

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

***ANÁLISE DO COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMEROS E INVESTIGAÇÃO
DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM PACIENTES COM MIELOFIBROSE.***

Tese de doutorado apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília (UnB).

Autor(a): Fernanda Penna Lima Guedes de Amorim
Orientador(a): Prof.(a) Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília
2022

Para minha mãe, Angela

AGRADECIMENTOS

À Profa. Juliana Forte Mazzeu, minha orientadora, primeiramente, agradeço imensamente pela oportunidade, pelo incentivo, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim durante todo esse processo e pela amizade de trinta anos. Serei eternamente grata!

À minha família, em especial ao meu marido, Rodrigo e meus filhos, meu porto seguro, pai, mãe, irmãos, sogro e sogra, por sempre me apoiarem, estarem em todos os momentos em que precisei, pelo amor, carinho, incentivo, entendimento em tantos momentos de ausência e confiança depositados em mim.

À Profa Érica C. C. Caldas Rosa pelo auxílio inestimável na realização e na análise dos PCRs e CMAs.

Aos médicos hematologistas, Alexandre Nonino e Juliana Minuncio, pela identificação dos casos, coleta dos dados clínicos e dedicação aos pacientes.

A todos os pacientes e seus respectivos familiares que participaram espontaneamente da pesquisa e tornaram esta dissertação possível.

A todos os professores, funcionários e colegas dos laboratórios de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela coleta, preparo e armazenamento das amostras utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Milton Rego de Paula Júnior e Rafael S. Bonadio, pelo apoio na realização dos CMAs.

RESUMO

A mielofibrose (MF) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica, rara, caracterizada por fibrose progressiva da medula óssea, hematopoiese ineficiente e sobrevida reduzida. Mutações driver de genes *JAK2*, *MPL* ou *CALR* são encontrados em aproximadamente 90% dos pacientes, enquanto os 10% restantes sem mutações driver são denominados “triplo negativos”. Essas mutações driver podem ser acompanhadas de outras mutações, denominadas cooperativas, como *RBI*. Estudos têm indicado o tamanho reduzido do telômero na mielofibrose, sugerindo uma relevância prognóstica para este biomarcador. Além disso, atualmente, sabe-se que a caracterização genômica dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMP) pode levar a uma melhor classificação diagnóstica, avaliação prognóstica e planejamento do tratamento. Os objetivos do estudo foram: 1) investigar o comprimento relativo do telômero (T/L) em pacientes com MF, 2) analisar se existe uma relação entre o T/L e o tipo de mutação driver existente, sexo e o International Prognostic Scoring System (IPSS) e 3) realizar análise cromossômica por Microarray (CMA) e correlacionar os achados citogenéticos obtidos por CMA com a mediana de sobrevida global. T/L foi analisado em amostras de sangue periférico de 36 pacientes com MF e 42 controles pareados por idade. T/L foi determinado por PCR quantitativo em tempo real. Redução significativa no comprimento relativo dos telômeros foi observada entre os pacientes com MF em comparação com o grupo controle. O T/L de pacientes com mutação *JAK2V617F* positiva e mutação *JAK2V617F* negativa foi significativamente reduzido em ambos os grupos quando comparados aos controles. Os resultados do presente estudo mostraram que a T/L está reduzida em pacientes com MF, independentemente da presença da mutação driver *JAK2V617F*. O CMA mostrou que setenta e seis por cento dos pacientes tinham regiões de ganho ou perda cromossômica e/ou áreas de perda de heterozigose (LOH). Os pacientes que tiveram uma sobrevida

mediana menor (3,7 meses) apresentaram alterações cromossômicas ou LOH em regiões que abrigavam genes supressores de tumor (*NF1*, *RBI*, *TP53*, *DNMT3A*, *PPM1D*). O presente estudo mostrou a possibilidade de melhor caracterização prognóstica de pacientes com mielofibrose através da análise cromossômica por Microarray (CMA).

Palavras - chave: Neoplasias Mieloproliferativas, Comprimento relativo do telômero (T/L), Mielofibrose, Mutações driver, *JAK2*, Microarranjo Cromossômico, Rearranjos Cromossômicos, Perda de Heterozigose

Abstract

Myelofibrosis (MF) is a rare chronic myeloproliferative neoplasm characterized by progressive bone marrow fibrosis, inefficient hematopoiesis, and reduced survival. Driver mutations of *JAK2*, *MPL* or *CALR* genes are found in approximately 90% of patients, while the remaining 10% without driver mutations are termed “triple negative”. These driver mutations can be accompanied by other mutations, called cooperative mutations, such as *RBI*. Studies have indicated reduced telomere length in myelofibrosis, suggesting prognostic relevance for this biomarker. Furthermore, nowadays it is known that the genomic characterization of patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) can lead to better diagnostic classification, prognostic assessment and treatment planning. The aims of the study were: 1) to investigate the relative length of the telomere (T/L) in MF-patients, 2) to analyze whether there is a relationship between the T/L and the existing type of driver mutation, sex and the International Prognostic Scoring System (IPSS), and 3) to perform chromosomal analysis by Microarray (CMA) and correlate the cytogenetic findings obtained by CMA with the median of overall survival. T/L was analyzed in

peripheral blood samples from 36 MF-patients and 42 age-matched controls. T/L was determined by quantitative real-time PCR. Significant reduction in relative telomere length was observed among MF-patients compared to the control group. The T/L of patients with *JAK2V617F* positive mutation and *JAK2V617F* negative mutation was significantly reduced in both groups when compared to controls. Results from the present study showed that T/L is reduced in MF-patients, regardless of the presence of the *JAK2V617F* driver mutation. CMA showed that seventy-six percent of patients had regions of chromosomal gain or loss or areas of heterozygous loss (LOH). Patients who had a lower median survival (3.7 months) had chromosomal alterations or LOH in regions that harbored tumor suppressor genes (*NF1*, *RBI*, *TP53*, *DNMT3A*, *PPM1D*). The present study showed a possibility of better prognostic characterization of patients with myelofibrosis through chromosomal analysis by Microarray (CMA).

Keywords: Myeloproliferative Neoplasms, Telomere Length, Myelofibrosis, Driver Mutations, JAK2, Chromosomal Microarray, Chromosome Rearrangements, Loss of Heterozygosity

Sumário

1- Introdução e Revisão da Literatura -----	13
1.1- Classificação das Neoplasias Hematológicas -----	13
1.2 - Neoplasias Mieloproliferativas Clássicas -----	14
1.3 – Mielofibrose -----	16
1.3.1 – Epidemiologia -----	17
1.3.2 – Mutações driver e cooperativas -----	17
1.3.3 - Etiologia e patogênese da MFP -----	23
1.3.4 – Manifestações clínicas -----	26
1.3.5 - Diagnóstico -----	27
1.3.6 - Prognóstico -----	31
1.3.7 - Estratificação do risco -----	32
1.3.8 – Tratamento -----	35
1.4 – Telômeros -----	37
2 - Objetivