clássicas são doenças que apresentam características comuns, com manifestações clínicas semelhantes e uma possibilidade de progressão da PV e TE para a MF, caracterizando a MF secundária (Hultcrantz e cols, 2012; Moulard e cols, 2014; Rumi e Cazzola, 2017). O estudo citogenético deve ser considerado junto com a biopsia da medula óssea, importante para o diagnóstico das NMPs. (Boiocchi e cols, 2013; Rumi e Cazzola, 2017).

Em geral, a expectativa de vida dos doentes com NMPs é inferior ao da população, apresentando uma sobrevida média aproximadamente de 20 anos para a TE, 14 anos para PV e 6 anos para MFP. Um dos riscos das NMPs é a evolução para a leucemia, sendo que na PV a taxa de transformação leucêmica vai 2,3%, a 7,9%, enquanto que na TE é de 2,3%, entretanto, na TE a evolução fibrótica é mais freqüente que a transformação leucêmica (Titmarsh e cols, 2014; Srour e cols, 2016). Na MFP a taxa de transformação leucêmica é variável, podendo ser de 11 a 35% aos 3 anos e em até 65% aos 5 anos (Roman e cols, 2016; Lussana e Rambaldi, 2017). Os fatores que podem alterar negativamente a sobrevida são, na PV e TE, idade avançada, leucocitose, trombose e alterações no cariótipo (Roman e cols, 2016; Lussana e Rambaldi, 2017), enquanto que na MFP são fatores de prognóstico desfavorável: idade maior que 65 anos, anemia, leucocitose, presença de blastos circulantes >3%, sintomas constitucionais (febre, dor óssea, sudorese noturna e caquexia), alterações no cariótipo, necessidade de transfusão e plaquetopenia. Todos estes fatores são indicados no escore Sistema de Escore Prognóstico Internacional e Dinâmico (*DIPSS plus*) (Brecqueville e cols, 2014; Lussana e Rambaldi, 2017).

A PV é caracterizada não somente pelo excesso de eritrócitos e predominância da linhagem eritróide, mas também é associada com uma hiperplasia variável das linhagens granulocíticas e megacariocítica (Rumi e cols, 2011; Visani e cols, 2011). A PV tem um risco para MF secundária ou em LMA e/ou SMD de 5 a 15% depois de 10 anos da doença (Rumi e Cazzola, 2017).

A TE apresenta como características uma contagem de plaquetas aumentadas com a presença de hiperplasia megacariocítica (Stegelmann e cols, 2010; Brecqueville e cols, 2014; Hahn e cols, 2014; Salati e cols, 2016), enquanto a MF, a doença pode ser primária (MFP) ou resultado da progressão de uma PV (MF pós PV) ou TE (MF pós- TE), sem diferenças nas características clínicas e histológicas (Gilles e cols, 2017; Rumi e Cazzola, 2017). Neste trabalho daremos uma ênfase maior a mielofibrose primária e secundária.

1.2.1 Fisiopatologia da Mielofibrose primária

A MFP é a que mais apresenta características variáveis dentro das NMPs clássicas e tem como características uma expansão de granulócitos e megacariócitos na medula óssea, acompanhada de alterações reacionais intensa do estroma medular com fibrose colagênica, osteoesclerose e angiogênese (Stegelmann e cols, 2010; Brecqueville e cols, 2014; Salati e cols, 2016). Também na MFP podemos encontrar citopenias e/ou leucocitose, leucoeritroblastose, hematopoiese extramedular, hepatoesplenomegalia (Tefferi e cols, 2009; Conchon e cols, 2015; Vainchenker e Kralovics, 2017). A MFP apresenta duas fases diferentes, uma fase pré-fibrótica, inicial, com medula óssea hiperclular que pode evoluir até a substituição do tecido hematopoiético por fibras reticulínicas (fase fibrótica). As causas principais que podem levar a óbito são: uma evolução para a leucemia aguda (11-20%), infecções, sangramentos, trombozes, falência cardíaca, hepática, respiratória e hipertensão portal (Rum e cols, 2014; Gilles e cols, 2017; Lussana e Rambaldi, 2017; Spivak, 2017; Zhou e cols, 2017).

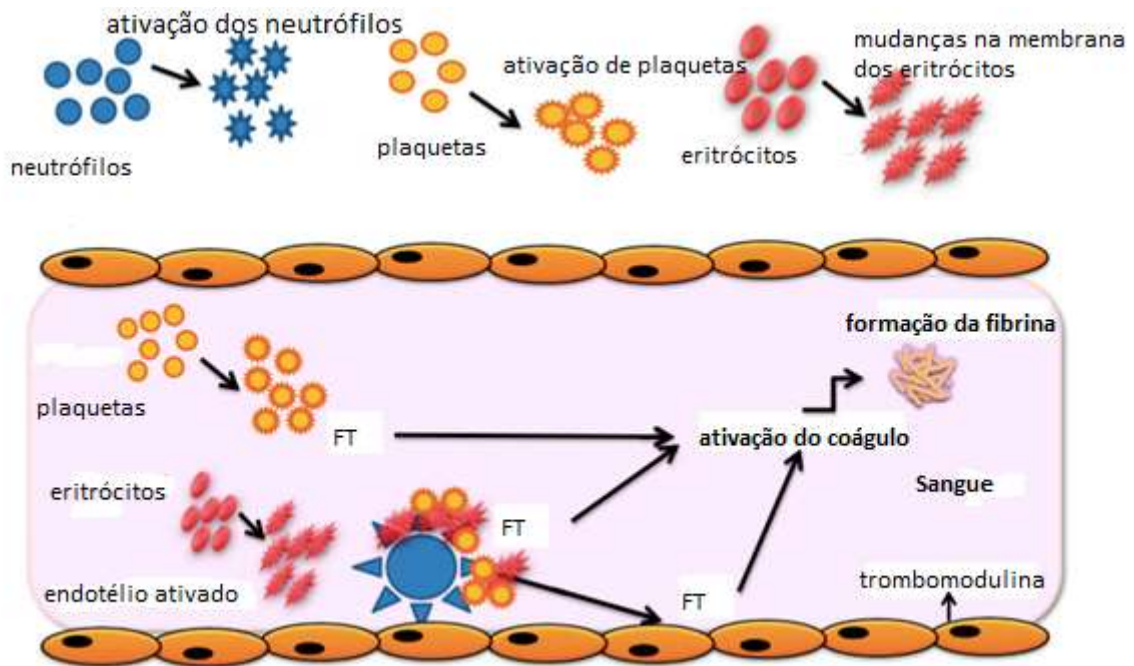
1.2.2. Trombose

As NMPs clássicas compartilham muitas características clínicas e moleculares em comuns, incluindo o aumento do risco de trombose e transformação leucêmica (How e Stephen, 2017). As trombozes arteriais e venosas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas NMPs. A incidência de trombose é estimada em 11-39% dos pacientes com PV, 8-29% da TE e em 3-7% na MFP (How e Stephen, 2017).

A trombose venosa pode ocorrer em locais anatômicos incomuns, como a trombose venosa esplâncnica ou cerebral. São fatores de risco a idade maior que 60 anos, história prévia de eventos trombóticos, obesidade, hipertensão, hiperlipidemia, bem como o aumento nas contagens das células (leucocitose, eritrocitose e trombocitose) e a presença da mutação *JAK2 V617F* (Barbui e cols, 2013; How e Stephen, 2017; Zhou e cols, 2018).

Os eventos trombóticos ocorrem porque os precursores das plaquetas, os megacariócitos, são hiperativados e com isso ocorre uma maior mobilidade, agregação, quimiotaxia e maior produção de plaquetas anormais. Estas plaquetas anormais aumentam a expressão da selectina P que atrai mais leucócitos levando a lesão plaquetária e uma maior liberação da tromboplastina (fator tissular) que ativa os fatores pró-coagulantes e aumentam a formação da fibrina (Figura 1) (Barbui e cols, 2013; How e Sthepen, 2017). Outras mutações encontradas nas NMP, como *MPL* e *CALR*, estão raramente associadas com eventos trombóticos (How e cols, 2017).

Figura 1. Patogênese da trombose na Policetemia vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose primária, mostrando o envolvimento dos eritrócitos, neutrófilos e plaquetas na ativação e formação da fibrina



Adaptado de: Barbui e cols, 2013.

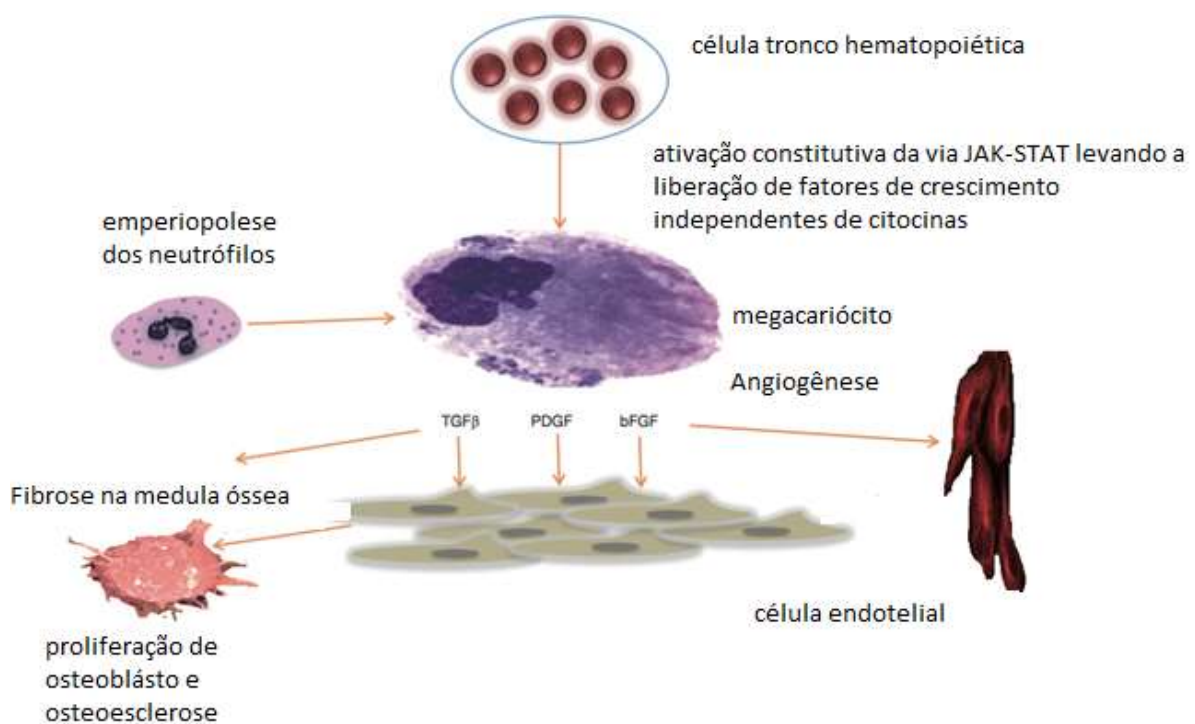
1.2.3. Fibrose medular

Na mielofibrose primária, a fibrose medular é uma característica patológica central e o principal critério de diagnóstico da mielofibrose segundo a OMS. A expressão aumentada de citocinas inflamatórias, a ativação da via *JAK-STAT* que pode levar ao crescimento dos megacariócitos, independentes de citocinas, foram todos implicados na patogênese da fibrose da medula óssea (Zahr e cols, 2016).

A fibrose medular é decorrente da proliferação clonal da célula hematopoiética que leva à hiperplasia de megacariócitos e monócitos que passam a liberar fator de crescimento fibrinogênico (Chauffaille, 2010). Estes megacariócitos alterados produzem maior quantidade de plaquetas, especialmente de plaquetas anormais e fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator estimulador de megacariócitos, as trombospondinas (TSP-1 e 2), interleucina (1IL-1) (interleucina 1) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF-2) (Zahr e cols, 2016; Zhou e cols, 2018).

Outras citocinas inflamatórias também foram implicadas na fibrose medular como, IL-8, IL-1 α e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), que promovem uma alteração local na medula, desregulando as células troncos hematopoiéticas e levando ao remodelamento da medula por secreção de citocinas que conduzem a mielofibrose. Essas citocinas promovem a neoosteogênese por induzir a diferenciação osteoblástica através do TGF- β 1 e inibir a diferenciação dos osteoclastos através da osteoprotegerina (Vainchenker e Kralovics, 2017). Existe uma emperipoese de neutrófilos que leva à liberação de TGF- β , PDGF e FGF-2 a partir de grânulos alfa presentes nos megacariócitos, como mostra a figura 2..

Figura 2. Patogênese da fibrose, demonstrando o envolvimento dos megacariócitos e neutrófilos liberando fatores de crescimento que induzem a osteoesclerose e fibrose.



Adaptado de: Agarwal e cols, 2016.

Um dos fatores de crescimento que tem o papel principal na fibrose é o TGF-beta, pois, induz a produção de proteínas da matriz extracelular, como os colágenos I,III, fibronectina, proteoglicanos e tenascina. O depósito de colágeno ocorre inicialmente no espaço extracelular, com o colágeno tipo III, que posteriormente é substituído pelo tipo I (Agarwal e cols, 2016). Existe uma emperipoese (passagem de uma célula através do citoplasma de outra célula) de neutrófilos que leva a liberação de TGF beta, PDGF e FGF a partir de grânulos alfa presentes nos megacariócitos. Essas citocinas causam angiogênese e osteosclerose, fazendo com que as células do estroma liberem osteoprotegerina.

1.2.4 Evolução para as leucemias

Em pacientes com MFP, cerca de 11 a 20% dos pacientes podem evoluir para leucemias, principalmente do tipo agudo (Brecqueville e cols, 2014). Essa evolução para leucemia é aumentada com a idade, exposição a quimioterápicos e alterações citogenéticas nos cromossomos 1 e 9, como a LOH 9p e duplicação 1p (Spivak, 2017).

Os pacientes com MFP que apresentam a mutação *CALR* tem menor risco de evolução para leucemia, enquanto indivíduos triplos negativos carregam maior risco de leucemização (Rumi e cols, 2014; Zhou e cols, 2017).

1.3. Alterações citogenéticas e mutações nas NMP clássicas

O melhor conhecimento das áreas da genética e hematologia permitiram aprofundar na caracterização molecular e etiologia das NMPs clássicas, que começou com a identificação do cromossomo *Philadelphia* (Nowell e Hungerford, 1960), bem como seu conhecimento citogenético e molecular (*BCR/ABL*). Depois a demonstração do caráter clonal da LMC e, um pouco mais tarde das NMPs clássicas foram muito importantes para o conhecimento dessas patologias. Entretanto, o conhecimento teve um grande avanço com a descoberta, em 2005, da mutação *JAK2V617F* (Tefferi e cols, 2008; Santos e cols, 2001; Vainchenker e Kralovics, 2017).

Pouco tempo depois veio a descoberta de novas mutações envolvidas nas NMPs, como *MPL* e a *CARL* (Pikman e cols, 2006; Klampfl e cols, 2013; Nangalia e cols, 2013), tudo isso aliado com avanços na epigenética com a identificação de outras mutações envolvidas nos desequilíbrios epigenéticos de modulação da expressão genética, como os *ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A* e *IDH* $\frac{1}{2}$ (Green e Bear, 2010; Stelmann e cols, 2011; Vainchenker e Kralovics, 2017)

As anormalidades no cariótipo são detectadas em menos de 5% nos pacientes com TE, 15% dos pacientes com PV e de 30-50% dos pacientes com MFP (Tefferi e cols, 2009; Visani e cols, 2011; Brecqueville e cols, 2014; Vainchenker e Kralovics, 2017).

Na MFP as alterações citogenéticas mais prevalentes são del(20q), del(13q), trissomia do 9 e alterações do cromossomo 1, que representam um prognóstico favorável (Hussein e cols, 2009; Caramazza e cols, 2011; Visani e cols, 2011; Boiocchi e cols, 2013).

Também na MFP um cariótipo complexo, ou anormalidades incluindo +8, del(7)/ del(7q), del(5)/ del(5q), i(17q), inv(3), del(12p) ou rearranjo 11q23 como prognósticos desfavoráveis. (Hussein e cols, 2009; Caramasa e cols, 2011; Brecqueville e cols, 2014).

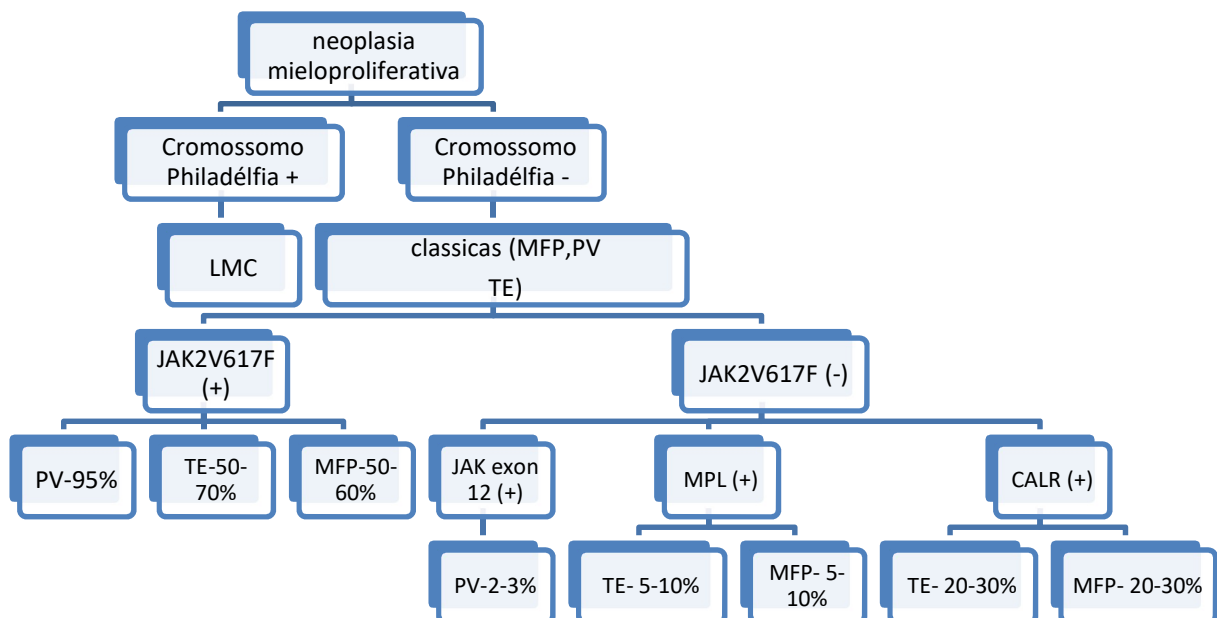
As mutações que estão presentes nas NMPs podem ser classificadas em dois grupos diferentes, por um lado as chamadas mutações *driver* que são a *JAK2V617*, *MPL* e a *CARL*, são mutuamente exclusivas e responsáveis por determinar o fenótipo com as características mieloproliferativas (Andrikovics e cols, 2010; Barbui e cols, 2013; Boiocchi e cols, 2013). Temos também as mutações não *driver* ou colaborativas que podem ter influência na progressão das doenças e seus prognósticos (Vainchenker e Kralovics, 2017).

1.3.1 Mutações *driver*

As NMPs são caracterizadas pela desregulação das vias de sinalização intracelular e associam-se a mutações envolvidas em vias celulares, como a sinalização dos receptores das citocinas e a regulação da expressão genética, quer através de fatores de transcrição, quer através de reguladores epigenéticos.

Desse modo, as mutações nas NMPs são classificadas em *driver*, que são responsáveis pelo fenótipo mieloproliferativo e as mutações não *driver* ou colaborativas (Tefferi, 2016). Mais de 85% dos pacientes com MF têm mutação mutuamente exclusiva em um dos seguintes três genes *driver*: *JAK2* (60-65%), *MPL* (5%) ou *CALR* (25 a 35%). Aproximadamente 10% dos pacientes não possuem nenhuma das mutações *driver*, sendo chamados triplo-negativos que apresentam um prognóstico ruim e demonstram uma alta taxa de transformação leucêmica (Figura 3) (Alshemmari e cols, 2016; Rumi e Cazzola, 2017).

Figura 3. Presença das mutações *driver* nas neoplasias mieloproliferativas clássicas.



Adaptado de: Agarwal e cols, 2016.

1.3.1.1 JAK

A proteína *JAK2*, pertencente à família das *Janus quinases*, é uma tirosina quinase, que é fosforilada em resposta à ação de diversas citocinas, ativando assim diferentes vias de sinalização intracelular e participando do processo de transdução do sinal.

Trata-se de uma mutação pontual onde ocorre a substituição de uma guanina por uma timina no éxon 14 do gene *JAK2*, levando à substituição de um aminoácido valina por fenilalanina na posição 617 da proteína codificada (*JAK2V617F*). Esta alteração é somática, adquirida e encontradas nas células da linhagem eritróide e mielóide (McNally e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017)

A mutação *JAK2* pode dar origem a três doenças fenotipicamente distintas (PV, TE e MFP), sendo a teoria mais aceita é de que o nível da atividade quinase gerada pela mutação determinaria o perfil da doença.

A carga alélica da mutação *JAK2* pode variar de 1 a 100%, sendo que em níveis baixos de atividade quinase favoreceria o fenótipo megacariocítico (TE), e altos níveis um fenótipo eritróide (PV). Quando a atividade da quinase fica sustentada, dependendo do nível e tempo de exposição, levaria a MF, sendo que na maioria das vezes a carga é alta (Monte-Mor e Costa, 2008; Vainchenker e Kralovics, 2017; Hubbard, 2018).

A presença de uma pequena parcela de pacientes com PV sem a mutação *JAK2V617F* éxon 14 levou a busca para uma investigação de outras mutações na própria *JAK2* e/ou em outros membros da família da *JAK2* e permitiu a identificação de mutações adquiridas no éxons 8, 12, 13, 14 e 15 em pacientes com *JAK2V617F* positivos ou ausentes (Tefferi e cols, 2009; Scott, 2011; Salati e cols, 2016). No mecanismo de sinalização celular normal, os eritrócitos, leucócitos e megacariócitos são estimuladas a crescer e a proliferar quando os fatores de crescimento, tais como: fatores de estimulação de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), interleucinas (ILs), eritropoetina (Epo), trombopoetina (TPO), interferon- γ (IFN- γ) e os hormônios de crescimento e leptina se ligam aos receptores *JAK*-dependentes: receptores de eritropoietina (Epo-R), leucemia mielóide ou receptor de trombopoetina (MPL ou Tpo-R) e o receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF-R) (Kralovics e cols, 2005; Jatiani e cols, 2010; McNally e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017). (Delhommeau e cols, 2007; McNally e cols, 2016) .

1.3.1.2 *MPL*

A mutação *MPL*, identificado como um oncogene viral, pode ser encontrada nas células tronco hematopoiéticas (CTH), plaquetas e megacariócitos, baço e fígado, sendo o único receptor de citocinas expresso nas CTH. O *MPL* pode ligar-se a trombopoietina (TPO) e assim ele regula a megacariopoiese e controla a expansão (Vainchenker e Kralovics, 2017). São desprovidos de atividade quinase e dependente da ligação com a *JAK2* para ativar vias de sinalização intracelular (varghese e cols, 2017). A mutação *MPL* é encontrada somente nos pacientes com TE e MFP em torno de 3-5%, não ocorrendo em pacientes com PV (Rozovski e cols, 2017; Vainchenker e Kralovics, 2017).

1.3.1.3 *CALR*

Os pacientes com TE (55%) e MFP (65-70%) apresentam mutações *JAK2V617F* e *MPL*, ativando a via receptora de citocinas/*JAK2*. No entanto, aproximadamente 40% dos pacientes com TE e MFP não apresentam mutações recorrentes em genes envolvidos na sinalização. No final de 2013, Klampfi e cols (2103) e Nangalia e cols (2013) descobriram mutações no gene *CALR* (calreticulina) em 25-30% de TE e MFP negativas para as mutações *JAK2* e *MPL*. Mais de 50 mutações foram descritas até agora (Vainchenker e Kralovics, 2017). A *CALR* foi originalmente identificada como uma proteína de ligação de Ca^{2+} nos retículos endoplasmáticos da maioria das células. Sua função principal é desempenhar um papel crítico nos processos de controle de qualidade durante a síntese e dobramento de proteínas, através da ligação a proteínas mal dobradas.

A *CALR* é encontrada em múltiplas localizações subcelulares fora do retículo endoplasmático, onde medeia uma variedade de processos celulares, incluindo depuração celular apoptóticas, adesão celular e migração celular (Alshemmari e cols, 2016). Além disso, a *CALR* está implicada em uma variedade de papéis celulares, incluindo modulação da ativação da resposta de proteína desdobrada e sinalização e armazenamento de Ca^{2+} , regulação da expressão de genes sensíveis a esteróides, acompanhamento na dobragem de proteínas, resposta auto-imune e neuromodulações (Alshemmari e cols, 2016).

Os pacientes com MFP com mutação *CALR* são geralmente mais jovens do que os que apresentam mutações *JAK2*, e apresentam maior contagem de plaquetas, menor índice de leucócitos, maior nível de hemoglobina, menor incidência de mutações de spliceosoma e maior sobrevivência (Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017)

1.3.2 Mutações não *driver* ou colaborativas

Também podemos encontrar outros tipos de mutações ditas não *driver* ou colaborativas que podem influenciar a evolução e prognóstico das NMP, tais como nos genes *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH*, *IKZF1*, *LOK*, *EZX2*, *DNMT3A*, *NF1*, *SUZ*, *SF3B1* e *SRF2* (Brecqueville e cols, 2014). São mutações em genes que codificam reguladores de metilação no DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), modificadores de histonas (*IDH1/2*, Polycomb repressor complex 1 e 2), fatores transcricionais (*TP53*, *CUX1*, *IKZF1*, *FOXP1*, *ETV6*, *RUNX1*), proteínas sinalizadoras (*NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *LNK*, *CBL*, *FLT3L*) e fatores de RNAm spliceosoma (*SFB1*, *SRF2*, *U2AFI*, *ZRSR2*) (Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017).

As mutações *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2* estão envolvidas com um prognóstico desfavorável e transformação leucêmica na MF, sendo que *ASXL1* tem um forte impacto na sobrevivência, independente do Sistema de Escore Prognóstico Internacional e Dinâmico (DIPSS-plus) (Carbuccia e cols, 2009; Brecqueville e cols, 2014; Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017; Zhou e cols, 2017). A presença de duas ou mais dessas mutações poderia prever a menor taxa de sobrevida global em pacientes com MFP: mediana de 2,6 anos versus 7,0 anos para 1 mutação versus 12,3 anos sem mutações (Alshemmari e cols, 2016). Tem sido relatado que os pacientes com MFP com perfil de mutação *CALR* + / *ASXL1*- têm uma sobrevida mais prolongada, de aproximadamente 18 anos, em comparação com aqueles com *CALR*- / *ASXL1* +, enquanto os pacientes *CALR* + / *ASXL1* + e *CALR*- / *ASXL1*- normalmente apresentam um risco intermediário no DIPSS plus (Rumi e cols, 2014; Tefferi e cols, 2014; Zhou e cols, 2017).

As mutações nos genes *CBL*, *LNK*, *NF1* e *NRAS* são mutuamente exclusivas, mas podem ser encontrados com a mutação *JAK*. Mutações nos genes *TET2* e *DNMT3A* são mutuamente exclusivas, enquanto que *ASXL1*, *EZH2* e *TET2* podem ser concomitantes ou co-ocorrer com a *JAK2* (Carbuccia e cols, 2009; Brecqueville e cols, 2014; Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017).

O gene *EZH2* é mutado em torno de 5 a 10% nas MFP, mais particularmente associados com *JAK2V617F* e tem um prognóstico desfavorável. A forte cooperação entre *EZH2* e *JAK2* estão envolvidos na iniciação da doença e a nível celular, a perda do gene *EZH2* aumenta a produção de plaquetas em relação a eritropoiese (Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017; Zhou e cols, 2017).

Os genes envolvidos no spliceosoma, citados anteriormente, estão restritos a TE e MFP, sendo que as mutações *SRSF2*, *SF3B1* e *U2AF1* estão associados a anemia, trombocitopenia. A mutação *SRSF2* tem uma importância para a transformação leucêmica (Alshemmari e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017). O *DNMT3A* pode predispor para a progressão da doença para leucemia nas NMP.

1.4. Escores prognósticos na mielofibrose

A MF é uma condição com muita variedade de prognóstico, a depender se for primária ou secundária, da severidade das alterações na contagem das células no sangue, da presença de blastos circulantes e de anormalidades citogenéticas. Por isso, um sistema de escore para MF é o Sistema de Escore Prognóstico Internacional e Dinâmico (DIPSS), depois modificado para DIPSS plus, no qual foi acrescentada a necessidade de transfusão de eritrócitos e também de plaquetas quando menores do que 100.000/ul e a presença do cariótipo desfavorável cariótipo complexo ou uma ou duas anormalidades que incluem +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q, 12p- ou rearranjo 11q23). O DIPSS atribui dois pontos adversos para a hemoglobina < 10 g/dl e a categorização do risco: baixa (0 pontos adversos), intermediária 1 (1 ou 2 pontos), intermediária 2 (3 ou 4 pontos) e alta (5 ou 6 pontos) com respectivas sobrevivências (médias de 15,4; 6,5; 2,9 e 1,3 anos) (Gangat e cols, 2011) e pode ser usado durante o curso da doença. (Passamonti e cols, 2010; Brecqueville e cols, 2014).

No DIPSS plus as categorias de risco 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. Os escores levam em conta os parâmetros clínicos-laboratoriais, evidências de que tipo de mutação driver pode impactar na sobrevida global e o risco para transformação leucêmica.

A mediana global de sobrevida em indivíduos com mutações da *CALR*, *JAK2*, *MPL* ou triplos negativos é respectivamente de 17,7; 9,2; 9,1; e 3,2 anos. Os pacientes triplo negativos tem maior probabilidade para evoluir para leucemia. Por tudo isso citado, foi criado 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 (Rumi e cols, 2014; Vannucchi e cols, 2014; Rozovski e cols, 2017). Este sistema é baseado em oito fatores, que são:

- idade > 60 anos (pontuação 1,5)
- sintomas constitucionais (pontuação 0,5)
- hemoglobina < 10 g/dl (pontuação 0,5)
- plaquetas < 200.000/mm³ (pontuação 1,0)
- triplo negativos (pontuação 1,5)
- mutação *JAK2* ou *MPL* (pontuação 0,5)
- mutação *ASXL1* (pontuação 1,5)
- mutação *SRSF2* (pontuação 1,5)

Na mielofibrose tem sido demonstrada a importância de alterações citogenéticas e mutações somáticas nos prognósticos de pacientes com MF, então foi proposto o *Genetics-Based Prognostic Scoring System* (GPSS) (Tefferi e cols, 2014). Neste sistema utiliza uma classificação revisada para citogenética e distingue em quatro categorias de risco citogenético:

- Muito alto: cariótipo com monossomia, inv(3), i(17q), -7/7q-, anormalidade do 11q ou 12p
- Alto: cariótipo complexo sem monossomia, 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

Com pontuação de 2,0 (idade > 60), 3,0 (citogenética de muito alto risco), 2,0 (citogenética de alto risco), 2,0 (triplo negativo), 2,0 (mutações *JAK2*, *MPL* e *CARL* tipo 2), 1,0 (mutações *ASXL1* e *SRSF2*).

1.5. Emprego da CMA em pacientes com mielofibrose

Apesar da CMA ser hoje um importante método para diagnóstico e pesquisa de neoplasias, os trabalhos que utilizam a CMA em amostras de pacientes com MF ainda são escassos. Os primeiros trabalhos a empregar a CMA foram os de Visani (2011) e Rice (2011).

No trabalho de Visani (2011) os autores estudaram um grupo de 20 pacientes com mielofibrose primária detectaram alterações em todos os pacientes, sendo que todos apresentaram um cariótipo complexo. Os autores encontraram recorrência das alterações del(13q), del(20q), anormalidades no cromossomo 1, trissomia 9 e 8 e del(5q). Também encontraram diferentes regiões de dissomia uniparental (UPD) no cromossomos 9 (*locus JAK2*), 13q, 1 e no 11 e em 55% dos pacientes apresentaram a del (20q) com o gene *SIRPB1*, que é um membro da família de proteína reguladora de sinal, pertencendo a superfamília de imunoglobulina. No entanto, esses autores utilizaram uma plataforma de microarranjo não específica para a detecção de alterações cromossômicas e com parâmetros de análise muito abaixo dos considerados ideais. Dessa forma, muitos dos achados devem corresponder a erros de interpretação ou a alterações constitucionais comuns, classificadas erroneamente como possivelmente patogênicas.

Rice e cols (2011) estudaram 87 pacientes e identificaram alterações patogênicas no microarranjo em 88% dos pacientes, incluindo CNVs e LOH. As CNVs foram encontradas no cromossomo 1, trissomia 8 e 9, del(20q), mas as mais comuns foram aquelas envolvendo o cromossomo 9, incluindo LOH 9p, trissomia 9, ampliações de 9p13.3-23.3, 9q33.1-34.13 e 9q34.13. Os autores também demonstraram que a maioria dos pacientes (86%) com alta carga alélica de *JAK2* (>86%) tem a perda de heterozigose no cromossomo 9p devido a uma recombinação mitótica .

A del (20q) foi encontrada em um paciente com MFP incluindo a região do gene *ASXL1* que tem mostrado recentemente em 11% dos pacientes com SMD e 7% em MFP e TE. Também encontraram ganho no cromossomo 1q23.3 englobando o gene *CBL* na TE e perda del7q35 abrigando o gene *EZH2*.

No trabalho de Brecqueville e cols (2014) utilizando a técnica de CMA em pacientes com mielofibrose primária os autores encontraram 54% de CNVs sendo que as alterações mais comuns foram del(20q), del(17q), del(7p), del(9p), del (13q) e del(1q). Os autores encontraram em 57% dos pacientes com MFP a presença de genes associados com um papel conhecido ou potencial na leucemogênese, tais como *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *KRAS*, *LNK*, *MPL*, *NF1*, *NRAS*, *PTPN11*, *SF3B1*, *SRSF2*, *SUZ12*, *TET2* e *TP53* e sugeriram genes candidatos com base nas alterações encontradas na CMA (*BMI4*, *PPP1R16B*, *RCOR1*, *SOCS2* e *TRPS1*). Eles identificaram um gene novo na MF, *PTPN11* que foi associado com deleção. Eles também observaram que os genes *JAK2*, *ASXL1*, *TET2*, *EZH2*, *DNMT3A*, *LNK* e *SF3B1* foram encontrados tanto na MFP como na MF secundária. A mutação *SF3B1* foi encontrada na MF pós TE. Os autores demonstraram que as mutações *CBL*, *LNK*, *MPL*, *NF1*, *TET2*, *DNMT3A*, *PTPN11* e *NRAS* foram mutuamente exclusivas, enquanto que as mutações *ASXL1*, *EZH2* e o *TET2* podem ocorrer concomitante e coocorrer com a mutação *JAK2*. Os autores demonstraram que a CMA permitiu a identificação de anormalidades não detectáveis no cariótipo, em particular del (17q), del(12q) associado ou não à monossomia 7. Apesar da alta positividade de CNVs nesses pacientes, a plataforma de arrays utilizadas pelo grupo não permite a detecção de LOH.

Dessa forma, o pequeno número de casos de MF analisados por microarranjo e a heterogeneidade das análises não permite ainda determinar qual é de fato a contribuição dessa metodologia para o diagnóstico e prognóstico da MF.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi averiguar a presença de rearranjos cromossômicos submicroscópicos, por meio da análise cromossômica por microarranjos em portadores de Mielofibrose Primária ou Secundária nos pacientes atendidos no serviço de Hematologia do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF)

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de detecção de rearranjos pela técnica de citogenética convencional e a análise cromossômica por microarranjos;
- Identificar genes candidatos mapeados nos segmentos alterados que possam influenciar no diagnóstico e prognóstico na mielofibrose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo, foram analisados 16 pacientes portadores de Mielofibrose Primária (13) ou mielofibrose pós TE (3), 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 Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008, divididos em critérios maiores e menores para mielofibrose primária e MF pós TE, listados nas tabelas 1 e 2.

Foram obtidas dos prontuários as seguintes informações: idade, gênero, resultado do cariótipo e a presença das mutações *driver*.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS/SES-DF sob o número CAAE 19493613.5.0000.5553.

Tabela 1. Critérios de diagnóstico de Mielofibrose Primária, divididos em critérios maiores e menores, OMS 2008.

Critérios maiores

1. Proliferação megacariocítica com atipia, fibrose reticulínica ou colagênica ou, na ausência de fibrose significativa, presença de alterações megacariocíticas com aumento da celularidade da medula à custa de proliferação granulocítica com diminuição da eritropoiese;
2. Ausência de critérios da OMS para PV, LMC BCR/ABL+, síndrome mielodisplásica ou outra neoplasia;
3. Mutação JAK2V617F ou outro marcador clonal (MPLW515 K/L), ou na ausência de marcador clonal, nenhuma evidência de que a fibrose medular ou demais alterações sejam secundárias a infecção, inflamação, tricoleucemia, neoplasia linfóide, metástase ou mielopatias tóxicas.

Critérios menores

1. Leucoeritroblastose;
2. Aumento da DHL sérica
3. Anemia
4. Esplenomegalia

Obs.: para a Mielofibrose Primária é necessário todos os critérios maiores e pelo menos dois critérios menores

Fonte: Chauffaille, 2010.

Tabela 2. Critérios de diagnóstico de MF pós TE, OMS 2008.

<p>Exigência</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico anterior de TE por meio da aplicação de critérios da OMS 2. Fibrose da medula óssea grau 2-3 (na escala 0-3) ou grau 3-4 (na escala 0-4) <p>Exigências adicionais (necessárias duas)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia e queda de ≥ 2 mg/dl no nível de hemoglobina em relação ao valor basal de hemoglobina 2. leucoeritroblastose 3. aumento de 5cm na esplenomegalia palpável ou surgimento de esplenomegalia de palpação recente 4. Elevação do nível de DHL 5. Desenvolvimento de um ou mais entre os seguintes fatores: perda de peso > 10% em 6 meses; sudorese noturna; febre inesplicável
--

Fonte: Barosi e cols, 2008.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de material biológico foram de alíquotas de sangue periférico. Em um paciente foi coletada amostra de sangue periférico e aspirado de medula óssea para fazer a comparação das alterações encontradas pela técnica de CMA.

Foram coletados de 4 a 8 mL de sangue em tubos com EDTA, onde cada paciente foi identificado através de um código e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) para extração do DNA. As 16 amostras de pacientes com MFP e MF pós TE foram feitas de acordo com a disponibilidade nas plataformas *CytoScan*® 750K Array (3 pacientes) ou *CytoScan* HD (13 pacientes) (*Affymetrix*, EUA).

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração de DNA foi feita a partir do sangue periférico pelo método *Puregene* “*Salting out*”. Este método é dividido em etapas, sendo a primeira de lise celular, onde foi utilizado 5mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8,0 em uma reação e, 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra, para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos.

Para a segunda etapa utilizou-se 1 mL da solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de NH₄. Centrifugou-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formam um pellet marrom escuro e compacto.

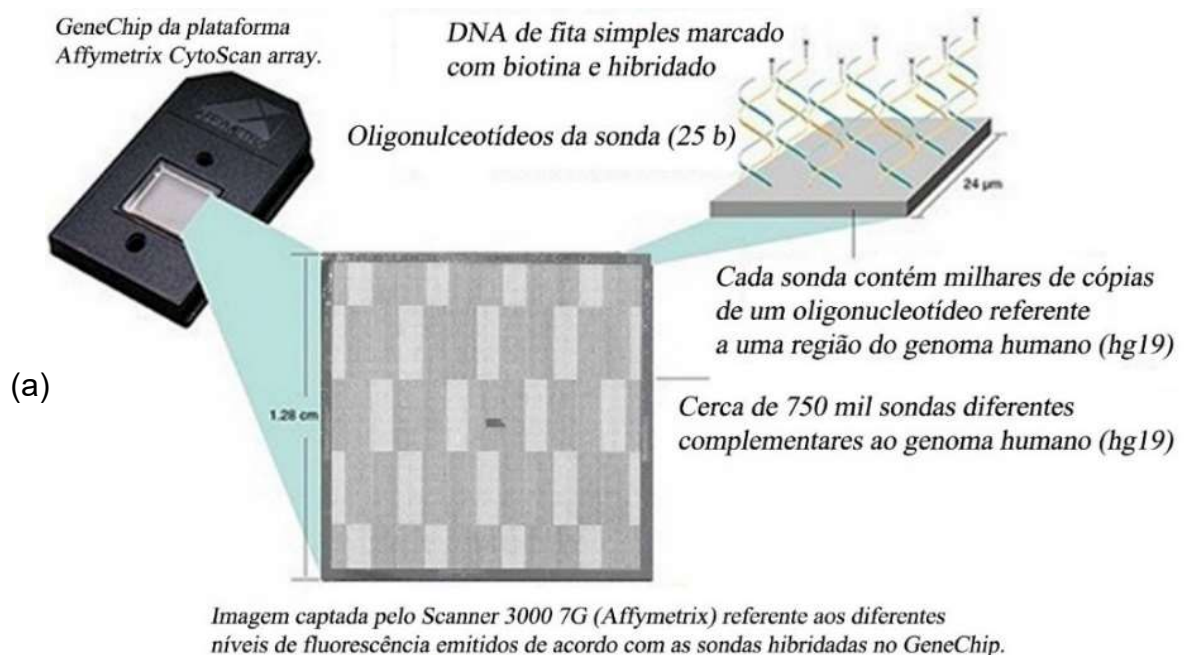
Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon contendo 3 mL de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse uma nuvem de DNA. O tubo foi centrifugado a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 3 mL de etanol absoluto. O tubo foi novamente centrifugado. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescentou-se ao tubo com o DNA 200-250 µl de TE 1x ou água milliQ, que resultou em uma concentração aproximada de 400 ng/µl. O DNA obtido foi quantificado em 50 ng/ul no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific).

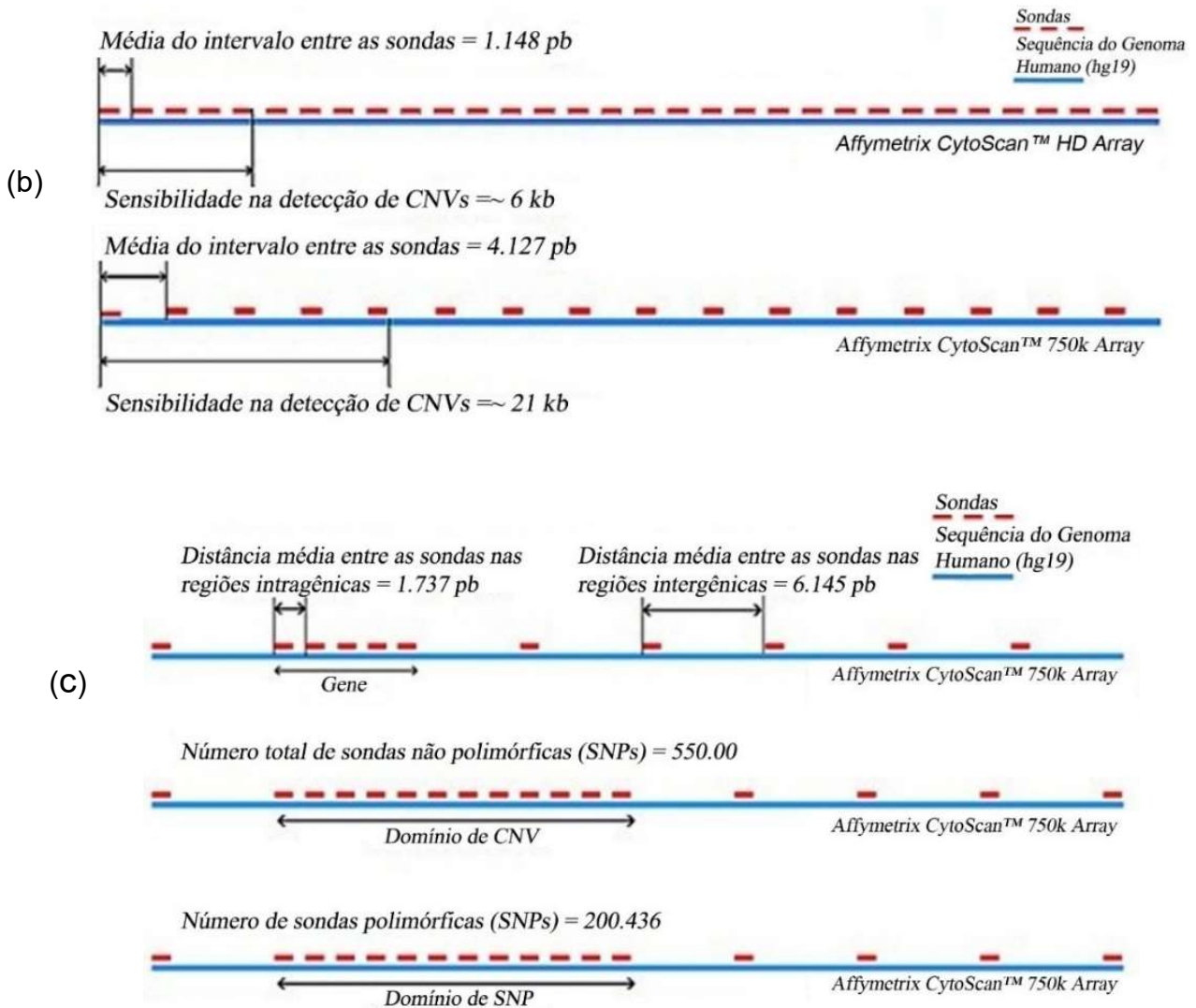
3.4 BUSCA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SUBMICROSCÓPICAS ATRAVÉS DA ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJOS (CMA)

A técnica de CMA permite analisar microdeleções, microduplicações ou perdas de heterozigose, simultaneamente, em milhares de sequências alvo do genoma humano completo. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip (GeneChip®) de DNA (Hastings e cols, 2009; Wain e cols, 2009). A investigação da presença de alterações cromossômicas submicroscópicas por CMA em pacientes com mielofibrose foi feita utilizando a plataforma *CytoScan*® 750K Array ou *CytoScan* HD (*Affymetrix*, EUA) e as configurações disponíveis no GeneChip® Scanner 3000 7G System (*Affymetrix*, EUA). Esta plataforma permite a detecção de CNVs por meio de microarranjos de DNA formados por 550 mil sondas não polimórficas para CNVs de regiões codantes e não codantes do genoma humano, cobrindo uma distância média de 4.1 Kb, e cerca de 200 mil sondas de polimorfismo de únicos nucleotídeos (SNPs) (Figura 5). A produção do GeneChip® desenvolvido pela *Affymetrix* envolve processos de fotolitografia para sintetizar microarranjos de milhares de cópias de oligonucleotídeos (25 nucleotídeos de comprimento) selecionados.

Estes oligonucleotídeos, chamados de sondas, irão constituir centenas de milhares de diferentes células específicas chamadas features. Cada célula do chip tem um tamanho de 5 x 5 micrômetros (μm), e possui uma posição bem determinada. Cada SNP conta com três réplicas para cada alelo espalhadas em várias regiões do chip proporcionando medições múltiplas e independentes de cada região genômica, aumentando a precisão, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Sendo assim os GeneChip® contêm centenas de milhares de sondas de DNA individualizadas, que no seu conjunto representam todo o genoma humano incluindo variações intragênicas correlacionadas.

Figura 4 - (a) Nível de organização e visualização da reação de hibridação com os oligonucleotídeos em microarranjos no GeneChip® da plataforma CytoScan® 750K Array (Affymetrix, EUA). (b) Representação esquemática comparando a diferença no nível de resolução entre os chips CytoScan™HD Array e 750k Array (Affymetrix, EUA). (c) Representação esquemática comparando as diferenças na cobertura da densidade de sondas nas diferentes regiões do genoma no chip CytoScan™750k Array (Affymetrix, EUA).

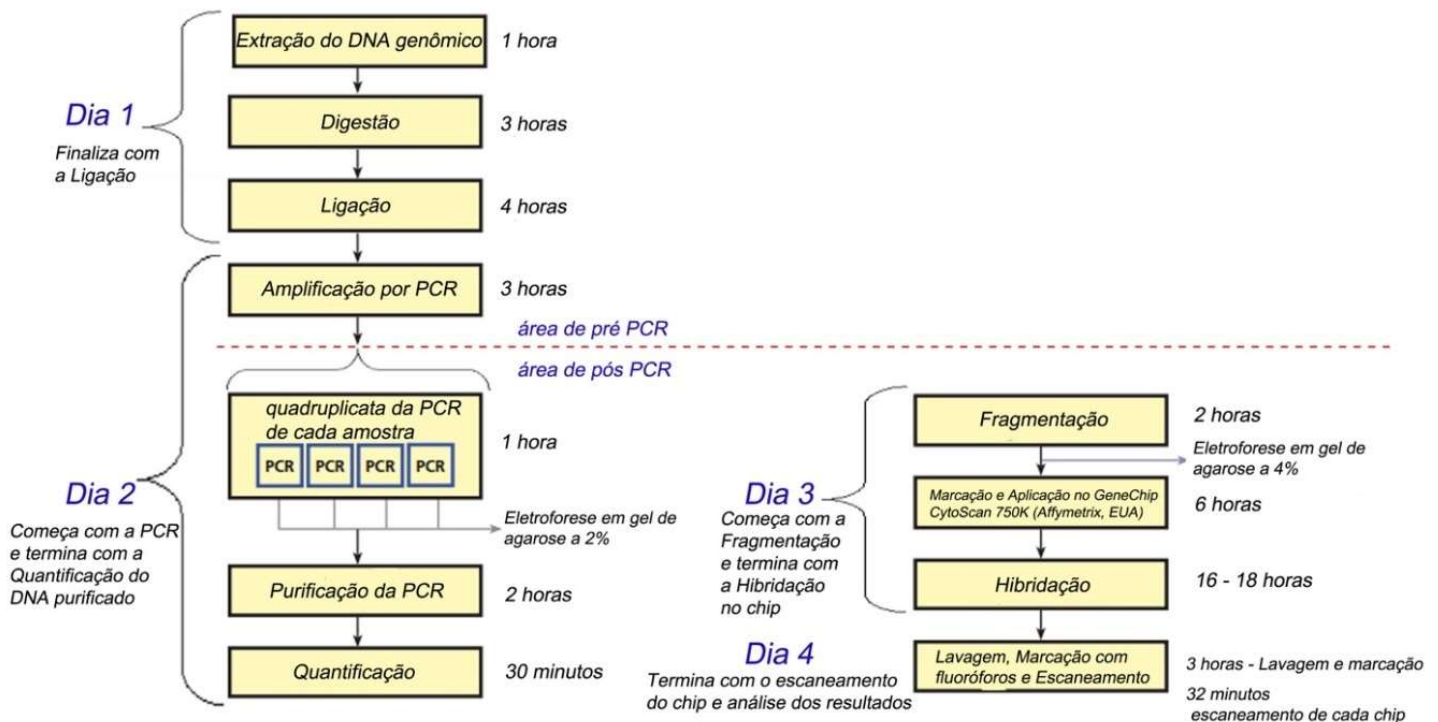




O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em GeneChip®, conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridação, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos SNPs e das CNVs. Um diferencial desta plataforma, é que é possível analisar tanto o número de cópias alelo-específicas quanto os genótipos de SNPs. Além disso, ela confirma independentemente as variações no número de cópias com informações alélicas de SNPs. Tudo isso garante que tenha uma das mais abrangentes e relevantes coberturas de genes constitucionais em um único array.

Assim, há uma cobertura de 100% dos genes constitucionais do *International Standards for Cytogenomic arrays* (ISCA), cobrindo ainda, cerca de 83% dos genes do OMIM® e 80% dos mais de 36 mil genes do RefSeq (NCBI Reference Sequence Database). Uma esquematização de cada um dos passos envolvidos na técnica está representada na Figura 5.

Figura 5 - Protocolo da plataforma Affymetrix® CytoScan™ 750k Array, com o tempo aproximado para a realização de cada etapa



3.4.1 Preparação do DNA genômico

Seguindo os padrões recomendados pelo fabricante quanto as etapas, condições e materiais utilizados foi dada sequência ao protocolo da CMA para a análise das amostras, que teve início com a normalização das amostras para a concentração final de 50 ng/μL de DNA diluído em Low EDTA TE buffer (*Affymetrix, EUA*). Utilizando-se o protocolo estabelecido para grupo de 16 reações contando com 14 amostras e um controle negativo e um positivo.

3.4.2 Digestão com NspI, ligação de adaptadores e amplificação

Os DNAs dos pacientes e controles foram submetidos à digestão em sítios específicos com a enzima Nsp I (*Affymetrix, EUA*) para a obtenção de fragmentos de DNA de tamanhos variados e posterior ligação de adaptadores com a T4 DNA Ligase (*Affymetrix, EUA*), preparando a amostra para a amplificação através da reação da Reação da Polimerase em cadeia (PCR).

Foi utilizada uma mistura de 5 µL de DNA (50ng/µL), 11,55 µL de água (*Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water*), 2,00 µL de tampão da Nsp I (10X), 0,20 µL de albumina bovina sérica (BSA) (100X) e 1,0µL da enzima Nsp I (10 U/µL). A seguir, a mistura foi colocada no termociclador MyCycler® (*Bio-Rad, EUA*) por duas horas a 37°C e 20 minutos a 65°C. Os produtos da digestão foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

A seguir, foi realizada a ligação dos fragmentos de DNA a adaptadores específicos, com a mistura de 0,75 µL de adaptador Nsp I (50 µM), 2,50 µL de tampão da T4 DNA Ligase (10X) e 2,00 µL da enzima T4 DNA Ligase (400 U/µL). A mistura foi colocada em termociclador (*Bio-Rad, EUA*) por três horas a 16°C e 20 minutos a 70°C. Os produtos da reação de ligação foram diluídos com 75µL de água e armazenados a -20°C até o próximo passo.

Foram feitas quadruplicatas das reações da PCR de cada amostra para aumentar a concentração final do DNA genômico. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores Nsp I foram submetidos à reação da PCR com a utilização de 39,5µL de água, 10,0 µL de tampão da TITANIUM™ Taq (10X), 20,0 µL de reagente GC-Melt, 14,0 µL de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5µL do iniciador PCR Primer 002 (100µM) (*Clontech, EUA*) e 2,0 µL da enzima TITANIUM™ Taq DNA polimerase (50X) (*Clontech, EUA*).

Foram colocadas em um termociclador Veriti™ onde as reações tinham 1 ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

Os produtos do PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE corados por brometo de etídio (5 mg/mL), submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1 hora.

Os fragmentos devem se apresentar como um arraste entre de 150 a 2000 pares de bases (PB) confirmando o sucesso da digestão, ligação e PCR, permitindo a sequência do protocolo. Os produtos das PCRs foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

3.4.3 Mistura dos produtos dos PCRs, purificação e quantificação

Os produtos das PCRs das quadruplicatas de cada amostra foram reunidos em um único tubo (volume final 397 μ L) e os fragmentos de DNA foram capturados com o uso de esferas magnéticas (*Affymetrix*, EUA). Após incubação e centrifugação, as esferas magnéticas contendo fragmentos de DNA aderidos a sua superfície foram selecionadas por força magnética na MagnaRackTM (Life Technologies, EUA), lavadas com tampão de purificação (*Affymetrix*, EUA) e, finalmente, os DNAs eluídos em tampão de eluição (*Affymetrix*, EUA) para um volume final de 47 μ L. O material foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue Plus. Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os produtos das PCRs purificados foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

3.4.4 Fragmentação dos produtos dos PCRs

Os produtos das PCRs inicialmente foram misturados com 10 μ L do mix de fragmentação que foi cuidadosamente preparado com 123.5 μ L de água, 158,4 μ L de tampão de fragmentação 10x (*Affymetrix*, EUA) e 5,8 μ L do reagente de fragmentação (2,5 U/ μ L). A mistura foi colocada no termociclador VeritiTM por 35 minutos a 37°C e 15 minutos a 95°C. A fragmentação (volume final: 55 μ L) foi observada pela presença de um fragmento entre 25 e 125 pb em eletroforese em gel de agarose 4% em TBE 1% corado com brometo de etídio (5 mg/mL) submetido a um campo elétrico com voltagem constante de 10 V/cm, por 1 hora. Os fragmentos obtidos foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

3.4.5 Marcação do DNA fragmentado com biotina

A marcação das amostras foi realizada com a mistura de 51 μL do DNA fragmentado e 19,5 μL da mistura de marcação formada por 14,0 μL de tampão Terminal deoxynucleotidyl Transferase (5X), 2,0 μL de reagente de marcação de DNA 30 mM (biotina) e 3,5 μL da enzima TdT (30 U/ μl). A mistura será colocada em um termociclador Veriti™ por quatro horas a 37°C e 15 minutos a 95°C. O DNA marcado com biotina foi armazenado a -20°C até o próximo passo.

3.4.6 Hibridização

Primeiramente foi preparada uma mistura de hibridização com os tampões de hibridização parte 1 (165,0 μL), parte 2 (15,0 μL), parte 3 (7,0 μL) e parte 4 (1,0 μL), mais 2,0 μL de OCR (Oligo Control Reagent, *Affymetrix*, EUA). Em seguida foi realizada a mistura de 70,5 μL de DNA biotilado e 190 μL da mistura de hibridização. Esta mistura foi aquecida no termociclador Veriti™ a 95°C por 10 minutos e resfriada a 49°C até o próximo passo. Ainda no termociclador, 200 μl da mistura desnaturada será depositada imediatamente em cada um dos GeneChip® com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os GeneChip® com o DNA são incubados no forno de hibridização (modelo Hybridization Oven 645, *Affymetrix*, EUA) a 50°C durante 16 a 18 horas a 60 rpm.

3.4.7 Lavagens do GeneChip® e marcação com fluoróforos

A lavagem e marcação dos GeneChip® foi realizada, quatro por vez, na estação automatizada Fluidics Station 450 (*Affymetrix*, EUA) que foi previamente abastecida com os tampões de lavagem A e lavagem B (*Affymetrix*, EUA) mais água deionizada. Os tubos contendo os tampões de marcação 1 (500 μL), 2 (500 μL) e 800 μL de holding buffer (*Affymetrix*, EUA) que apresentam em suas formulações os elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotilado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos GeneChip® com o laser foram preparados.

Em seguida, os GeneChip® são retirados do forno de hibridização e, imediatamente, colocados (quatro por vez) na estação fluídica onde as sequências de lavagens e marcações dos microarranjos contidos nos chips por fluoróforos são automatizadas sob controle do software *Affymetrix GeneChip® Command Console™* (AGCC) versão 3.2.2 (*Affymetrix*, EUA).

3.4.8 Escaneamento dos GeneChip®, captação de imagens e análise no software Chromosome Analysis Suíte 1.2.2 (Afflymetrix®)

Os chips com microarranjos foram colocados no GeneChip® Scanner 3000 7G (*Affymetrix*, EUA), gerenciado pelo programa AGCC. As imagens geradas pela excitação dos fluoróforos (ficoeritrina) captadas pelo digitalizador foram submetidas primeiramente à análise de controle de qualidade geral (QC) por meio do programa Genotyping Console versão 3.2.2 (*Affymetrix*, EUA). A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização *Affymetrix GeneChip Viewer* (*Affymetrix*, EUA), onde também se podem verificar os controles positivos do sistema de forma a se comprovar que as condições de hibridização do microarranjo foram adequadas.

Após estes procedimentos, utilizando o software de análise Chromosome Analysis Suite (ChAS) versão 3.0 (*Affymetrix*, EUA) é possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs e perda de heterozigiosidade) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido gratuitamente no sítio do fabricante (www.Affymetrix.com) e trabalha com a interface do Microsoft Windows 7 Professional® e Windows 8.1®. Ele permite converter e normalizar os dados brutos obtidos dos diferentes níveis de fluorescência em cada sonda hibridada no chip (formatados pelo GeneChip Viewer) em arquivos “.CEL”. Estes, por sua vez, são transformados pelo ChAS em arquivos “.CYCHP”, através da combinação de algoritmos específicos, com os dados das fluorescências de cada sonda, representando cada região do genoma humano, disponíveis no banco de dados NetAffx® Genomic Annotation file NA33.1 (hg19). Este sistema de comparação de hibridação sustenta a plataforma *CytoScan™* e contém informações atualizadas dos bancos de dados genômicos Database of Genomic Variants (DGV), OMIM® e RefSeq.

Com isso, é possível visualizar pelo ChAS os dados genômicos resultantes da análise da hibridação sumarizados em forma de tabelas, gráficos e cariótipo do paciente juntamente com os dados (arquivos “.CNCHP”) da plataforma ao qual são comparados. O software permite, ainda, criar e customizar parâmetros e regiões para uma análise específica, aplicar filtros para todo o genoma ou regiões de interesse específico para remover informações não relevantes, realizar análises comparativas entre diferentes amostras, além de acessar os principais bancos de dados externos (NCBI, UCSC Genome Browser, Ensembl, OMIM®) (Figura 6)

Figura 6 - Esquema geral das etapas e dos equipamentos utilizados para a reação de CMA envolvendo as etapas da hibridação, lavagem, marcação, escaneamento, leitura e análise dos dados do GeneChip® da plataforma CytoScan® 750K Array (Affymetrix, EUA).



A plataforma *CytoScan*TMArray da Affymetrix utilizada neste estudo difere das metodologias utilizadas na primeira e segunda geração de arrays com aplicação na Genética Molecular. O conceito experimental envolvia a comparação do padrão de hibridação da amostra estudada com outra amostra controle. Naqueles sistemas, o padrão da fluorescência resultava da hibridação competitiva entre as amostras, o que refletia as diferenças quantitativas (duplicações ou deleções) ao longo do genoma. No caso da plataforma utilizada aqui, a comparação ocorre entre os dados da fluorescência da amostra testada no GeneChip® com aqueles depositados no banco de dados NetAffx® Genomic Annotation file NA33.1 (hg19) desenvolvido para a plataforma. Este por sua vez contém os dados dos mais de 750 mil marcadores genéticos (aproximadamente 500 mil para CNVs somados aos cerca de 250 mil para SNPs) obtidos da análise de 96 indivíduos normais e 284 linhagens celulares referenciadas do HapMap. O desempenho robusto da plataforma *CytoScan*TMArray permite uma ampla cobertura do genoma e confiabilidade nos dados obtidos.

Para investigar a presença de microrrearranjos cromossômicos que possam ter correlação etiológica com a mielofibrose, realizamos a CMA e somente consideramos para análise os resultados obtidos que apresentaram valores dos indicadores de qualidade do experimento próximos ou de acordo com o que é indicado pelo fabricante para uma análise consistente e confiável dos dados.

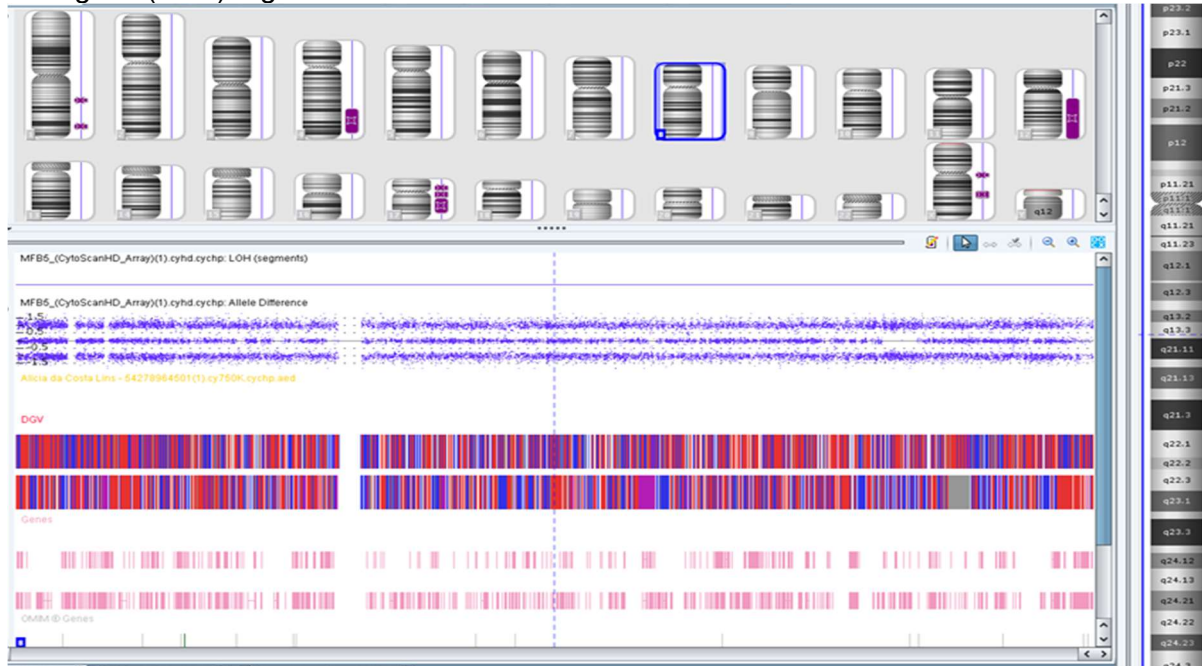
Os valores dos controles de qualidade *MAPD* (*Median Absolute Pairwise Differences*) e *SNPQC* (*Single Nucleotide Polymorphism quality control*) representam, respectivamente, uma medida global da variação de todas as sondas do *array* ao longo do genoma, através da distribuição das mudanças, em uma escala logarítmica, entre sondas adjacentes polimórficas (SNP) e não polimórficas (CN) e uma medida do nível de qualidade da genotipagem dos alelos nos dados do *array* sendo obtido a partir da perspectiva das sondas polimórficas (SNP). Outro controle de qualidade utilizado da reação é o *Waviness-SD* (*Waviness standard deviation*), que representa a medida global da variação das sondas do *array* que são insensíveis às variações de pequena amplitude e focadas nas variações de longa amplitude.

Os valores indicados pela *Affymetrix* tanto para a plataforma de alta resolução *CytoScan™HD Array*, quanto para a de menor resolução *CytoScan™750K Array* devem ser iguais ou superiores a 15 no *SNPQC*, e iguais e inferiores a 0,25 no *MAPD* e 0,12 no *Waviness SD*. Esses valores são fornecidos após análise pelo *ChAS 3.0* dos dados fornecidos pelo escaneamento do *chip* hibridado (Figura 7).

As anormalidades consideradas como mínimo: i. 50 sondas duplicadas consecutivamente, ii. 25 sondas eliminadas consecutivamente, iii. segmentos de LOH maiores que 5 Mb. Alterações menores envolvendo genes associados ao câncer também foram investigadas. As CNVs comuns foram consideradas constitucionais provavelmente benignas.

Os possíveis genes candidatos mapeados para grandes segmentos alterados foram definidos com base em genes Online Medelian Inheritance in Man (OMIM®) associados à doença, anteriormente relacionados a neoplasias mieloides e/ou outros tipos de câncer. O OMIM® é um compêndio abrangente e autoritário de genes humanos e fenótipos genéticos que está disponível gratuitamente e é atualizado diariamente. As visões gerais referenciadas em texto completo no OMIM contêm informações sobre todos os distúrbios mendelianos conhecidos e mais de 15.000 genes.

Figura 7 - Vista geral do software ChAS v.3.0 (Affymetrix, EUA) pós processamento dos dados da CMA, evidenciando na parte superior da tela o carioview com os cromossomos humanos enumerados, na parte inferior as sondas hibridadas no chip. À direita está o detalhamento do cromossomo selecionado para análise, com os dados citogenômicos da alteração encontrada no DNA do paciente evidenciados na parte inferior. As CNVs que envolvem ganho numérico são marcadas por barras de cor azul e as que envolvem perda numérica de segmentos cromossomais estão registradas em barras de cor vermelha. Por se tratar de um SNP-array é possível detectar segmentos cromossômicos com perda de heterozigose (LOH) registradas com barras de cor violeta.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizando a CMA em 16 pacientes com MF, sendo 13 pacientes com MFP e 3 MF pós TE, foram encontradas CNVs potencialmente patogênicas em cinco de 16 pacientes (31,25%) e segmentos de LOH em 10 de 16 pacientes (62,5%), listados na Tabela 3. Foram encontrados um total de 16 CNVs, na maioria deleções, sendo 9 encontradas em um único paciente (Paciente 4), dois pacientes tiveram uma deleção (pacientes 7 e 9) e o paciente 2 tinha 3 deleções. Em dois pacientes encontramos duas duplicações (pacientes 2 e 3). Quatro pacientes (Pacientes 2,4,7 e 9) apresentaram tanto CNVs quanto segmentos de LOH. A CMA não identificou nenhuma alteração em cinco dos 16 pacientes estudados (8,10, 11, 13 e 16). Em relação às CNVs os tamanhos foram de 71kb a 36 Mb, com mediana de 4,639 Mb. Oito tiveram tamanhos menores do que 5 Mb e nove com tamanhos maiores do que 5 Mb (Tabela 3).

Em relação as LOHs foram encontradas 48 segmentos de LOHs, distribuídos em 10 pacientes, variando de 1 a 16 segmentos de LOH por indivíduo, conforme tabela 3. Seis pacientes tiveram apenas LOH sem qualquer CNVs (pacientes 1,5,6,12, 14 e 15). Um paciente apresentou uma única LOH (paciente 5) e em 3 pacientes a LOH estava em mosaico (pacientes 2,4 e 6). As LOHs tiveram o tamanho 5-77776 mb, com mediana de 11964 mb. Apenas LOH maiores que 5Mb foram consideradas na análise, listados na tabela 3.

Em nosso trabalho, pela técnica de CMA, foram encontrados rearranjos cromossômicos envolvendo um total de 6.196 genes. Como a maioria dos pacientes apresentou várias alterações maiores, propusemos como candidatos os genes anteriormente associados a neoplasias hematológicas e outros tipos de câncer. Sessenta nove genes associados ao câncer foram identificados, 17 deles descritos anteriormente em neoplasias hematológicas e listados na tabela 3.

Os resultados dos cariótipos de aspirado de medula óssea revelaram anormalidades citogenéticas em 3/16 (18,75%) pacientes com MFP, sendo uma trissomia do cromossomo 8 (paciente 3), uma deleção parcial do cromossomo 13q (paciente 2) e o terceiro apresentava um cariótipo complexo envolvendo os cromossomos 7,12 e 20 (paciente 4) (Tabela 3). Nenhum paciente com MF pós TE teve alteração ao cariótipo.

Dados de mutações *driver* foram obtidos de trabalho anterior do grupo a fim de verificarmos se havia correlação entre as alterações cromossômicas e as mutações *driver* identificadas. Dezesesseis indivíduos analisados, 18,75% (3 pacientes) apresentaram a mutação *JAK2V617F*, 56,25% (9 pacientes) uma mutação do éxon 9 da *CALR*, sendo 6 por deleção e 3 por inserção e 6,25% (1 paciente) um para mutação *MPL* e 18,75% (3 pacientes) não apresentavam nenhuma mutação, sendo, portanto, triplo negativos, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Alterações genômicas identificadas por cariótipo e CMA em pacientes com mielofibrose primária e MF pós TE. A extensão x1 (deleção), x3 (duplicação) e hmz (perda de heterozigose).

Pacientes	Idade	Sexo	Tipo de MF	Resultados CMA	Cariotipo	Gens mapeados para cancer	Tamanho (Mb)	Mutações drives
1	84	F	Primária	1q24.2q25.2(170,365,327-176,346,512) hmz	46, XX	<i>FASLG</i>	5.981	<i>JAK2</i>
				1q41q42.13(222,161,988-229,516,511) hmz			7.355	
				4q28.3q34.3(133,645,289-179,928,406)hmz		<i>TLR2, PALLD</i>	46.283	
				12q13.2q24.33(56,002,232-133,778,166)hmz		<i>CDK4, SRGAP1, SH2B3, ALDH2, PTPN11, POLE1</i>	77.776	
				17q21.2q24.3(39,624,325-69,311,217)hmz		<i>STAT5B, BRCA1, PHB, NME1, MPO, RAD51C, PPM1D, BRIPI, PRKCA e PRKAR1A</i>	29.687	
				17p12p11.1(13,675,000-22,217,883) hmz			8.543	
			17q11.1q12(25,309,336-36,049,552)hmz		<i>NF1, RAD51D e HNF1B</i>	10.740		
			Xq21.33q23(97,629,749-111,888,527) hmz			14.259		
2	62	F	Primária	1p22.3p13.1(86,010,458-116,805,160)hmz	46, XX <i>Del(13)</i>	<i>RBM15, NRAS</i>	30.795	<i>MPL</i>
				11p15.5p12(372,355-41,907,116) mos hmz		<i>LMO1, LMO2, RRAS2 e SLC22A1L</i>	331	
				12q24.31(122,161,101-122,266,479)x1		<i>SETD1B</i>	109	
				13q13.1q21.33(33,571,752-69,638,023)x1		<i>KL, FOXO1A, RB1</i>	36.066	
				14q12(27,970,825-29,004,858)x3		<i>LINC00645 (MIR3171)</i>	1.034	
				19q13.33(49,274,808-49,513,502)x1			239	
3	61	F	Primária	Trisomy 8	46,XX +8		146.138	<i>CALR.del</i>
				3p26.2p24.3(3,807,650-22,204,563) hmz	46, XX del(7)(q22), add(20)(q)(18), 46,XX, del(12)(q21),	<i>OGG1, VHL</i>	18.397	<i>CALR.del</i>

					add(20)(q)[10], 46,XX, add(20)(q)(18) 46,XX, del(7)(q22, del(12)(q21), add(20)(q)(2)			
4	48	F	Primária	7p22.3p22.1(861,359-5,499,980)x1 7p14.1p11.2(38,652,686-56,755,583)x1 7q22.3q31.2(107,395,740-116,562,288)x1 7q22.1q22.3(101,428,262-105,113,953)x1 7q31.32q32.1(122,748,812-127,779,114)x1 7q32.3q36.3(131,769,117-158,848,820) mos hmz 12p13.2p12.3(12,109,324-18,729,898)x1 12q21.2(76,448,583-80,275,907)x1 12q21.31q22(81,467,393-95,908,234)x1 18q11.2q12.1(24,767,485-32,456,354) hmz 20q13.13q13.2(47,848,257-53,158,589)x1		<i>MAD1L1</i> <i>EGFR</i> <i>POT1</i> <i>BRAF</i> <i>CDKN1B</i>	4.639 18.103 9.167 3.686 5.030 27 7.000 4.000 14.441 8.000 5.310	
5	68	M	Primária	11q24.1q25(121,768,985-132,498,284)hmz	46, XY	<i>OPCML</i>	10.729	CALR.del
6	59	M	Primária	1p36.33p21.1(849,466-26,290,550)mos hmz	46, XY	<i>MUTYIT e TAL1</i>	823	Triplo negativo
7	47	F	Primária	1p12p11.2(120,553,551-120,624,056)x1	46, XX	<i>NOTCH2</i>	71	CALR.inst
9	46	F	Primária	1p35.2p34.2(30,478,995-43,548,398)hmz 9q33.1q33.2(117,808,079-124,657,456) hmz 11q23.3q24.3(120,972,517-128,650,029) hmz 13q14.13q14.2(46,722,034-49,139,504)x1 Xq22.1q22.3(99,700,785-106,311,924) hmz	46, XX	<i>RSPO1</i> <i>RB1</i>	13.069 6.849 7.648 2.417 6.611	Triplo negativo

				4p15.32p15.1(17,707,300-30,328,979)hmz	46, XY		12.622	JAK2
12	66	M	MF pos- Pós-TE	5q35.1q35.3(171,766,824-180,692,321) hmz			8.925	
				9p24.3p13.3(216,123-34,431,079)hmz		JAK2,MTAP, CDKN2A	34.215	
				12q22q23.2(95,963,706-102,978,696) hmz			7.015	
				19p13.3p13.12(260,911-14,742,924)hmz		STK11,SMARCA4,CALR, LYL1	14.482	
				22q11.1q11.22(16,888,899-23,275,341) hmz			6.386	
					46,XY			
				2p13.1p11.2(74,139,628-89,129,064)hmz			14.989	JAK2
				2q11.1q11.2(95,341,387-101,398,842) hmz			6.057	
14	69	M	Primária	6q22.31q23.2(122,165,276- 134,129,708)hmz			11.964	
				7q31.32q36.3(122,153,555- 155,964,676)hmz		POT1,SMOH, BRAF	33.811	
				7p14.1p12.1(42,706,992-51,910,082) hmz			9.203	
				11p14.3p13(24,549,526-35,437,736)hmz		LMO2	10.888	
				13q32.3q33.2(101,421,368-106,561,799) hmz			5.140	
					46,XX			
				1p33p31.1(47,858,053-69,907,944)hmz			22.050	CALR.del
				2p13.2q13(71,835,787-113,889,134)hmz		TMEM127,BUB1,IL1B, ILRN	42.053	
				2q11.1q13(95,341,387-113,889,134) hmz			18.548	
				3q11.1q22.1(93,536,053-131,849,410) hmz			38.313	
				3p13p11.1(72,568,037-90,485,635) hmz		GATA2	17.918	
15	48	F	Primária	6p22.3p12.3(15,735,087-49,880,005)hmz		DEK, G6B	34.145	
				7q21.11q22.1(83,470,313-103,219,027)hmz			19.749	
				9q33.1q33.2(120,027,912-125,306,402) hmz			5.278	
				10q25.1q26.13(107,670,340- 124,523,169)hmz		MX11	16.853	
				11q12.1q13.5(56,930,833-76,123,829)hmz		CCNDI, NUMA1	19.193	
				11p11.2p11.12(46,304,337-51,563,636) hmz			5.259	

15q14q21.3(39,625,545-57,874,494)hmz	<i>BUB1B</i>	18.249
16p13.2p13.11(9,182,576-16,159,628) hmz		6.977
Xp11.3p11.1(43,815,818-58,337,890) hmz		14.522
Xp21.1p11.4(34,218,865-40,790,309) hmz		6.571
Xq11.1q13.1(61,932,503-68,422,477) hmz		6.490

8	57	M	MF pos Pós-TE	Sem alterações	46, XY	CALR.del
10	81	M	Primária	Sem alterações	46, XY	Triplo negativo
11	67	F	MF pos TE	Sem alterações	46, XX	CALR.inst
13	38	M	Primaria	Sem alterações	46, XY	CALR. Inst
16	35	M	Primaria	Sem alterações	46, XY	CARL.Del

4.1. PACIENTE 1

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 84

Cariótipo: 46, XX

Mutação *driver*: Positivo para *JAK2*

Tabela 4. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 1.

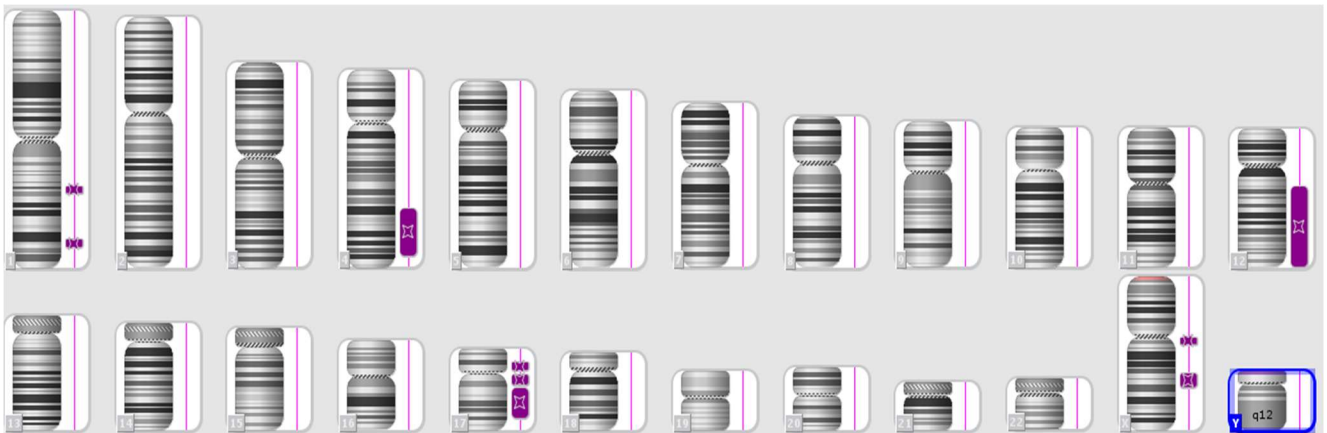
Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1q24.2q25.2 (170,365,327-176,346,512) hmz	28	<i>FASLG</i>
1q41q42.13(222,161,988-229,516,511)hmz	40	
4q28.3q34.3(133,645,289-179,928,406)hmz	101	<i>TLR2 e PALLD</i>
12q13.2q24.33(56,002,232-133,778,166) hmz	380	<i>CDK4, SRGAPI, SH2B3, ALDH2, PTPN11 e POLEI</i>
17q21.2q24.3(39,624,325-69,311,217)hmz	287	<i>STAT5B, BRCA1, PHB, NME1, MPO, RAD51C e PPM1D</i>
17p12p11.1(13,675,000-22,217,883)hmz	53	
17q11.1q12(25,309,336-36,049,552)hmz	113	<i>NF1, RAD51D e HNF18</i>
Xq21.33q23(97,629,749-111,888,527) hmz	66	

No paciente 1 foram encontradas 8 LOHs nos cromossomos 1,4,12,17 e X, identificadas na figura 8. Na LOH no cromossomo 12, na posição genômica ch12:56,002,232-133,778,166 na região 12q13.2q24.33 estão mapeados os genes SH2B3 (LNK) e PTPN11. O gene SH2B3 codifica uma proteína envolvida na sinalização e regulação da ativação da JAK2 (tefferi e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017).

Já a mutação somática do gene *PTPN11* ativa a desregulação da via de sinalização *RAS* que está envolvida na patogênese da leucemia mielomonocítica juvenil, mas que na MFP é um gene novo, também descrito por Brecqueville e cols (2014).

Dessa forma, a presença do gene SH2B3 na MFO pode estar implicado no aparecimento da doença ou quando está associado a JAK2 ou CARL pode amplificar a patogenicidade destas mutações, enquanto que a presença do PTPN11 esta associada a progressão da doença para a fase blástica (Brecqueville e cols, 2014; Tefferi e cols, 2016; vainchenker e Hralovics, 2017).

Figura 8 - Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pelo CMA nos cromossomos 1,4 12,17 e X do paciente 1.



No mesmo paciente observamos LOH no cromossomo 17, na posição genômica ch17: 25,309,336, na região 17q11.1q12 o gene *NF1* esta envolvido na progressão para a fase blástica em pacientes com MF. Mutação no gene *NF1* pode ocorrer de forma mutuamente exclusiva ou também na presença da mutação *JAK2* como no caso deste paciente (Brecqueville e cols, 2014; Vainchenker e Kralovics, 2017). Também encontramos no cromossomo 17, na posição genômica ch17:39,624,325-69,311,217, na região 17q21.2q24.3 o gene *STAT5B*, proteína codificadora, que apresenta um importante papel na transdução de sinais e ativação dos fatores transcrpcionais na leucemia promielocítica aguda (Chen e cols, 2018).

Outros genes mapeados nos cromossomos ch1: 170,365,327-176,346,512, na região 1q24.2q25.2 (*FASLG*), ch4: 133,645,289-179,928,406, na região 4q28.3q34.3 (*TLR2* e *PALLD*), ch12: 56,002,232-133,778,166, região 12q13.2q24.33 (*CDK4*, *SRGAPI*, *ALDH2*, *POLEI*), ch17: 39,624,325-69,311,217, região 17q21.2q24.3 (*BRCA1*, *PHB*, *NME1*, *MPO*, *RAD51C*, *PPM1D*) e no ch17: 25,309,336-36,049,552, na região 17q11.1q12 (*RAD51D* e *HNF18*) foram previamente associados a outros tipos de cânceres, como pulmão, colorretal, pancreático, melanoma e esôfago e seu papel na MF ainda não é conhecido. (Lee e cols, 2013; Proença e cols, 2015; Teh e cols, 2016; Welinsky e Lucas, 2017; YK e cols, 2017).

4.2. PACIENTE 2

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 62

Cariótipo: 46, XX, del(13)

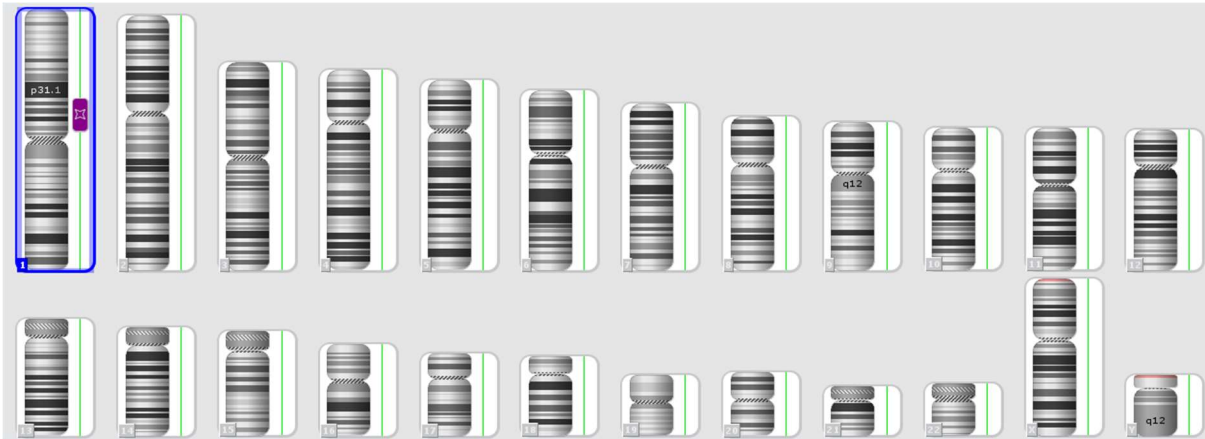
Mutação *driver*: Positivo para *MPL*

Tabela 5. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 2.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1p22.3p13.1(86,010,458-116,805,160)hmz	156	<i>RBM15</i> e <i>NRAS</i>
11p15.5p12(372,355-41,907,116) mos hmz	419	<i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> , <i>RRAS2</i> e <i>SLC22A1L</i>
12q24.31(122,161,101-122,266,479)x1	5	<i>SETD1B</i>
13q13.1q21.33(33,571,752-69,638,023)x1	85	<i>KL</i> , <i>FOX01A</i> e <i>RB1</i>
14q12(27,970,825-29,004,858)x3	1	<i>LINC00645 (MIR3171)</i>
19q13.33(49,274,808-49,513,502)x1	11	0

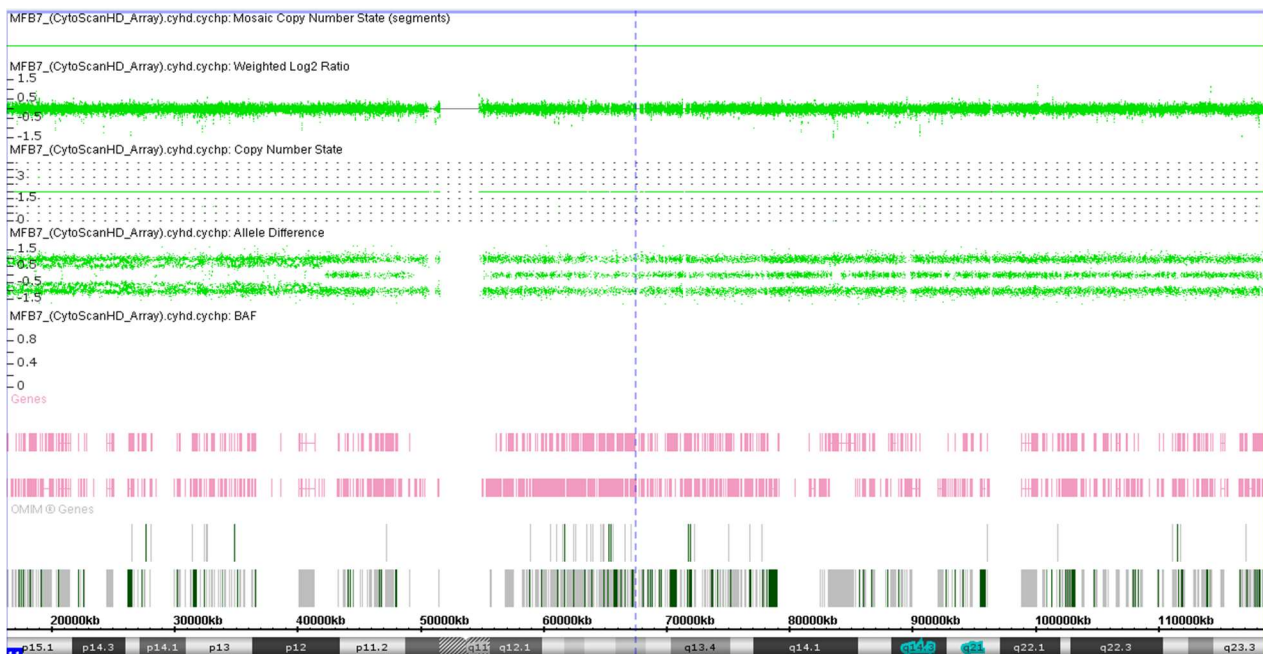
A paciente 2 apresentou LOH no cromossomo 1, listado na figura 9, na posição genômica 86,010,458-116,805,160, na região 1p22.3p13.1 estão mapeados os genes *RBM15* e *NRAS*. O gene *RBM15* é gene regulador da diferenciação dos megacariócitos e quando presente nas NMPs pode estar envolvido no processo de trombose nas neoplasias mieloproliferativas (Tran e cols,2016), conforme figura 9. Já o *NRAS*, é uma molécula de sinalização e quando presente na MFP está envolvido na progressão da doença para a fase blástica (Brecqueville e cols, 2014; Vainchenker e Kralovics, 2017).

Figura 9 - Visualização pelo chAs da perda de heterozigose (barra roxa) detectada pelo CMA no cromossomo 1 do paciente 2.



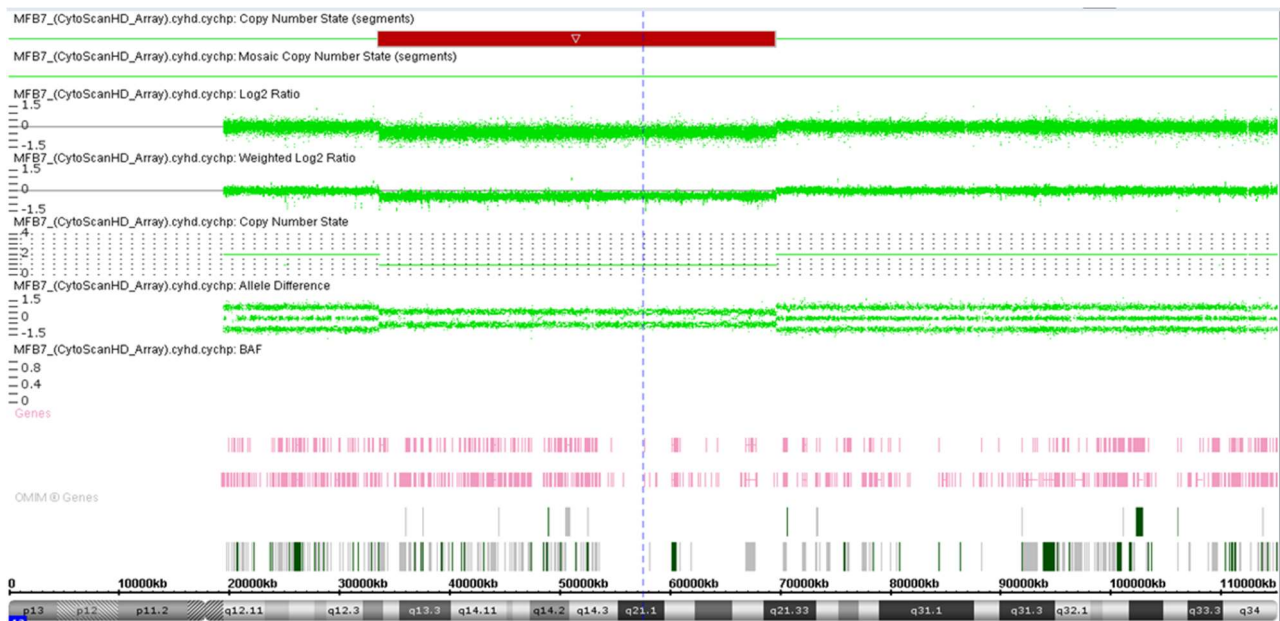
Também encontramos no cromossomo 11 um segmento de LOH em mosaico (Figura 10). Nesse segmentos estão mapeados os genes *LMO1* e *LOM2*, fatores transcricionais importantes na regulação dos timocitos duplo positivos e envolvidos na leucemia linfóide aguda do tipo T (Li e cols, 2017). Também encontramos nesta região os genes *RRAS2* e *SLC22A1L* descritos em câncer no sistema nervoso central e mama (Erlandsson e cols, 2017).

Figura 10 - Visualização pelo chAs do mosaicismo detectada pela CMA no cromossomo 11 do paciente 2.



Na paciente foi identificada também uma deleção do ch13: 33,571,752-69,638,023, na região 13q13.1q21.33 (figura 11) que inclui o gene *RB1*. Este é um gene supressor tumoral, que produz a proteína *pRB* que ajuda as células a desacelerarem seu crescimento e influencia a presença de cânceres (Ewens cols, 2017).

Figura 11 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 13 do paciente 2.



Outros genes candidatos estão mapeados na região 12q24.31 (*SETD1B*), 13q13.1q21.33 (*KL*, *FOXO1A*) e na duplicação 14q12 (Figura 12) (*LINC00645* (*MIR3171*)). Esta duplicação ainda não foi descrita na MFP e não se sabe se influencia na progressão da doença. Nesse segmento está mapeado um único gene que codifica um microRNA de papel desconhecido. Na região de deleção 19q13.33 (Figura 13) estão mapeados 11 genes OMIM, mas nenhum associado a neoplasia. Também encontramos os gene *LMO1* e *LOM2*, proteínas reguladoras transcricionais, na posição genômica ch11: 372,355-41,907,116, na região 11p15.5p12 importante na regulação dos timocitos duplo positivos e envolvidos na leucemia linfóide aguda do tipo T (Li e cols, 2017)

Figura 12 - Visualização pelo chAs da microduplicação (barra azul) detectada pela CMA no cromossomo 14 do paciente 2.

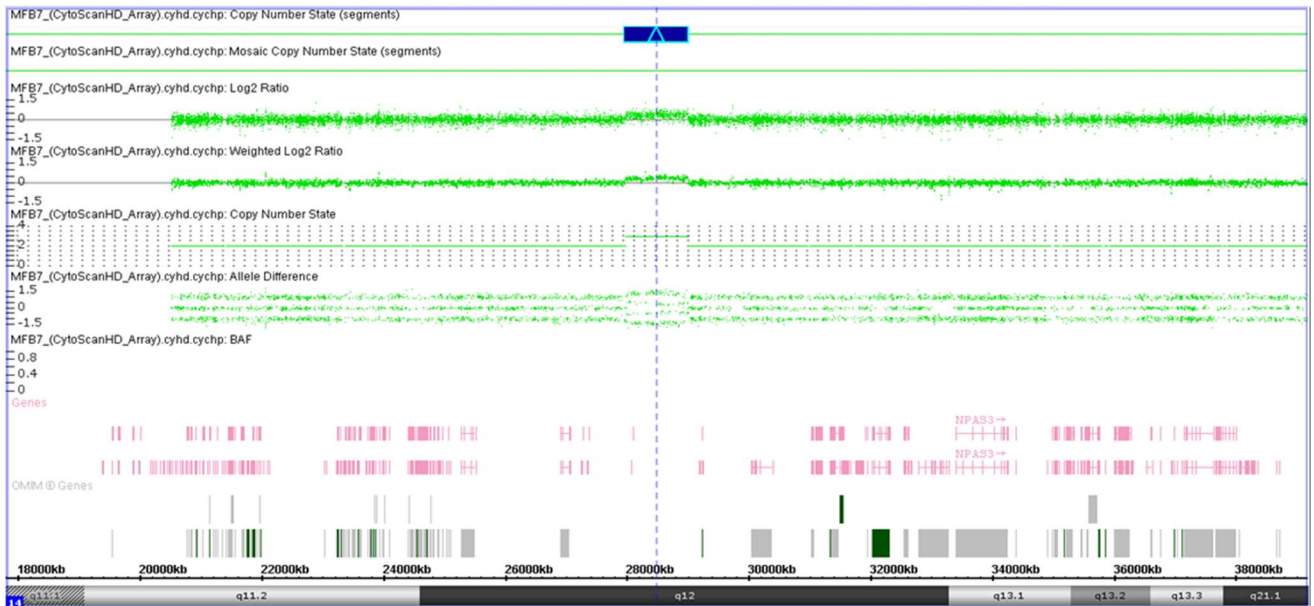
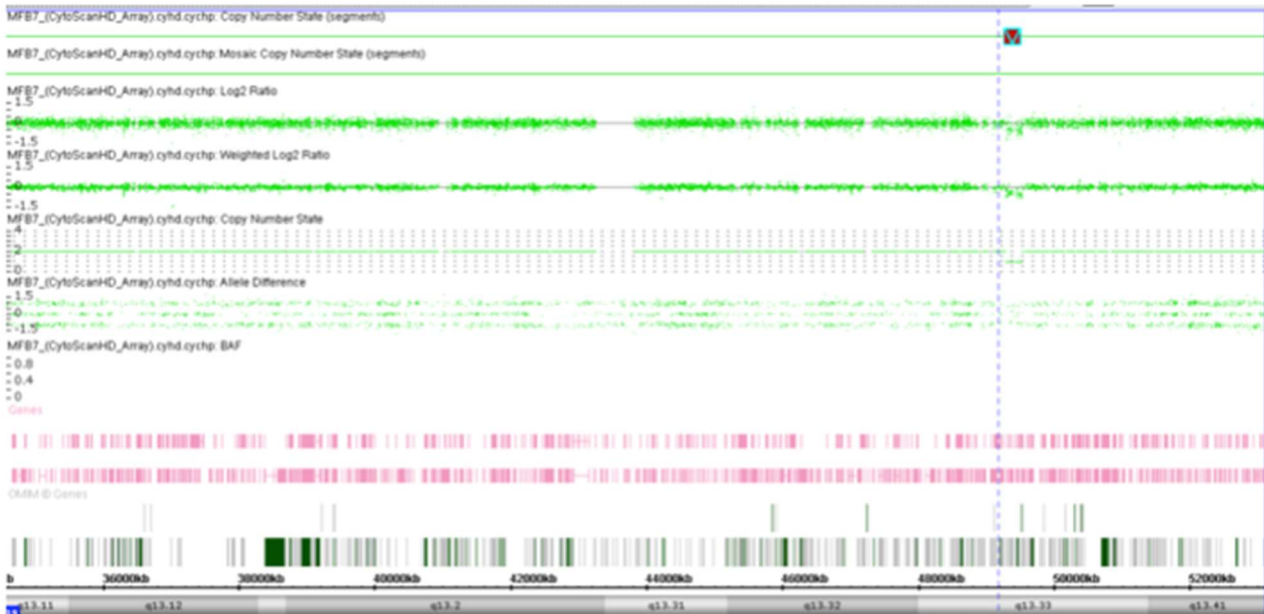


Figura 13 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra escuro) detectada pela CMA no cromossomo 19 do paciente 2.



4.3. PACIENTE 3

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 61

Cariótipo: 46, XX, +8

Mutação *driver*: Positivo para *CALR.del*

Resultado CMA: Trissomia 8

Tabela 6. Resultados do CMA e genes maepados e candidatos no OMIM no paciente 3.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
Trissomia 8	481	nenhum

A paciente 3 apresentou uma trissomia 8 (Figura 14) com 481 genes mapeados no *OMIM*, entretanto nenhum associado a neoplasias hematológicas. A trissomia 8 encontrada neste paciente está relacionado aos escores de prognóstico, DIPPS plus, associado a um cariótipo desfavorável na mielofibrose (Visani e cols, 2011; Brecqueville e cols, 2014; Thoennissen e cols, 2016). Apesar de ser um rearranjo recorrente na MF nenhum gene foi apontado como candidato a participar da patogênese da MF até o momento.

Figura 14 - Visualização pelo chAS da microduplicação (barra azul escuro) detectada pela CMA no cromossomo 8 do paciente 3.



4.4.PACIENTE 4

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 48

Cariótipo: 46, XX del(7)(q22), add(20)(q)(18),46,XX, del(12)(q21), add(20)(q)[10], 46,XX, add(20)(q)(18), 46,XX, del(7)(q22), del(12)(q21), add(20)(q)(2)

Mutação driver: *CALR.del*

Tabela 7. Resultados do CMA e genes maepados e candidatos no OMIM no paciente 4.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
3p26.2p24.3(3,807,650-22,204,563)hmz	75	<i>OGG1, VHL</i>
7p22.3p22.1(861,359-5,499,980) x1	29	<i>MAD1L1</i>
7p14.1p11.2(38,652,686-56,755,583)x1	33	<i>EGFR</i>
7q22.3q31.2(107,395,740-116,562,288)x1	22	
7q22.1q22.3(101,428,262-105,113,953)x1	20	
7q31.32q32.1(122,748,812-127,779,114)x1	14	<i>POT1</i>
7q32.3q36.3(131,769,117-158,848,820) mos hmz	235	<i>BRAF</i>
12p13.2p12.3(12,109,324-18,729,898)x1	28	<i>CDKN1B</i>

A paciente 4 apresentou na região 3p26.2p24.3, mostrada na figura 15, onde estão os genes *OGG1* e *VHL*, que são envolvidos no reparo de DNA. Eles codificam DNA glicosilases que têm como função remover as bases oxidadas erroneamente pareadas e já foram descritos no câncer colorretal (Nascimento e cols, 2017).

Também tivemos a confirmação de um cariótipo complexo envolvendo os cromossomos 7,12 e 20 na cariotipagem convencional e na análise por CMA, segundo o GPSS o cariótipo complexo esta associado a um risco citogenético desfavorável (Tefferi e cols, 2014), figura 16.

Figura 15 - Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectada pela CMA no cromossomo 3 do paciente 4.

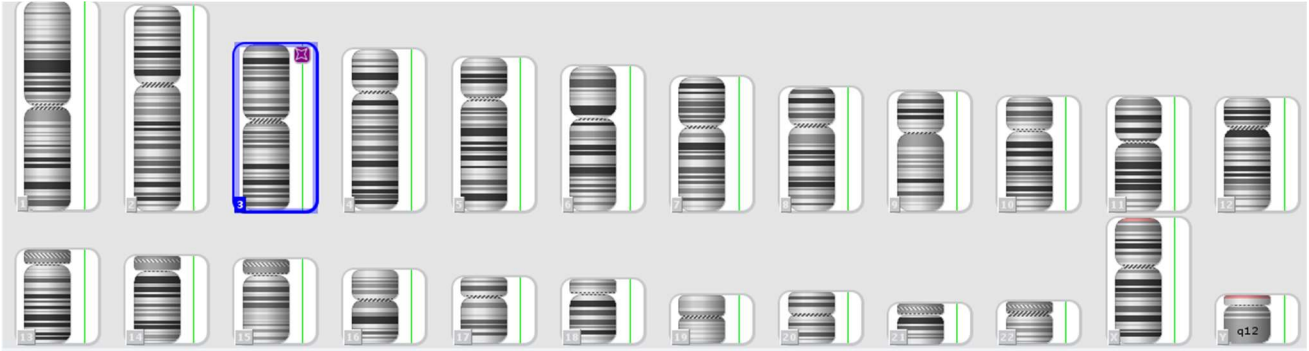


Figura 16 - Visualização pelo chAS das microdeleções (barra vermelha) detectadas pela CMA nos cromossomos 7,12 e 20 do paciente 4.

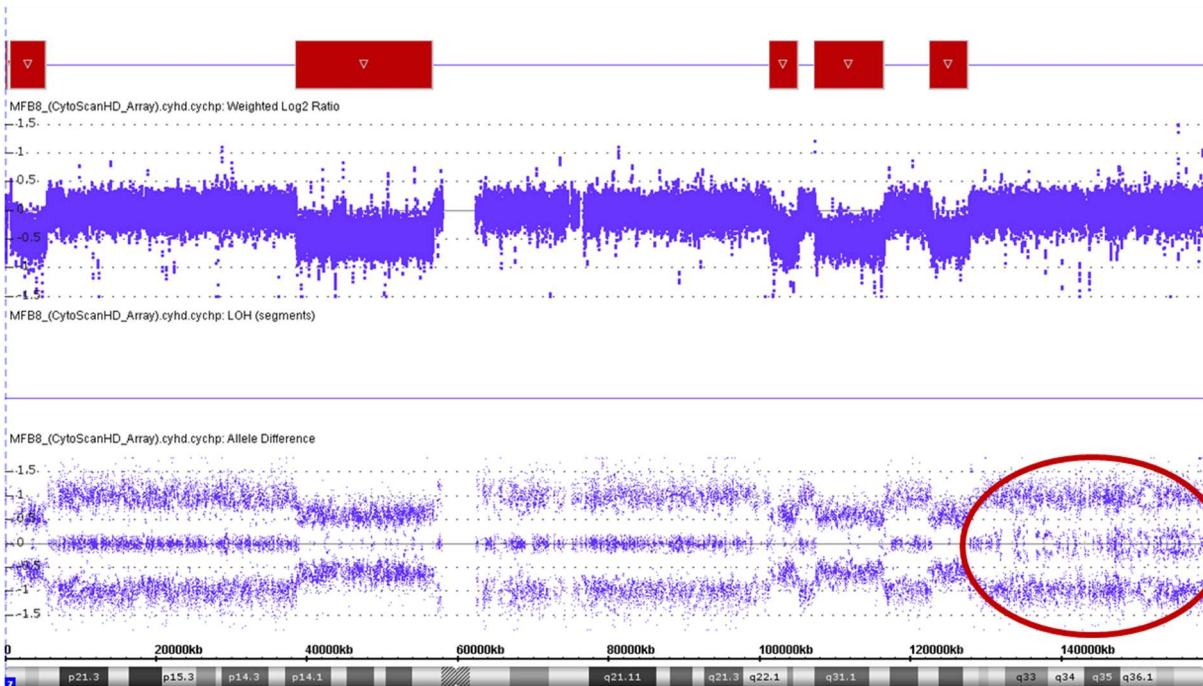


No cromossomo 7 na região 7p22.3p22.1, foi mapeado o gene *MAD1L1*. Este é gene de ponto de controle, cuja desregulação está associada à instabilidade cromossômica. Mutações raras neste gene foram relatadas em linfoma, cólon e câncer de pulmão (Tsukasaki e cols, 2001).

Na região 7p14.1p11.2 foi identificado o gene *EGFR*, um receptor do fator de crescimento epidermal, já descrito mutado em pacientes com câncer de pulmão (Lindeman e cols, 2013). Também no cromossomo 7, na região 7q31.32q32.1 o gene *POT1* foi descrito mutado em pacientes com melanoma (Espinoza e cols, 2014). No cromossomo 12 na região 12p13.2p12.3 está mapeado o gene *CDKN1B*, gene que regula a proliferação dos linfócitos T (Teh e cols, 2016).

Nesse caso foi também identificado um segmento de LOH em mosaico (figura 17) na posição genômica 131,769,117-158,848,820, região 7q32.3q36.3. Nesse segmento destaca-se o gene *BRAF*, uma proteína quinase, encontrada mutada em adenocarcinoma (Marranci e cols, 2017).

Figura 17 - Visualização pelo chAS da análise por CMA do cromossomo 7 da paciente 4. Os retângulos vermelhos representam os segmentos deletados. O círculo vermelho indica o segmento de perda de heterozigose em mosaico.



4.5 PACIENTE 5

Sexo: M

MF: Primária

Idade: 68

Cariótipo: 46, XY

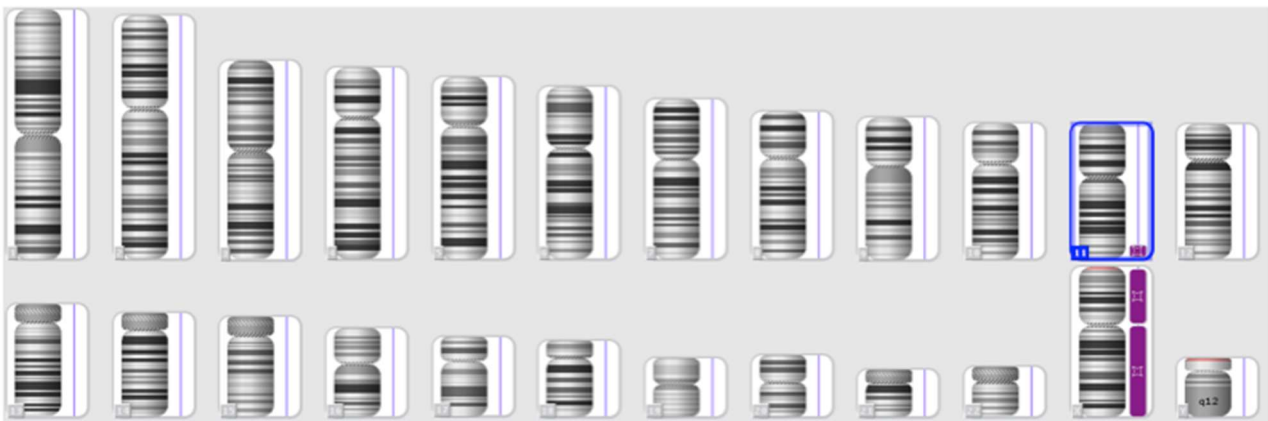
Mutação driver: *CALR.del*

Tabela 8. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 5.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
11q24.1q25(121,768,985-132,498,284)hmz	53	<i>OPCML</i>

O paciente 5 teve a presença de uma LOH única no cromossomo 11 na região 11q24.1q25 (figura 18) onde está mapeado o gene *OPCML*, uma proteína de adesão celular, já descrita em pacientes com câncer no ovário (McKie e cols, 2012).

Figura 18 – Visualização pelo chAS da perda de heterozigose (barra roxa) detectada pela CMA no cromossomo 11 do paciente 5.



4.6.PACIENTE 6

Sexo: M

MF: Primária

Idade: 59

Cariótipo: 46, XY

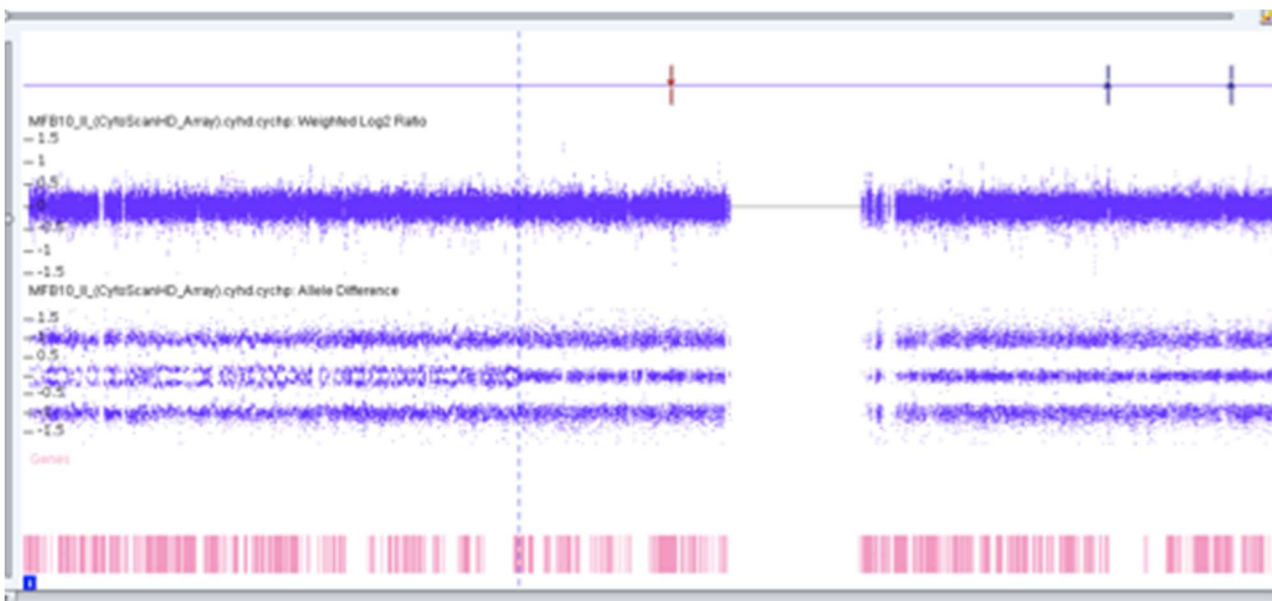
Mutação *driver*: Triplo negativo

Tabela 9. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 6.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1p36.33p21.1(849,466-26,290,550)mos hmz	538	<i>MUTYH</i> e <i>TAL1</i>

O paciente 6 teve apenas uma LOH em mosaico no cromossomo 1 (figura 19) na posição genômica ch1: 849,466-26,290,550, na região 1p36.33p21.1 onde encontra-se mapeado o gene *TAL1*. O gene *TAL1* é um fator transcricional oncogênico que aumenta a apoptose e pode estar envolvido no desenvolvimento da leucemia linfóide aguda do tipo T (Benyoucef e cols, 2016). Também encontramos os genes *MUTYH*. O gene *MUTYH* está envolvido no eparo do DNA e descrito no câncer colorretal (Nascimento e cols, 2017).

Figura 20 – Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 1 do paciente 7.



4.7. PACIENTE 7

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 47

Cariótipo: 46, XX

Mutação driver: *CALR.inst*

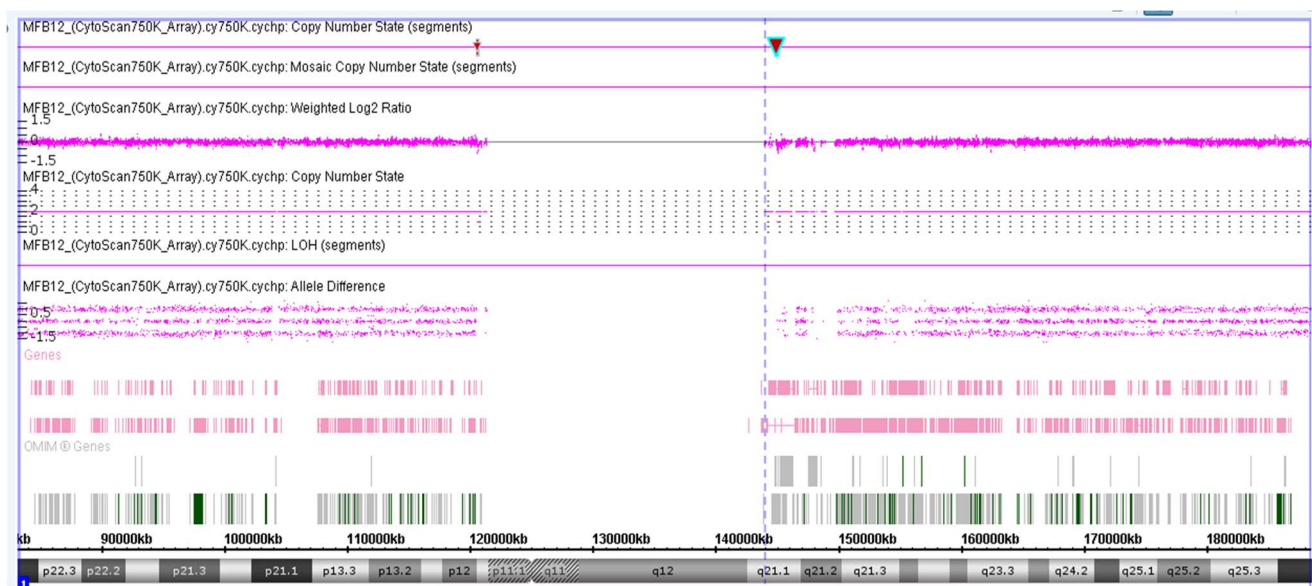
Tabela 10. Resultados do CMA e genes maepados e candidatos no OMIM no paciente 7.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1p12p11.2(120,553,551-120,624,056)x1	1	<i>NOTCH2</i>

A paciente 7 teve a menor deleção (figura 20) encontrada em nosso estudo, de apenas 71 kb na posição genômica ch1: 120,553,551-120,624,056, na região 1p12p11.2 que inclui o gene *NOTCH2*. O gene *NOTCH2*, fator do spliceossoma, é essencial para a proliferação e diferenciação celular (Ranganathan e cols, 2011).

Uma via de *Notch* desregulada é encontrada em vários tipos de câncer, como leucemia de células T, mama e câncer de próstata (Yuan e cols, 2014).

Figura 20- Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 1 do paciente 7.



4.8 PACIENTE 8**Sexo:** M**MF:** Pós-TE**Idade:** 57**Cariótipo:** 46, XY**Mutação *driver*:** *CALR.del***Resultado CMA:** Normal

4.9 PACIENTE 9

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 46

Cariótipo: 46, XX

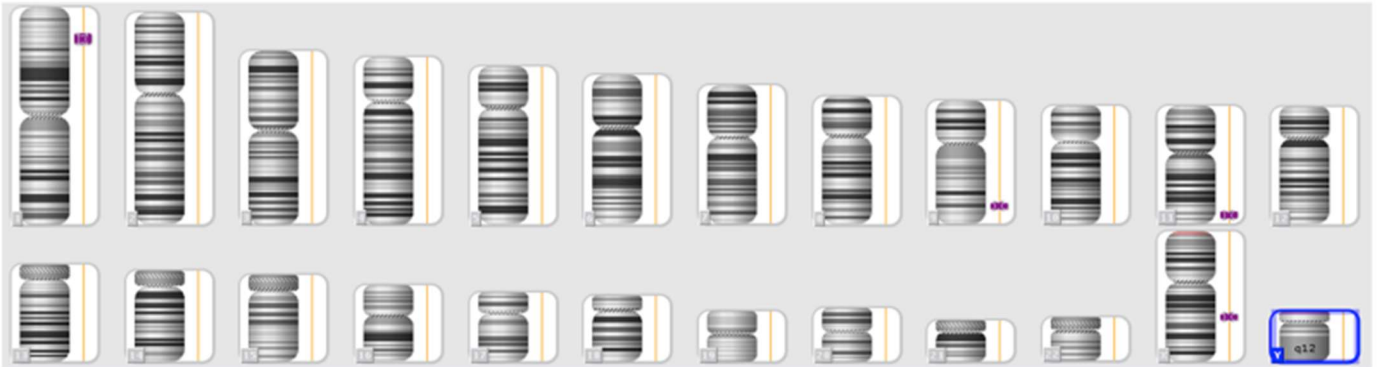
Mutação *driver*: Triplo negativo

Tabela 11. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 9.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1p35.2p34.2(30,478,995-43,548,398)hmz	112	<i>RSP01</i>
9q33.1q33.2(117,808,079-124,657,456) hmz	21	
11q23.3q24.3(120,972,517-128,650,029) hmz	44	
13q14.13q14.2(46,722,034-49,139,504)x1)	11	<i>RB1</i>
Xq22.1q22.3(99,700,785-106,311,924) hmz)	44	

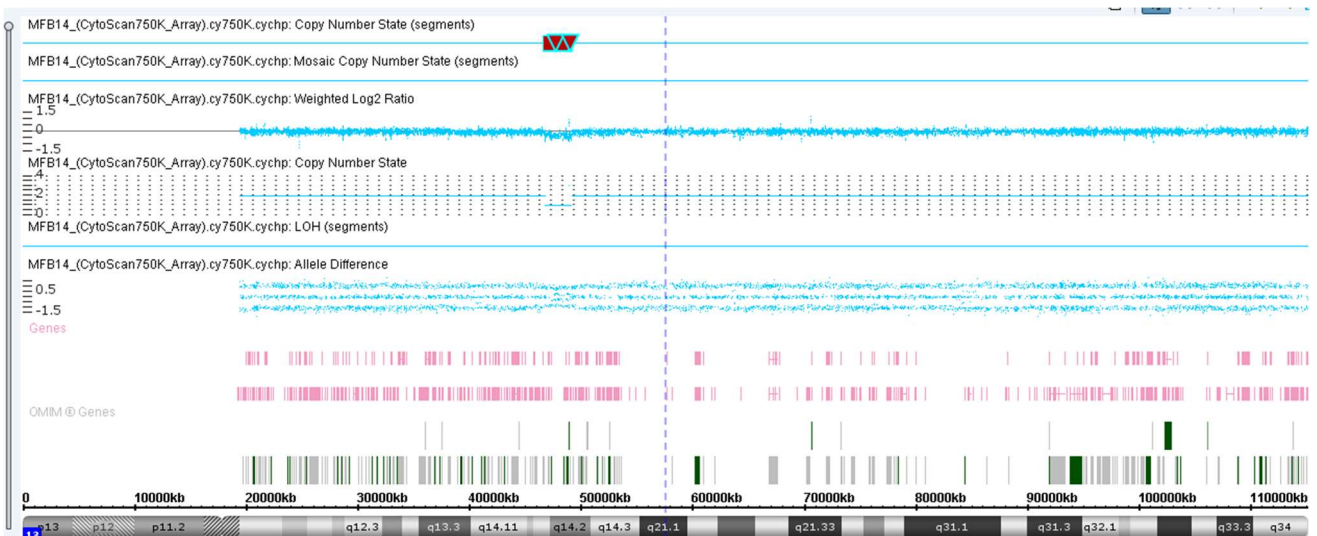
A paciente 9 apresentou 4 LOHs encontradas nos cromossomos 1,9,11, e X (figura 22). A LOH no cromossomo 1 na região 1p35.2p34.2 inclui o gene *RSP01*, um gene necessário para o desenvolvimento inicial das gônadas (Chassot e cols,2011)

Figura 22 - Visualização pelo chAs das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 1, 9, 11 e X do paciente 9.



Também encontramos na deleção do 13q (Figura 23) na região 13q14.13q14.2 o gene *RB1*, como um gene supressor tumoral que influencia o tumor de retinoblastoma (Ewens cols, 2017).

Figura 23 - Visualização pelo chAS da microdeleção (barra vermelha) detectada pela CMA no cromossomo 13 do paciente 9.



4.10 PACIENTE 10**Sexo:** M**MF:** primária**Idade:** 67**Cariótipo:** 46, XY**Resultado CMA:** normal**Genes candidatos:** nenhum

4.11 PACIENTE 11**Sexo:** F**MF:** Pós-TE**Idade:** 67**Cariótipo:** 46, XX**Mutação *driver*:** *CALR.inst***Resultado CMA:** Normal**Genes candidatos:** Nenhum

4.12.PACIENTE 12

Sexo: M

MF: Pós-TE

Idade: 66

Cariótipo: 46, XY

Mutação *driver*: Positivo *JAK2*

Tabela 12. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 12.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados no segmentos	Genes candidatos selecionados
4p15.32p15.1(17,707,300-30,328,979) hmz	18	
5q35.1q35.3(171,766,824-180,692,321) hmz	64	
9p24.3p13.3(16,123-34,431,079)hmz	104	<i>JAK2, MTAP e CDKN2A</i>
12q22q23.2(95,963,706-102,978,696) hmz	28	
19p13.3p13.12(260,911-14,742,924)hmz	302	<i>STK11, SMARCA4, CALR e LYL1</i>
22q11.1q11.22(16,888,899-23,275,341) hmz	63	

O paciente 12 teve a presença de 6 LOHs encontradas nos cromossomos 4,5,9,12,19 e 22 (figura 24). A LOH encontrada no cromossomo 9, na posição genômica ch9: 16,123-34,431,079), na região 9p24.3p13.3 inclui os genes mapeados *JAK2*, *MTAP* e *CDKN2A*. Uma carga alélica elevada da mutação *JAK2V617F* que deriva da presença da LOH no cromossomo 9p, faz com que esta mutação passe de heterozigose para homozigose nas NMPs e isto pode estar relacionado a progressão da doença, levando a um prognóstico ruim (Rumi e cols, 2011; Salati e cols, 2016; Vainchenker e Kralovics, 2017). Já os genes *MTAP* e *CDKN2A* foram descritos, respectivamente, no osteosarcoma e melanoma. (Zhi e cols, 2016; De Simone e cols, 2017).

Também no paciente 12 na LOH 19p, na posição genômica 260,911-14,742,924, na região 19p13.3p13.12 estão mapeados os genes *STK11*, *SMARCA4*, *CALR* e *LYL1*. O gene *CALR* não estava mutado no paciente uma vez que as mutações são mutuamente exclusivas, pois, o paciente apresentou positivo na mutação *JAK2* (Vainchenker e Kralovics, 2017). Foi encontrado o gene *LYL1* (19p13.3p13.12) que codifica uma oncoproteína que já descrito na leicemia linfóide aguda do tipo T e associado a um prognóstico ruim (Zohren e cols, 2013). O gene *STK11* é um gene supressor e já descrito em pacientes com melanoma (Kim e cols, 2016). O gene *SMARCA4* é um gene que codifica atpase e descrito em pacientes com câncer de ovário (Martinez e Reyes, 2018).

Figura 24 - Visualização pelo chAs das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas nos cromossomos 4,5,9,12,19 e 22 do paciente 12.



4.13.PACIENTE 13**Sexo:** M**MF:** Primária**Idade:** 38**Cariótipo:** 46, XY**Mutação *driver*:** *CALR.inst***Resultado CMA:** Normal**Genes candidatos:** Nenhum

4.14 PACIENTE 14

Sexo: M

MF: Primária

Idade: 69

Cariótipo: 46, XY

Mutação *driver*: Positivo para *JAK2*

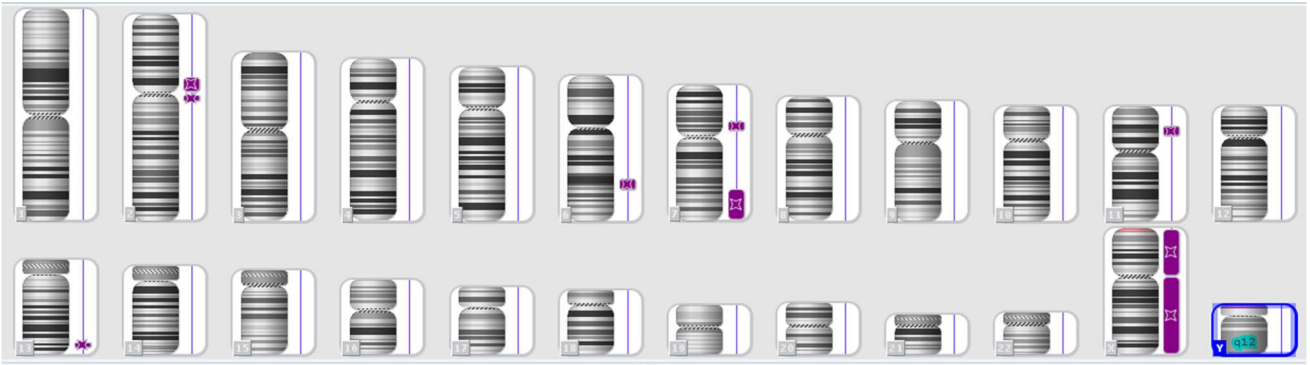
Tabela 13. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 14.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
2p13.1p11.2(74,139,628-89,129,064)hmz	99	
2q11.1q11.2(95,341,387-101,398,842) hmz	32	
6q22.31q23.2(122,165,276-134,129,708)hmz	41	
7q31.32q36.3(122,153,555-155,964,676)hmz	160	<i>POT1, SMOH e BRAF</i>
7p14.1p12.1(42,706,992-51,910,082) hmz	45	
11p14.3p13(24,549,526-35,437,736)hmz	45	<i>LMO2</i>
13q32.3q33.2(101,421,368-106,561,799) hmz	10	

O paciente 14 teve a presença de 7 LOHs encontradas nos cromossomos 2,6,7,11 e 13, como mostra a figura 25. A LOH no cromossomo 11, na posição genômica ch11:24,549,526-35,437,736, na região 11p14.3p13 inclui o gene *LMO2*, fator transcricional que tem um importante papel no desenvolvimento do sistema hematopoiético e vêm sendo demonstrado uma desregulação neste gene com o desenvolvimento da leucemia linfóide aguda do tipo T (Wang e cols, 2007).

Na LOH no cromossomo 7 na região 7q31.32q36.3 foram mapeados os genes *SMO*, *POT1* e *BRAF*, sendo respectivamente, descritos no carcinoma de célula basal melanoma, e adenocarcinoma (Eberl e cols, 2012; Espinoza e cols, 2014; Marranci e cols, 2017).

Figura 25- Visualização pelo chAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 2,6,7,11 e 13 do paciente 14.



4.15 PACIENTE 15

Sexo: F

MF: Primária

Idade: 48

Cariótipo: 46, XX

Mutação driver: *CALR.del*

Tabela 14. Resultados do CMA e genes mapeados e candidatos no OMIM no paciente 15.

Resultado do CMA	Número de genes OMIM mapeados nos segmentos.	Genes candidatos selecionados
1p33p31.1(47,858,053-69,907,944)hmz	79	
2p13.2q13(71,835,787-113,889,134)hmz	82	<i>TMEM127, BUB1, 1L1B, 1LRN</i>
2q11.1q13(95,341,387-113,889,134) hmz	84	
3q11.1q22.1(93,536,053-131,849,410) hmz	145	
3p13p11.1(72,568,037-90,485,635) hmz	16	<i>GATA2</i>
6p22.3p12.3(15,735,087-49,880,005)hmz	381	<i>DEK e GGB</i>
7q21.11q22.1(83,470,313-103,219,027)hmz	131	
9q33.1q33.2(120,027,912-125,306,402) hmz	20	
10q25.1q26.13(107,670,340-124,523,169)hmz	60	<i>MX11</i>
11q12.1q13.5(56,930,833-76,123,829)hmz	313	<i>CCND1 e NUMA1</i>
11p11.2p11.12(46,304,337-51,563,636) hmz	31	
15q14q21.3(39,625,545-57,874,494)hmz	125	<i>BUB1B</i>

16p13.2p13.11(9,182,576-16,159,628) hmz	31	
Xp11.3p11.1(43,815,818-58,337,890) hmz	145	
Xp21.1p11.4(34,218,865-40,790,309) hmz	13	
Xq11.1q13.1(61,932,503-68,422,477) hmz	23	

O paciente 15 apresentou 16 LOHs encontradas nos cromossomos 1,2,3,6,7,9,10,11,15,16 e X, mostrado na figura 26.. Neste paciente fizemos a análise de CMA no sangue periférico e aspirado de medula óssea sem diferença nos resultados. A LOH no cromossomo 3, na posição genômica ch3: 72,568,037-90,485,635, na região 3p13p11.1 inclui o gene *GATA1*. O gene *GATA1*, fator de transcrição regulador, é essencial para o desenvolvimento de muitas linhagens celulares, incluindo hematopoiéticas, cardíacas e endodermiais. A expressão diminuída deste gene está ligada a síndrome mielodisplásica, mas o aumento da sua expressão está correlacionada com o mau prognóstico na leucemia mielóide aguda adulta e pediátrica (Santos e cols, 2011; Hahm e cols, 2015; Mehrotra e cols, 2015; Katsumura e cols, 2016).

Este mesmo paciente tem uma LOH no cromossomo 11, na posição genômica ch11:56,930,833-76,123,829, na região 11q12.1q13.5 que inclui o gene *NUMA-1*, que codifica uma proteína que forma o componente estrutural da matriz nuclear. Mutações nesse gene levam à interrupção da via de sinalização do ácido retinóico e a diferenciação mielóide no estágio promielocítico (Zhang e cols, 2000). Também encontramos uma LOH no cromossomo 6, na posição genômica ch6: 15,735,087-49,880,005, na região 6p22.3p12. onde estão mapeados os genes *DEK* e *G6B*. O gene *DEK* é um oncogene e sua alta expressão é encontrada em muitos tipos de câncer, dentre eles mama, ovário, bexiga, colon e na leucemia mielóide aguda e que está associado a um avanço da doença com um prognóstico ruim (Sandén e cols, 2014).

Já o gene *G6B* é um membro da superfamília das imunoglobulinas e localizado no complexo principal de histocompatibilidade na classe III, sendo um importante regulador da função dos megacariócitos e da produção de plaquetas e pode estar relacionado na mielofibrose com a presença da trombose (Mazharian e cols, 2012).

Foram encontrados no cromossomo 2, na posição genômica ch2: 71,835,787-113,889,134, na região 2p13.2q13 os genes *TMEM127* (gene supressor de tumor), *BUB1* (proteína checkpoint na mitose), *1L1B* (interleucina), *1LRN* (interleucina) descritos em outros tipos de cânceres, como carcinoma renal, colorretal e gástrico. (Wadhwa e cols, 2013; Deng e cols, 2014; He e cols, 2015; Stahl e cols, 2017). No cromossomo 10, na posição genômica ch10: 107,670,340-124,523,169), na região 10q25.1q26.13 o gene *MX11* está envolvido na neurofibrosarcoma e no ch11: 56,930,833-76,123,829, na região 11q12.1q13.5 o gene *CCND1*(proteína reguladora do ciclo celular) foi descrito no câncer colorretal (Xie e cols, 2017) e, por fim, no ch15: 39,625,545-57,874,494, na região 15q14q21.3 o gene *BUB1B* (quinase serina/treonina checkpoint mitose) está associado ao glioblastoma (Ma e cols, 2017)

Figura 26- Visualização pelo ChAS das perdas de heterozigose (barra roxa) detectadas pela CMA nos cromossomos 1,2,3,6,7,9,10,11,15,16 e X do paciente 15



4.16 PACIENTE 16

Sexo: M

MF: Primária

Idade: 35

Cariótipo: 46, XY

Mutação driver: *CALR.del*

Resultado CMA: Normal

Genes candidatos: Nenhum

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo visou a identificação de rearranjos submicroscópicos em pacientes com mielofibrose primária e MF pós TE, comparação da análise pela citogenética convencional e CMA, bem como sugerir genes candidatos mapeados nos segmentos alterados que possam influenciar no diagnóstico e prognóstico na mielofibrose.

Neste estudo a análise por CMA foi feita em 16 pacientes com mielofibrose, sendo 13 com MFP e 3 MF pós TE. Apesar do pequeno tamanho de nossa amostra, ela é representativa da população de Brasília-DF. O Distrito Federal tem uma população total de 3 milhões e foi fundado há apenas 58 anos e, portanto, têm uma população predominantemente jovem. Considerando a frequência estimada de mielofibrose de 0,5-1,5:100000 (Titmarsh e cols, 2014; Srour e cols, 2016) devemos esperar cerca de 30 pacientes com mielofibrose. Todos os pacientes incluídos no trabalho foram acompanhados no centro de referência para distúrbios hematológicos em adultos do hospital de Base do Distrito Federal nos últimos três anos e o número de pacientes incluídos no estudo representa 53% do número total de pacientes.

Apesar da literatura descrever que a MFP é mais freqüente no sexo masculino do que no feminino não tivemos esta predominância, pois, tivemos 50% dos pacientes do sexo feminino, com média de idade de 57 anos e 50% do sexo masculino com média de idade 59 anos (Titmarsh e cols, 2014; Srour e cols, 2016).

Os resultados do cariótipo pela técnica de bandeamento G mostraram alterações em 3 de 16 pacientes, sendo todos com MFP. Já na CMA foram encontradas alterações em 11 pacientes. Estes resultados demonstram que a maioria dos pacientes apresentaram alterações citogenéticas não detectáveis ao cariótipo ou por serem menores que a resolução do cariótipo (<4-10 Mb) ou por se tratar de segmentos de LOH.

As análises dos cariótipos foram feitas a partir de aspirado de medula óssea, enquanto a CMA foi no sangue periférico com exceção de um paciente em que foram testados os dois obtendo-se resultados idênticos. Considerando a origem dos dois tecidos e a dificuldade de se obter aspirado de medula óssea na mielofibrose, devido a presença de fibrose, a análise por CMA é uma alternativa nos casos em que não é possível obter aspirado de medula sem a necessidade de uso de indutores de divisão celular na cultura de células.

A taxa de CNVs encontrada neste trabalho foi de 31,25% foi mais baixa do que encontrada em outros trabalhos (Hussein e cols, 2009; Brecqueville e cols, 2014; Tefferi e cols, 2014). Neste estudo não encontramos nenhum viés clínico entre o nosso estudo e os descritos na literatura que explicassem esta diferença e, além disso, essa diferença não deve ser atribuída à limitação do CMA por não reconhecer a translocação cromossômica, pois estas representam apenas 3 a 9% das alterações em pacientes com mielofibrose (Tefferi e cols, 2001; Hussein e cols, 2009; Tefferi e cols, 2009). Uma explicação pode ser o fato de que nos outros trabalhos utilizaram uma plataforma de microarranjo não específica para a detecção de alterações cromossômicas e com parâmetros de análise muito abaixo dos considerados ideais. Dessa forma, muitos dos achados devem corresponder a erros de interpretação ou a alterações constitucionais comuns, classificadas erroneamente como possivelmente patogênicas. (Visani e cols, 2011).

Além da diferença observada nos dados citogenéticos, a análise de mutação nos genes *driver* realizadas em trabalho anterior do nosso grupo também mostrou uma frequência aumentada de mutações CALR em relação a mutação JAK2. A presença de maior quantidade de mutação CALR também foi encontrada em outros estudos com a população brasileira (Machado-Neto e cols, 2015; Nunes e cols, 2015). Uma das possíveis explicações para esta diferença é que a presença da mutação CALR está associada a pacientes mais jovens com mielofibrose como a deste estudo, enquanto que a mutação JAK2 é mais encontrada em pessoas mais idosas (Vannucchi e cols, 2008). Outra possível explicação seria a composição étnica da população de estudo, pois, a grande miscigenação da população brasileira poderia explicar essa diferença. A população brasileira deriva da miscigenação de três grupos ancestrais principais - ameríndios, europeus e africanos, embora várias outras populações tenham sido incorporadas - em um processo que já se estende por meio milênio (Machado-Neto e cols, 2015; Nunes e cols, 2015). Devido à sua grande extensão territorial, a distribuição desses grupos no território brasileiro não foi homogênea, o que reflete na composição da população atual.

Em três pacientes (2, 4 e 6) foram identificadas perdas de heterozigose em mosaico. O mosaicismo associado ao câncer aponta para a presença de múltiplas linhagens de células na amostra. Além disso, os *softwares* de análise de microarranjo não são capazes de nomear essas alterações que devem ser, portanto, identificadas visualmente. Este achado precisa ser melhor verificado para saber se o mosaicismo vai influenciar o prognóstico e evolução da mielofibrose para a fase blástica (Lichtenstein, 2018). Nesses casos a repetição do exame poderia mostrar como a alteração se comporta com a evolução da doença.

No presente trabalho foram detectados segmentos de LOH em 62,5% dos pacientes, a maioria dos pacientes com MFP e apenas em um paciente com MF pós TE. Foram identificados um total de 48 LOHs, sendo que o número de LOH por paciente variou de 1 a 16. As LOHs mais frequentes correspondiam a segmentos dos cromossomos 1q(31,25%), 11q (18,75%) e Xq (18,75%), entretanto os segmentos alterados não são coincidentes, conforme listados na tabela 3. Neste estudo tivemos a presença da LOH no 9p com a presença da mutação JAK2 em apenas um paciente (12) que tinha a MF pós TE. Sabemos que a mutação JAK2 inicia-se em heterozigose e progride para homozigose pela LOH devido a uma recombinação mitótica e isto contribui para a transição de heterozigose para a homozigose da mutação JAK2 e pode contribuir para a progressão da doença (Rumi e cols, 2010; Rumi e cols, 2011; Hahn e cols, 2014; Thoennissen e cols, 2017; Vainchenker e Kralovics, 2017).

Também em nosso trabalho foi encontrada uma LOH no cromossomo 1p com a mutação *MPL* em um único paciente (2). Este encontro contribui para a transição de heterozigose para homozigose na mutação *MPL*, sugerindo que o papel potencial desta mutação pode influenciar na progressão da mielofibrose secundária pós TE (Thoennissen e cols, 2010; Rumi e cols, 2011).

A identificação de múltiplos CNVs e LOH nos pacientes com MF sugere a presença de genes envolvidos na patogênese da doença nesses segmentos. A grande heterogeneidade dos achados citogenéticos não permite apontar genes principais envolvidos na etiologia da doença, mas sim genes com potencial contribuição para a doença. Com base nos nossos dados, propusemos alguns genes, previamente descritos em cânceres hematológicos ou outros tipos de câncer, como possíveis candidatos.

As LOHs, bem como CNVs, constituem marcadores de clonalidade. As áreas anteriormente detectadas são frequentemente identificadas em vários tipos de câncer, incluindo malignidades hematológicas (Maciejewski e Mufti, 2008).

Os processos extrínsecos que levam dano ao DNA estão sendo implicados na geração da LOH, pois, se o tratamento com quimioterapia prejudica DNA também pode contribuir para o aumento da LOH, como já observado na leucemia mielóide aguda, linfoma folicular ou leucemia linfóide aguda (O'Keefe e cols, 2010). A recombinação mitótica é considerada a maior contribuição para adquirir a LOH (Young e cols, 2006).

No entanto, os nossos resultados mostram que a perda de heterozigose e CNVs frequentemente abriga genes envolvidos na diferenciação celular e na proliferação. Entretanto, seu significado prognóstico é ainda pouco compreendido e a implementação do CMA como um teste rotineiro dará mais evidências para estabelecer seu papel na patogênese da doença. Além disso, nosso estudo destaca a importância de uma análise minuciosa das CMAs em pacientes com neoplasias clonais, permitindo a detecção de mosaicismos. Esses dados gerados pela CMA podem também contribuir para uma avaliação de escore mais apurados de prognóstico na DIPSS, pois, utilizamos uma técnica que consegue detectar rearranjos submicroscópicos e assim individualizar o tratamento dos pacientes com mielofibrose. Também podemos observar que a implantação da CMA na rotina de diagnóstico dos pacientes com MF pode ser de grande valia, pois, poderia auxiliar o diagnóstico clínico e melhorar os parâmetros citogenéticos utilizados nos escores de prognósticos aplicados na mielofibrose.

A geração de novos dados de CMA em mielofibrose poderá permitir a sua incorporação dos dados gerados nos escores prognósticos, permitindo uma avaliação mais precisa do que a citogenética convencional e auxiliando no melhor diagnóstico clínico laboratorial dos pacientes com mielofibrose.

6 CONCLUSÃO

A análise dos dados nos permite concluir:

- Os segmentos de LOH são um achado frequente na mielofibrose e podem contribuir para a progressão da doença para a fase blástica ou leucemias.

- Apesar dos nossos dados mostrarem que a citogenética convencional é um bom método a ser utilizado, ela não permite detectar CNVs menores do que 4Mb e o uso da CMA permitiu detectar CNVs menores do que a resolução da citogenética convencional.

- Foram encontrados sessenta e nove genes descritos em neoplasias hematológicas e dezessete descritos na mielofibrose que poderiam influenciar o prognóstico e evolução da doença para a fase blástica ou leucemias;

- O CMA mostrou ser mais adequado para a caracterização genética dos pacientes com mielofibrose. Assim, as plataformas de microarranjo cromossômico que combinem oligos e SNP podem ser usadas como um teste genético de primeira linha para sugerir genes que possam influenciar a leucemogênese, terapia com genes alvos em pacientes com mielofibrose.

- Dessa forma, o uso do CMA na rotina clínica poderá permitir futuramente que seus achados sejam incorporados de uma forma mais precisa nos escores prognósticos e identificando genes que possam influenciar na evolução e prognóstico da mielofibrose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. 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.
3. Alshemmari SH, Rajan R, Emadi A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review . *Med Princ Pract* 2016;25:501–509
4. 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.
5. Alves C, Meyer I, Vieira N, Toralles NB, Lemaire D. Distribution and frequency of HLA alleles and haplotypes in Brazilians with type 1 diabetes mellitus. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism.* 2006, 50(3):436-444.
6. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood.* 2013;122(13):2176–84.
7. 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.
8. Benyoucef A, Pali CG, Wang C, Porter CJ. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *GENES & DEVELOPMENT.* 2016: 30:508–521

9. Boiocchi L, Mathew S, Gianelli U, Iurlo A, Radice T, Barouk-Fox S, Knowles DM, Orazzi A. Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. *Modern pathology*. 2013; 26: 1577-1585.
10. Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Gelsi-Boyer JAV, Arnoulet C, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birbaum D, Murati A. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica*. 2014; 99(1): 37-45
11. Bose P, Verstovsek S. Prognosis of Primary Myelofibrosis in the Genomic Era. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016 Aug;16(August):S105–13.
12. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide , Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Ney N, Birbaum D, Mozziconacci MT. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009; 23(11)-2183-2186.
13. 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.
14. 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.
15. Chauffaille MLLF. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2010;32(4):308-316.
16. 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.

17. Chassot AA, Gregoire EP, Lavery R, Taketo MM, et al. RSPO1/b-Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary. *PLoS ONE* . 2011; 6(10):1-17.
18. Chen C, Huang X, Chen K, Gao D, Qian S. Early mortality in acute promyelocytic leukemia: Potential predictors (Review). *Oncology Letters*.2018; 15:4061-4069.
19. Chotinantakul K, Leraanansaksiri W. Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Res*. 2012;2012(May):1–16.
20. Chou F-S, Mulloy JC. The Thrombopoietin/MPL pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. *J Cell Biochem*. 2011 Jun;112(6):1491–8.
21. Clinton A, McMullin MF. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol*. 2016 Oct;69(10):841–5.
22. Conchon M, Tavares RS, Pagnano KB, Datoguaia 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.
23. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6:372–375.
24. Delhommeau F.; Dupont S.; Tonetti C.; et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007; 109: 71–77, 2007.
25. Espinoza CDR, Harland M, Ramsay AJR, Aoude LG, Quesada V, Ding Z, Pooley KA, Pritchard AL, Tiffen JC, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet*. 2014: 46(5):478-481.
26. Ewens KG,Bhatti TR, Moran KA,Yutz JR,Shields CL, Eagle RC,Ganguly A. Phosphorylation of pRb: mechanism for RB pathway inactivation in MYCN-amplified retinoblastoma. 2017; 6(3):619-630.

27. 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.
28. 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.
29. Gondek Lp, Tiu R, O’Keefe DL, Sekeres MA, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* .2008; 111(3):1534-1542 .
30. 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.
31. Hahm C, Huh HJ, Mun YC, Seong CM, Chung WS, Huh J. Genomic aberrations of myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014; 37(2):181-189.
32. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*. 2009. 10(8):551-64.
33. Hoffman R, Rondelli D. Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology*. Am Soc Hematol Educ Program. 2007:346-54.
34. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. 1997. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential throm- bocythemia. *Blood* 90:4031–4038.

35. 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.
36. Hussein K, Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *European Journal of Haematology* 2009 (82): 329-338.
37. 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.
38. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, Okeefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski PP. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403-6410.
39. Katsumura KR, Ong IM, DeVilbiss AW, Sanalkumar R, Bresnick EH. GATA Factor-Dependent Positive-Feedback Circuit in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cell reports*. 2016;16(9):2428-2441. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.058.
40. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Pikman Y, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Gilliland OG. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp. Hematol*. 2008; 36: 1471-1479.
41. Kim N, Yim HY, He N, Lee CJ, et al. Cardiac glycosides display selective efficacy for STK11 mutant lung cancer. *Scientific Reports*. 2016;6:1-11.
42. 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
43. 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.

44. 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.
45. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir 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.
46. Lataillade JJ, Pierre-Loius O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyré MC and Le-Bousse-Kerdilés MC. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept t evidence. *Blood*. 2008; 112(15):3026-3035.
47. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 112(6):2190-8.
48. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT Signaling in the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders. *Hematology*. 2006 Jan 1;2006(1):233–9.
49. Li Z, Abraham BL, Berezovskaya A, Farah N., Liu Z, Leon T e t al. APOBEC signature mutation generates an oncogenic enhancer that drives LMO1 expression in T-ALL. *Leukemia* (2017) 31, 2057–2064.
50. 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.
51. Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017 Jun;6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.06.010>.
52. Maciejewski JP and Mufti G J. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood*. 2008; 112(4): 965-974.

53. Marranci A, Jiang Z, Vitiello M, Guzzolino E, et al. The landscape of BRAF transcript and protein variants in human cancer. *Mol Cancer*. 2017; 16: 85.
54. Martinez JAG, Reyes JC. High expression of SMARCA4 or SMARCA2 is frequently associated with an opposite prognosis in cancer. 2018: 1-16
55. Mazharian A, Wang Y-J, Mori J, et al. Mice Lacking the ITIM-Containing Receptor G6b-B Exhibit Macrothrombocytopenia and Aberrant Platelet Function. *Science signaling*. 2012;5(248):ra78. doi:10.1126/scisignal.2002936.
56. Mehrotra M, Patel KP, Chen T, Miranda RN, Wang Y, Zuo Z, Muddasani R, Mishra BM, Abraham R, Luthra R, Lu G. Genomic and clinicopathologic features of Primary Myelofibrosis with isolated 13q deletion. *Clinical Lymphoma, Myeloma & leukemia*. 2015; 15(8): 496-505.
57. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post- ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*. 2007;31(6):737-40 .
58. 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.
59. McKie AB, Vaughan S, Zanini E, Okon IS, Louis L, et al. The OPCML Tumor Suppressor Functions as a Cell Surface Repressor-Adaptor, Negatively Regulating Receptor Tyrosine Kinases in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Discov* . 2012; 2(2): 156–171
60. 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.
61. 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.
62. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gündem 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.

63. Nascimento EFR, Ribeiro ML, Magro DA, Carvalho J, Kanno DT, Martinez CAR, Coy CSR. Expressão tecidual dos genes *Mutylh* e *OGGI* em doentes com cancer colorretal esporádico. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2017;30(2):98-102
64. O'Keefe C, McDevitt MA and Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood.* 2010; 115(14):2731-2739.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time *Nat. Rev. Cancer.* 2011; 11:338-351.
70. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006; 444: 444-454.
71. Rice KL, Lin X, Wolniak K, Ebert BL, Berkofsky-Fessler W, Buzzai M, Sun Y, Xi C, Elkin P, Levine R, Golub T, Gilliland DG, Crispino JD, Licht JD, Zhang W. Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms *Blood Cancer J.* 2011; 1(11):1-11.

72. 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.
73. Rozovski U, Verstovsek S, Manshouri 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
74. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017 Feb 9;129(6):680–92.
75. 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
76. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, 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):4388-4395. doi:10.1182/blood-2013-02-486050.
77. Rumi E, Harutyunyan A, Elena C, Pietra D, et al. Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. *Am J hematol.* 2011; 86(12): 974-979.
78. Rozovski U, Verstovsek S, Manshouri 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.
79. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, et cols. Gain-of-function of mutated c-CBL tumor suppression in myeloid neoplasms. *Nature.* 2009;460(7257):904-908.

80. Sandén C, Järvstråt L, Lennartsson A, Brattås PL, Nilsson B, Gullberg U. The DEK oncoprotein binds to highly and ubiquitously expressed genes with a dual role in their transcriptional regulation. *Molecular Cancer*. 2014;13:215. doi:10.1186/1476-4598-13-215.
81. Santos L-C, Costa Ribeiro JC, Silva NP, et al. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. 2011; 33(6): 417-24.
82. Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S. Single-Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping in Clinical Practice: Where, When, and How? *Seminars in Oncology*. 2012.
83. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004; 305: 525-528.
84. Serdlow, SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008). *World Health Organization Classifications of Tumours. of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon, France.
85. Sinclair EJ, Forrest EC, Reilly JT, Watemorre AE, Potter Am. Fluorescence in hybridization analysis of 25 cases of idiopathic myelofibrosis and two cases of secondary myelofibrosis. *Br J haem*. 2001; 113: 365-368.
86. Song J, Shao H. SNP Array in Hematopoietic Neoplasms: A Review. *Microarrays Basel*. 2016; 5(1); 1-23
87. Spanoudakis E.; Tsatalas C. Hemopoiesis in Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Disorders. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v.2, p. 154-160, 2009.
88. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. 1990. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 63: 1137–1147
89. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2017 Jun;376(22):2168–81.

90. 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. *Br J Haematol*. 2016;174(3):382–96.
91. Stegelmann F, Bullinger L, Griesshammer M, Holzmann K, Habdank M, Kuhn S, Maile C, Schauer S, Dohner H, Dohner K. High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica*. 2010; 95(4): 666–669.
92. 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 Editio. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
93. Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, Cortes J, Lynn A, Keating MJ, et al. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood*. 2009;113(18):4171-8.
94. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nature Genetic*. 2003; 34(2):148-150
95. Tran N, Su H, Khodadadi-Jamayran A, et al. The AS-RBM15 lncRNA enhances RBM15 protein translation during megakaryocyte differentiation. *EMBO Reports*. 2016;17(6):887-900. doi:10.15252/embr.201541970.
96. Team TU of CHMCR. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016 Oct 6;128(14):1800–13.
97. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*. 2009; 115(17):3842-7.
98. Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson Ca, et al. Cyogenetics findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* . 2001; 113(3): 763-771.

99. Tefferi A, Gangat N, Wolanskvj AP, Schwager S, e cols. 20+ yr without leukemic or fibrotic transformation in essential thrombocythemia or polycythemia vera: predictors at diagnosis. *Eur J haematol*; 2008;80: 386-390.
100. Tefferi A, Gilliland G. Classification of chronic myeloid disorders: From Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Pract Res Clin Haem*. 2006;19(3):365-85.
101. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):50–8.
102. 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.
103. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016 Dec;91(12):1262–71.
104. 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.
105. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al: CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;24:1494–1500
106. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramassa D, Passamonti F, Pardanani A. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014; 28(7):1472-1477.
107. Tefferi A, Lascho TL, Fink CM, Elala Y, Hanson CA Kettering RP, Gangat N, pardanani A. targeted deep sequencing in Primary myelofibrosis. *Blood*.2016;1(2):105-111.

108. The JLF, Purwin J, Greenaealt EJ, Chervoneva I, Goldberg A, Davies MA, Aplin AE. An in vivo reporter to quantitatively and temporally analyze the effects of CDK4/6 inhibitor-based therapies in melanoma. *Cancer Res.* 2016; 76(18): 5455-5466.
109. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke 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.
110. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with Leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010; 115:2882-2890.
111. Tsukasaki K, Miller CW, Greenspun E, Eshaghian S. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* 2001; 20(25):3301-5.
112. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):667–79.
113. 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.
114. 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
115. 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.
116. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. 1992. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl

oncogene: Identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5640–5644

117. 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

118. Visani G, Sapienza MR, Isidori A, Tripodo C, Laginestra MA, Righi S, Sacchetti CAS, Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Nictolis MD, Valentini M, Donati M, Emiliani R, Alesiani F, Paolini S, Finelli C, Pileri SA, Piccaluga PP. SNPs Array Karyotyping reveals a Novel Recurrent 20p13 Amplification In Primary Myelofibrosis. *PLoS One*. 2011; 6(11):1-10.

119. Volik S, Raphael BJ, Huang G, Stration MR, Bignel G. Decoding the fine-scale structure of a breast cancer genome and transcriptome. *Genome Res*. 2006; 16: 394-404.

120. Wadleigh A.; Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *International Journal of Hematology*, v. 91, p. 174-179, 2010.

121. Wain LV, Armour JA, Tobin MD. Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet*. 2009. 374(9686):340-50.

122. Young BD, Debernardi S, Lillington DM. Role for mitotic recombination in leukemogenesis. *Avs Enzyme Regul*. 2006; 46:90-97.

123. X. Yuan, H. Wu, N. Han, H. Xu, et al. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J. Hematol. Oncol* . 2014; 7:2-10.

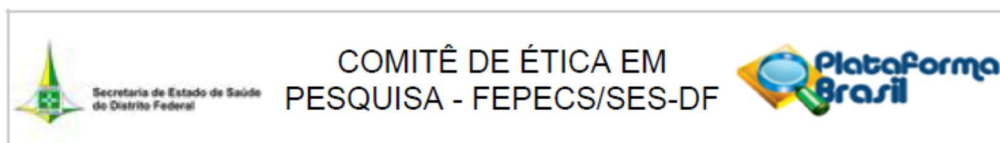
124. Zhang JW, Wang JY, Chen Sj, et al. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci* 2000; 25(3):275-84.

125. 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.

126. Zerbini, MCN, Soares,FA, Velloso, EDRP, Chaufalle, MLLF, Paes, RP. Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfoide, 4ª edição, 2008 - principais modificações introduzidas em relação à 3ª edição, 2001. Rev Assoc Med Bras. 2011; 57(1): 66-73 .
127. Zhi L, Liu D, Wu SG, Li T, et al. Association of common variants in MTAP with susceptibility and overall survival of osteosarcoma: a two-stage population-based study in Han Chinese. J Cancer. 2016; 7(15): 2179–2186
128. Zhou A, Afzal A, Oh ST. Prognostication in Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms: a Review of the Recent Literature. 2017; 12(5):397-405
129. Zohren F, Souroullas GP, Luo M, et al. Lyl1 regulates lymphoid specification and maintenance of early T lineage progenitors. Nature immunology. 2012;13(8):761-769. doi:10.1038/ni.2365.

8. ANEXOS

8.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Estudo de mecanismos possivelmente relacionados à auto-renovação, diferenciação, quiescência e resistência terapêutica em Células-Tronco Leucêmicas de Neoplasias Mieloproliferativas"

Pesquisador: Alexandre Nonino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19493613.5.0000.5553

Instituição Proponente: DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 525.330

Data da Relatoria: 10/02/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo em que será recolhido a aliç quota de aspirado de medula oçssea de 10 pacientes portadores de siçndrome mieloproliferativas (BCR ABL negativos) e 10 pacientes controles portadores de Linfoma naçio Hodgkin (sem infiltraççao da medula oçssea) no material geneçtico vai se tentar estudar:

1. O status de ativaççao da via TGF-Beta/FOXO e da expressaççao de PML na ççlulas tronco hematopoieticas das NMPs BCR-ABL negativas, comparando-as com ççlulas diferenciadas (progenitoras e maduras) dos proççprios pacientes e com CTH de controles.
2. Avaliar os resultados da exposicçao das Celulas-Tronco Hematopoieticas (CTH) e progenitoras de pacientes e controles, em cultura, a combinacçoes de inibidor da JAK-2 com compostos que interfiram nas vias acima: avaliar capacidade de inibidores de TGF-Beta e PML de induzir proliferacçao (saicda da quiescencia) das CTH e progenitoras e a capacidade da exposicçao sequencial a ruxolutinibe de induzir apoptose destas ççlulas.
3. Correlacionar o status de ativaççao da via TGF-Beta/FOXO e PML nas CTH das NMPs BCR-ABL negativas com os scores prognocçsticos dos pacientes e com o status de mutacçao V617F do gene JAK-2.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

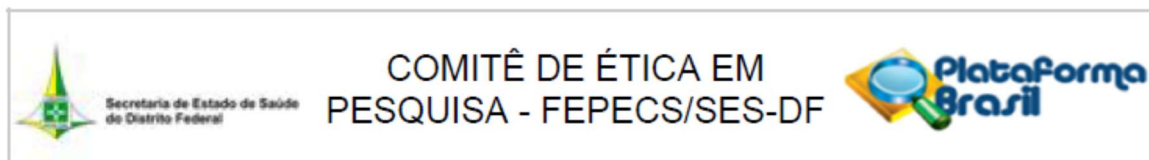
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 525.330

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o status de ativação da via TGF-Beta/FOXO e da expressão de PML nas CTH das NMPs BCR- ABL negativas, comparando-as com células diferenciadas (progenitoras e maduras) dos próprios pacientes e com CTH de controles. 2. Avaliar os resultados da exposição das CTH e progenitoras de pacientes e controles, em cultura, a combinações de inibidor da JAK-2 com compostos que interfiram nas vias acima: avaliar capacidade de inibidores de TGF-Beta e PML de induzir proliferação (saída da quiescência) das CTH e progenitoras e a capacidade da exposição sequencial a ruxolitinibe de induzir apoptose destas células. Objetivo Secundário:

1. Correlacionar o status de ativação da via TGF-Beta/FOXO e PML nas CTH das NMPs BCR-ABL negativas com os scores prognósticos dos pacientes e com o status de mutação V617F do gene JAK-2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios superam os riscos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

1. HIPOTESES: há formulação da hipótese somente positiva de que "As vias dependentes de TGF-Beta/Foxo e PML podem estar ativadas nas CTL de NMPs, contribuindo para a falha terapêutica dos tratamentos atualmente disponíveis." Consideramos pertinente a formulação de hipótese negativa de que "as vias não estariam ativadas", além disso é possível formular outras hipóteses para o objetivo secundário: "o status de ativação da via TGF-Beta/FOXO e PML nas CTH das NMPs BCR-ABL negativas se relaciona ou não se relaciona com os scores prognósticos dos pacientes e com o status de mutação V617F do gene JAK-2.

2-METODOLOGIA -

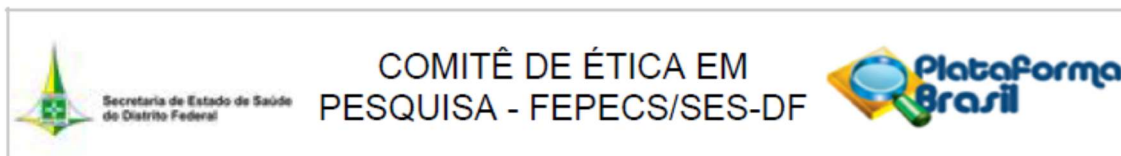
- Não está claro foi estimado o tamanho da amostra para comprovação das hipóteses.
- Serão desprezadas as amostras de medula óssea dos pacientes do grupo controle com infiltração da medula óssea todavia esta informação será conhecida somente após exame da amostra. Por isso seria conveniente alterar o número de sujeitos do grupo controle, que será variável e dependente do número de pacientes com infiltração da medula óssea. Para totalizar o número de 10 sujeitos sem infiltração linfomatoso da medula óssea.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto apresentada

Termo de concordância apresentado TCLE apresentado

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 525.330

Currículo do investigador apresentado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos os seguintes ajustes

1. HIPOTESES: há formulação da hipótese somente positiva de que "As vias dependentes de TGF-Beta/Foxo e PML podem estar ativadas nas CTL de NMPs, contribuindo para a falha terapêutica dos tratamentos atualmente disponíveis." Consideramos pertinente a formulação de hipótese negativa de que "as vias não estariam ativadas", além disso é possível formular outras hipóteses para o objetivo secundário: "o status de ativação da via TGF-Beta/FOXO e PML nas CTL das NMPs BCR-ABL negativas se relaciona ou não se relaciona com os scores prognósticos dos pacientes e com o status de mutação V617F do gene JAK-2. FORMULAÇÃO DE HIPOTESES NEGATIVAS E POSITIVAS E DE HIPOTESES PARA O OBJETIVO SECUNDÁRIO. Pendência atendida

2-METODOLOGIA -

a) Não está claro foi estimado o tamanho da amostra para comprovação das hipóteses. FAVOR EXPLIQUE COMO FOI ESTIMADO O TAMANHO DA AMOSTRA. Pendência atendida

b) Serão desprezadas as amostras de medula óssea dos pacientes do grupo controle com infiltração da medula óssea todavia esta informação será conhecida somente após exame da amostra. Por isso seria conveniente alterar o número de sujeitos do grupo controle, que será variável e dependente do número de pacientes com infiltração da medula óssea. Para totalizar o número de 10 sujeitos sem infiltração linfomática da medula óssea. RECOMENDAMOS QUE SEJA FEITO O AJUSTE DO NÚMERO DE SUJEITOS DA PESQUISA SE LEVANDO EM CONTA OS PACIENTES DO GRUPO CONTROLE COM A MEDULA ÓSSEA INFILTRADA. Pendência atendida

Situação do Parecer:

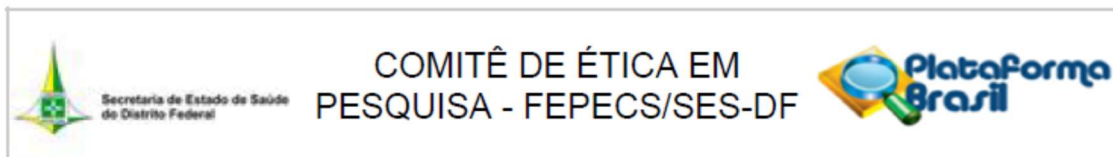
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 525.330

BRASILIA, 10 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
luiz fernando galvão salinas
(Coordenador)

8.2 ARTIGO

Cytogenetic and
Genome Research

Original Article

Cytogenet Genome Res
DOI: 10.1159/000487627Accepted: December 19, 2017
By M. Schmid
Published online: ■■■■

High Frequency of Copy-Neutral Loss of Heterozygosity in Patients with Myelofibrosis

Milton Rego de Paula Junior^a Alexandre Nonino^{d-f}
Juliana Minuncio Nascimento^{a,c} Raphael S. Bonadio^b Aline Pic-Taylor^b
Silviene F. de Oliveira^b Rinaldo Wellerson Pereira^d Cintia do Couto Mascarenhas^d
Juliana Forte Mazzeu^{a,c}^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Médicas, ^bDepartamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, and ^cFaculdade de Medicina, Universidade de Brasília, ^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, ^eHospital de Base de Brasília, Secretaria de Estado de Saúde, and ^fCETTRO – Centro de Câncer de Brasília, Brasília, Brazil

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.**Keywords**Chromosome microarray · Chromosome rearrangements · Copy-neutral loss of heterozygosity · *JAK2* V617F mutation · Myelofibrosis**Abstract**

Myelofibrosis is the rarest and most severe type of Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms. Although mutually exclusive driver mutations in *JAK2*, *MPL*, or *CALR* that activate JAK-STAT pathway have been related to the pathogenesis of the disease, chromosome abnormalities have also been associated with the phenotype and prognosis of the disease. Here, we report the use of a chromosomal microarray platform consisting of both oligo and SNP probes to improve the detection of chromosome abnormalities in patients with myelofibrosis. Sixteen patients with myelofibrosis were tested, and the results were compared to karyo-

type analysis. Driver mutations in *JAK2*, *MPL*, or *CALR* were investigated by PCR and MLPA. Conventional cytogenetics revealed chromosome abnormalities in 3 out of 16 cases (18.7%), while chromosomal microarray analysis detected copy-number variations (CNV) or copy-neutral loss of heterozygosity (CN-LOH) alterations in 11 out of 16 (68.7%) patients. These included 43 CN-LOH, 14 deletions, 1 trisomy, and 1 duplication. Ten patients showed multiple chromosomal abnormalities, varying from 2 to 13 CNVs or CN-LOHs. Mutational status for *JAK2*, *CALR*, and *MPL* by MLPA revealed a total of 3/16 (18.7%) patients positive for the *JAK2* V617F mutation, 9 with *CALR* deletion or insertion and 1 positive for *MPL* mutation. Considering that most of the CNVs identified were smaller than the karyotype resolution and the high frequency of CN-LOHs in our study, we propose that chromosomal microarray platforms that combine oligos and SNP should be used as a first-tier genetic test in patients with myelofibrosis.

© 2018 S. Karger AG, Basel

KARGER

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cgrJuliana Forte Mazzeu
Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Brasília, DF 70910-900 (Brazil)
E-Mail julianamazzeu@unb.br

Pathogenesis of myelofibrosis (MF), the rarest and most severe type of Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms, is not thoroughly understood. MF is characterized by bone marrow fibrosis, extramedullary hematopoiesis, and abnormal cytokine expression, with consequent hepatosplenomegaly and cytopenia. The disease can occur de novo as primary (PMF) or result from late progression of polycythemia vera (PV), or essential thrombocythemia (ET), in these cases termed as post-PV MF or post-ET MF, respectively. Both conditions are associated with thrombohemorrhagic events, constitutional symptoms, and leukemic transformation [Tam et al., 2009; Visani et al., 2011; Brecqueville et al., 2014; Vainchenker and Kralovics, 2017].

A clonal expansion of a single hematopoietic stem cell, driven by a somatic mutation, culminates in chronic myeloproliferation and atypical megakaryocytic hyperplasia. The clonally expanded megakaryocytes shed abnormal growth factors that induce non-clonal fibroblastic proliferation and hyperactivity, ultimately leading to bone marrow fibrosis. A defective hematopoietic micro-environment has been postulated as necessary for the development of the clonal hematopoietic stem cell and extramedullary hematopoiesis [Lataillade et al., 2008; Hussein et al., 2009; Boiocchi et al., 2013; Mughal et al., 2014; Vainchenker and Kralovics, 2017].

Cytogenetic abnormalities detected by karyotyping can be found in 32–48% of the patients, the most prevalent being 20q-, 13q-, and abnormalities of chromosome 1, although several other numerical and structural rearrangements have also been described [Djordjevic et al., 2007; Tefferi et al., 2008; Hussein et al., 2009; Visani et al., 2011; Boiocchi et al., 2013]. Poor prognostic is attributed to +8, -7/7q, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 rearrangements, complex karyotypes, or monosomy. On the other hand, 20q-, 13q-, or +9 do not appear to impact survival in MF [Tefferi et al., 2014].

More than 85% of PMF patients have a mutually exclusive mutation in one of the following 3 genes: *JAK2* (60–65%), *MPL* (5%), or *CALR* (20–25%). All of these, referred to as “driver” mutations, activate JAK-STAT pathway [Cazzola and Kralovics, 2014]. The type of driver mutation, however, may have prognostic impact: e.g., the *CALR* mutations appear to have a favorable impact on survival, while triple negative patients have worse outcomes [Cazzola and Kralovics, 2014; Tefferi et al., 2014].

Several other mutations have been implicated in the pathogenesis and progression of PMF, including *TET2*, *DNMT3A*, and *IDH1/2* (involved in DNA methylation);

polycomb repressor complex 1 and 2 members and *IDH1/2* (histone modifiers); *TP53*, *CUX1*, *IKZF1*, *FOXP1*, *ETV6*, and *RUNX1* (transcription factors); *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *LNK*, *CBL*, and *FLT3* (signaling proteins) as well as *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, and *ZRSR2* (splicing factors). Notably, *TET2* and *DNMT3A* may play an important role in disease initiation and progression; *EZH2*, *ASXL1*, and *SRSF2* are associated with poor prognosis, and *TP53* is associated with progression to leukemia in MF patients [Carbuccia et al., 2009; Brecqueville et al., 2014; Vainchenker and Kralovics, 2017].

Detection of chromosome imbalances using conventional karyotyping (or G-banding) is limited due to the method's low resolution of only 5–10 Mb. On the other hand, DNA array-based methods, such as SNP arrays, increased the resolution up to the base-pair level, enabling studies of copy number variants (CNVs) and acquired UPD. CNVs are amplified or deleted regions ranging in size from intermediate (1–50 kb) to large (50 kb–3 Mb) and are recognized as a major source of human genome variability [Sebat et al., 2004; da Silva et al., 2016]. Importantly, CNVs are involved in cancer development and can increase during tumor progression, influencing phenotype and prognosis.

Acquired UPDs are loss-of-heterozygosity (LOH) regions occurring without concurrent changes in the gene copy number; a phenomenon also reported as copy-neutral LOH (CN-LOH). These defects are attributed to mitotic recombination in somatic cells and have been recognized in a variety of neoplasms [O'Keefe et al., 2010; Visani et al., 2011; Hahm et al., 2015].

Implementation of chromosomal microarrays in MF have been reported in few studies with a detection rate of imbalances of 44% [Tefferi et al., 2008], 69% [Rumi et al., 2011], 54% [Brecqueville et al., 2014], and 56% [Hahm et al., 2015]. However, most of the abovementioned used array-CGH platforms without SNPs and therefore were unable to detect CN-LOHs.

Here, we report the importance of using a chromosomal microarray platform consisting of both oligo and SNP probes to improve the detection of chromosome abnormalities in patients with MF evidencing the high frequency of CN-LOH.

Material and Methods

Sample

The study included 16 Brazilian patients, 13 with PMF and 3 with post-ET MF, consisting of 57% females with ages varying from 46 to 84 (median age of 57) and 43% males with ages from 35

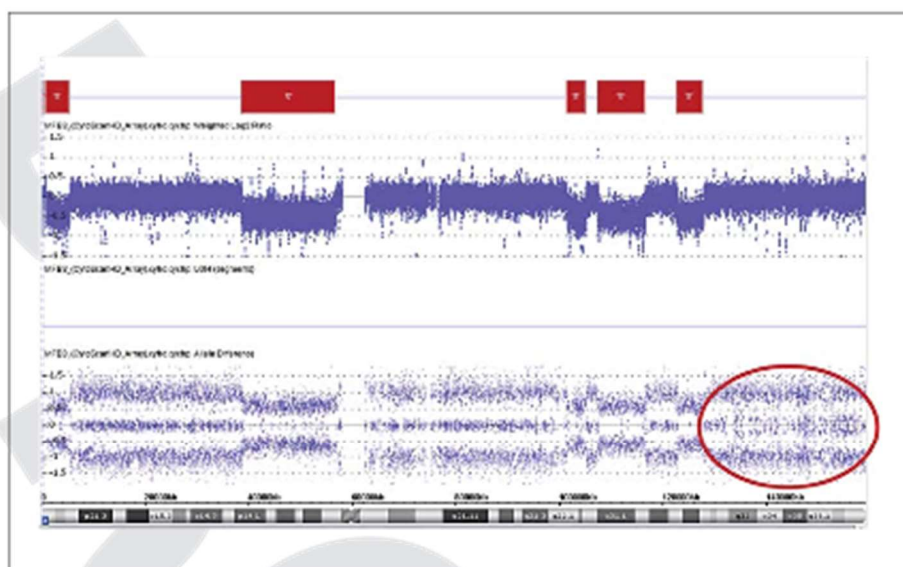


Fig. 1. Graphical representation of a complex rearrangement of chromosome 7 consisting of multiple deletions (red boxes) and a mosaic CN-LOH (circle) in patient 4.

to 81 (median age of 59). All patients were diagnosed according to WHO 2008 criteria. DNA was obtained from peripheral blood leucocytes and extraction was performed using Puregene® (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Conventional Cytogenetics

Routine cytogenetic analysis with conventional G-banding techniques was performed from bone marrow aspirate at nonaffiliated diagnostic laboratories.

Array Comparative Genomic Hybridization

The presence of submicroscopic chromosomal alterations was investigated by microarray analysis using the Affymetrix CytoScan™ HD (14 samples) or Affymetrix 750K (2 samples). These platforms consist of microarrays containing non-polymorphic probes for CNVs from coding and noncoding regions of the human genome as well as polymorphic SNP probes. All procedures were carried out as instructed by the manufacturer. The hybridized slides bearing DNA, and marked with biotin, were analyzed by a GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) and the Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software (Affymetrix). Calling of the abnormalities considered a minimum of (a) 50 consecutively duplicated probes, (b) 25 consecutively deleted probes, and (c) segments of LOH larger than 5 Mb. Smaller alterations involving cancer-associated genes were also investigated. Common CNVs were considered constitutional/likely benign. Candidate genes mapped to large altered segments were defined based on disease-associated OMIM genes, previously related to myeloid neoplasms and/or other types of cancers.

Detection of JAK2, CALR and MPL Driver Mutations

Allele specific PCR for detection of the JAK2 V617F mutation was performed using standard PCR protocols, as described by Campbell et al. [2006]. Screening for CALR, MPL as well as JAK2 mutations was performed by MLPA using kit P420 according to manufacturer's protocol. This kit is designed to detect mutations in JAK2 (V617F, N542_E543del and E543_D544del), CALR (L367fs*46, type 1 deletion and K385fs*47, type 2 insertion), and MPL (W515K and W515L) with an allele burden >10%.

Results

Cytogenetic Studies

G-banding analysis detected in 3/16 (18.7%) patients with MF (Table 1). One patient has trisomy 8, one has a partial deletion of chromosome 13, and the third patient has a complex karyotype involving chromosomes 7, 12, and 20.

Chromosomal microarray analysis (CMA) detected copy-number or LOH alterations in 11 out of 16 (68.7%) patients (Table 1); these included 43 CN-LOH, 14 deletions, 1 trisomy, and 1 duplication. One patient presented a single abnormality, a chromosome 8 trisomy. The other 10 patients showed multiple chromosomal abnormali-

Table 1. Genomic alterations identified by CMA in patients with myelofibrosis

Patient	Age, years	Sex	Type	CMA results	Karyotype	Mapped cancer genes	Size, kb	Driver mutations			
1	84	F	primary	1q24.2q25.2(170,365,327-176,346,512) hmz	46,XX	FASLG	5,981	JAK2			
				1q41q42.13(22,161,988-229,516,511) hmz							
				4q28.3q34.3(133,645,289-179,928,406) hmz							
				12q13.2q24.33(56,002,232-133,778,166) hmz							
				17q21.2q24.3(39,624,325-69,311,217) hmz							
2	62	F	primary	1p22.3p13.1(86,010,458-116,805,160) hmz	46,XX,del(13)	RBM15, NRAS	30,795	MPL			
				11p15.5p12(372,355-41,907,116) mos hmz							
				12q24.31(122,161,101-122,266,479)×1							
				13q13.1q21.33(33,571,752-69,638,023)×1							
				14q12(27,970,825-29,604,858)×3							
				19q13.33(49,274,808-49,513,502)×1							
				Trisomy 8							
				3p26.2p24.3(3,807,650-22,204,563) hmz							
				7p22.3p22.1(861,359-5,499,980)×1							
				7p14.1p11.2(38,652,666-56,755,583)×1							
7q22.3q31.2(107,395,740-116,562,288)×1											
7q22.1q22.3(101,428,262-105,113,953)×1											
7q31.3q32.1(122,748,812-127,779,114)×1											
12p13.2p12.3(12,109,324-18,729,898)×1											
12q21.2(76,448,583-80,275,907)×1											
12q21.31q22(81,467,393-95,908,234)×1											
18q1.2q12.1(24,767,485-32,456,354) hmz											
20q13.13q13.2(47,848,257-53,158,589)×1											
5	68	M	primary	11q24.1q25(121,768,985-132,498,284) hmz	46,XY	OPCML	10,729	CALR del			
				1p36.3p21.1(849,466-26,290,550) mos hmz							
6	59	M	primary	1p12p11.2(120,553,551-120,624,056)×1	46,XX	NOTCH2	823	negative			
				Xq13.1q21.1(70,848,162-77,290,593) hmz							
9	46	F	primary	1p35.2p34.2(30,478,595-43,548,398) hmz	46,XX	RSPO1	13,069	negative			
				9q33.1q33.2(117,808,079-124,657,456) hmz							
				11q23.3q24.3(120,972,517-128,650,029) hmz							
				13q14.13q14.2(46,722,034-49,139,504)×1							
				Xq22.1q22.3(99,700,785-106,311,924) hmz							
3	61	F	primary	Trisomy 8		CALR del	146,138	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)add(20)(q13)							
4	48	F	primary	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	46,XX,del(7)(q22)add(20)(q13)	OGG1, VHL	18,397	CALR del			
				46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)							
				46,XX,add(20)(q13)							
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
7	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	MAD1L1	4,639	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	EGFR	18,103	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	3,686	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	CDKN1B	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)							
8	47	F	primary	46,XX,del(7)(q22)del(12)(q21)add(20)(q2)	46,XX,del(12)(q21)add(20)(q10)	POT1	14	CALR del			
				46,XX,del(7)(q22)del(1							

Table 1 (continued)

Patient	Age, years	Sex	Type	CMA results	Karyotype	Mapped cancer genes	Size, kb	Driver mutations
12	66	M	Pos-ET	4p15.3p15.1(17,707,300-30,328,979) hnz 5q35.1q35.3(171,766,824-180,692,321) hnz 9p24.3p13.3(216,123-34,431,079) hnz 12q22q23.2(95,963,706-102,978,696) hnz 19p13.3p13.12(260,911-14,742,924) hnz 22q11.1q11.22(16,888,899-23,275,341) hnz	46,XY	JAK2, MTAP, CDKN2A	12,622 8,925 34,215 7,015 14,482 6,386	JAK2
14	69	M	primary	2p13.1p11.3(74,139,628-89,129,064) hnz 6q22.31q23.2(122,165,276-134,129,708) hnz 7q31.3q36.3(122,153,555-155,964,676) hnz 11p14.3p13(24,549,526-35,437,736) hnz		POT1, SMOH, BRAF LMO2	14,989 11,964 33,811 10,888	JAK2
15	48	F	primary	1p33p31.1(47,858,053-69,907,944) hnz 2p13.2q13(71,835,787-113,889,134) hnz 2q11.1q13(95,341,387-113,889,134) hnz 3q11.1q22.1(93,536,053-131,849,410) hnz 3p13q22.1(72,568,037-131,849,410) hnz 6p22.3p12.3(15,735,087-49,880,005) hnz 7q21.1q22.1(83,470,313-103,219,027) hnz 9q33.1q33.2(120,027,912-125,306,402) hnz 10q25.1q26.13(107,670,340-124,523,169) hnz 11q12.1q13.5(56,930,833-76,123,829) hnz 11p11.2p11.12(46,304,337-51,563,636) hnz 15q1.4q21.3(39,625,545-57,874,494) hnz 16p13.2p13.11(9,182,576-16,159,628) hnz Xp11.3p11.1(43,815,818-58,337,890) hnz Xp21.1p11.4(34,218,865-40,790,309) hnz Xq11.1q13.1(61,932,503-68,422,477) hnz	46,XX	TMEM127, BUB1, IL1B, ILRN GATA2 DEK, GGB MXI1 CCND1, NUMA1 BUB1B	22 42,053 18,548 38,313 59,281 34,145 19,749 5,278 16,853 19,193 5,259 18,249 6,977 14,522 6,571 6,490	CALR del
8	57	M	primary	normal	46,XY			CALR del
10	81	M	primary	normal	46,XY			negative
11	67	F	primary	normal	46,XX			CALR inst
13	38	M	primary	normal	46,XY			CALR inst
16	35	M	primary	normal	46,XY			CALR del

Copy-Neutral LOH in Myelofibrosis

Cytogenet Genome Res
DOI: 10.1159/000487627

5

Fig. 2. Graphical representation of several CN-LOH of different chromosomes (indicated by red blocks) found by chromosomal microarray analysis in patient 15.



ties, varying from 2 to 13 CNVs or CN-LOHs. CMA did not disclose any alterations in 5 patients 8, 10, 11, 13, and 16.

CMA Detection Rate of Numerical and Structural Chromosome Imbalances

Presumed pathogenic CNVs were identified in 6/16 patients (37.5%). One patient had a single copy number imbalance without CN-LOH. Regarding the 14 deletions detected, 7 were identified in a single patient who had 2 complex chromosome rearrangements involving chromosomes 7 and 12 (Fig. 1). All patients with deletions also had at least 1 CN-LOH. Only 1 microduplication was identified in a patient with multiple imbalances and CN-LOHs.

Detection Rate of Copy-Neutral LOH

We identified 43 CN-LOH in our sample, distributed among 10 patients, ranging from 1 to 13 segments of CN-LOH (Fig. 2). Six patients had CN-LOH without copy number imbalances. One patient presented a single CN-LOH of chromosome 11 without any other CN-LOH or imbalance. CN-LOH size varied from 5.2 to 823 Mb, with a median size of 14.25 Mb. Three CN-LOH were in mosaic state, as inferred by the SNP distribution (Fig. 1).

Driver Mutation Status

Mutational status for *JAK2*, *CALR*, and *MPL* by MLPA revealed a total of 3/16 (18.7%) patients positive for the *JAK2* V617F mutation, 9 with *CALR* deletion or insertion, and 1 positive for *MPL* mutation (Table 1).

Discussion

Cytogenetic abnormalities play an important role in the pathogenesis of MF. In previous studies, one-third of the patients with MF showed karyotype abnormalities at diagnosis. In these patients, the number of alterations increased as the disease progressed [Hussein et al., 2009]. The most frequent abnormalities in MF are del(20q), del(13q), +8, +9, and abnormalities of chromosomes 1 and 7 [Tefferi et al., 2001; Visani et al., 2011]. However, conventional karyotyping has a low resolution of up to 5–10 Mb. Thus, for the detection of minor chromosomal alterations, techniques with higher resolution are required. One of the standard molecular cytogenetic techniques for screening submicroscopic chromosomal alterations is CMA [Gondek et al., 2008].

In our sample, conventional cytogenetics disclosed chromosome abnormalities in 3 patients, while chromosomal microarray detected imbalances or LOH in a total of 11 patients.

CMA was concordant with karyotype results in 5 normal cases and in the patient with trisomy 8. In the patient with a 13q deletion, CMA revealed other submicroscopic imbalances in chromosomes 12, 14, and 19 as well as 2 segments of CN-LOH. The third patient with karyotype alterations had a complex chromosome rearrangement involving chromosomes 7, 12, and 20 that could be clarified by microarray analysis. Two patients had a normal karyotype, however CMA disclosed a submicroscopic CNV and LOH. The remaining 6 cases presented only LOH without chromosomal imbalances.

Previous studies showed the ability of such techniques in detecting novel genetic lesions in both myeloid and lymphoid disorders [Walker et al., 2006; Mohamedali et al., 2007; Visani et al., 2011; Sato-Otsubo et al., 2012]. Myeloid neoplasms are among the best targets for CMA as the results can be directly incorporated into their prognostic scores [Sato-Otsubo et al., 2012].

Our overall detection rate of abnormalities was 68%, close to previous reports. However, we had a low detection rate of CNVs (37.5%) compared to other studies (44–69%) [Tefferi et al., 2008; Rumi et al., 2011; Brecqueville et al., 2014; Hahm et al., 2015]. We could not identify any clinical bias between our study and those described in the literature that could reasonably explain this discrepancy. In addition, this difference should not be attributed to the limitation of CMA not to recognize chromosomal translocations [Tefferi et al., 2009] since those represent only 3–9% of the alterations in patients with MF [Tefferi et al., 2001; Hussein et al., 2009].

Driver mutations in *JAK2*, *CALR*, and *MPL* were identified in 13 patients. The frequency of *JAK2* V617F mutations in our sample is 18.7%, lower than previously described [Lian et al., 2017], with an increased frequency in *CALR* mutations (56.2%) and a single case with *MPL* mutation.

In recent years, a renewed interest in the molecular pathogenesis of myeloproliferative neoplasms was observed, notably after the discovery of *JAK2* V617F mutation. *JAK2* plays an important role in cell signaling and proliferation [Campbell et al., 2006; Tefferi et al., 2009; Vainchenker et al., 2017]. Mutations in this gene confer constitutive activation of the JAK-STAT and related pathways, promoting differentiation and proliferation of different cell lineages [Hahm et al., 2016]. It is still not understood whether the *JAK2* mutation is the first event in myeloproliferative neoplasms or secondary to other genetic and epigenetic events [Campbell et al., 2006; Tefferi et al., 2008, 2009].

Candidate genes potentially involved in disease initiation or progress are listed in Table 1. Since most patients present with several large alterations, we proposed the genes previously associated to hematological malignancies and other cancers as candidates. Sixty genes associated with cancer were identified, 11 of them previously described in hematological malignancies.

Patient 1 presents 8 CN-LOH segments of chromosomes 1q, 4q, 12q, 17q and Xq, in which several oncogenes have been mapped. For instance, the *PTPN11* (12q) and *STAT5B* (17q) genes have been associated with leukemia and non-Hodgkin lymphomas [Chen et al., 2013;

Liang et al., 2017]. Although the test for *JAK2* V617F mutation was positive, we did not identify CN-LOH of chromosome 9p.

Patient 2 has a complex set of rearrangements: 3 deletions (13q, 14q, and 19q), 1 duplication (14q), 1 CN-LOH (■■■■), and 1 mosaic CN-LOH (■■■■). The presence of a mosaic CN-LOH and non-mosaic rearrangement points to multiple cell lineages in the sample. The deletion in chromosome 13 includes *RBI*, a gene previously associated with multiple cancers including MF [Tam et al., 2009; Brecqueville et al., 2014].

The single alteration present in patient 3 is a trisomy of chromosome 8, a common chromosome abnormality associated with an unfavorable prognosis in MF [Hussein et al., 2009; Brecqueville et al., 2014; Mehrotra et al., 2015].

CMA analysis for patient 4 identified 2 complex rearrangements with multiple deletions in chromosomes 7 and 12. The *MAD1L1* gene, mapped to a deleted segment in chromosome 7p, is a checkpoint gene, whose deregulation is associated with chromosomal instability. Rare mutations in this gene have been reported in lymphoma, colon, and lung cancers [Tsukasaki et al., 2001]. This patient also presents with a mosaic CN-LOH of chromosome 12 and two others in chromosomes 3 and 18 (Fig. 1).

Patient 7 shows a deletion in the region encompassing the *NOTCH2* gene. The Notch signaling cascade is essential for cell proliferation and differentiation [Ranganathan et al., 2011]. A deregulated Notch pathway is found in various types of cancer such as T-cell leukemia, breast, and prostate cancers [Yuan et al., 2014].

CN-LOH of chromosome X including the *GATA* gene was identified in patient 15. The *GATA* family is essential to the development of many cell lineages, including hematopoietic, cardiac, and endodermal. *GATA1*, *GATA2*, and *GATA3* are needed for normal hematopoiesis, and their mutations are implicated on a variety of blood disorders, including MF [Dos Santos et al., 2011; Hahm et al., 2015; Mehrotra et al., 2015].

In addition, we identified 1 patient with LOH involving the *NUMA* gene. This leads to the disruption of the retinoic acid signaling pathway, and myeloid differentiation is arrested at the promyelocytic stage [Zhang et al., 2000].

CN-LOH as well as CNVs constitute markers of clonality. Previously undetected areas of clonal CN-LOH are frequently identified in various cancers, including hematologic malignancies [Maciejewski and Mufti, 2008]. However, their prognostic significance is still poorly understood, and the implementation of CMA as a routine

- Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, et al: Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 110:3365-3373 (2007).
- Mughal T, Vaddi K, Sarlis NJ, Verstovsek S: Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *Int J Gen Med* 7:89-101 (2014).
- O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP: Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* 115:2731-2739 (2010).
- Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ: Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11:338-351 (2011).
- Rumi E, Harutyunyan A, Elena C, Pietra D, Klampfl T, et al: Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 86:974-979 (2011).
- Salati S, Zini R, Nuzzo S, Guglielmelli P, Pennucci V, et al: Integrative analysis of copy number and gene expression data suggests novel pathogenetic mechanisms in primary myelofibrosis. *Int J Cancer* 138:1657-1669 (2016).
- Sato-Otsubo A, Sanada W, Ogawa S: Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when and how? *Semin Oncol* 39:13-25 (2012).
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, et al: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528 (2004).
- Singh NR, Morris CM, Koeth M, Wong K, Ward CM, Stevenson WS: Polyploidy in myelofibrosis: analysis by cytogenetic and SNP array indicates association with advancing disease. *Mol Cytogenet* 6:59 (2013).
- Tam CS, Abruzzo LV, Lin KL, Cortes J, Lynn A, et al: The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood* 113:4171-4178 (2009).
- T Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW: Cytogenetics findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 113:763-771 (2001).
- Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj AP, Schwager S, Pardanani A, et al: 20+ yr without leukemic or fibrotic transformation in essential thrombocythemia or polycythemia vera: predictors at diagnosis. *Eur J Haematol* 80:386-390 (2008).
- Tefferi A, Sirhan S, Sun Y, Lasho T, Finke CM, et al: Oligonucleotide array CGH studies in myeloproliferative neoplasms: comparison with *JAK2V617F* mutation status and conventional chromosome analysis. *Leuk Res* 33:662-664 (2009).
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, et al: *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 28:1472 (2014).
- Tsukasaki K, Miller CW, Greenspun E, Eshaghian S, Kawabata H, et al: Mutations in the mitotic check point gene, *MAD1L1*, in human cancers. *Oncogene* 20:3301-3305 (2001).
- Vainchenker W, Kralovics R: Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myelofibrosis neoplasms. *Blood* 129:667-679 (2017).
- Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F, Pancrazzi A, Torre E, et al: A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF- β 1 in the development of myelofibrosis. *Blood* 105:3493-3501 (2005).
- Visani G, Sapienza MR, Isidori A, Tripodo C, Laginestra MA, et al: SNPs array karyotyping reveals a novel recurrent 20p13 amplification in primary myelofibrosis. *PLoS One* 6:e27560 (2011).
- Walker BA, Morgan GJ: Use of single nucleotide polymorphism-based mapping arrays to detect copy number changes and loss of heterozygosity in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 7:186-191 (2006).
- Walker BA, Leone PE, Jenner MW, Li C, Gonzalez D, et al: Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 108:1733-1743 (2006).
- Yuan X, Wu H, Han N, Xu H, Chu Q, et al: Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J Hematol Oncol* 7:1-38 (2014).
- Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, Chen Z: Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci* 25:275-284 (2000).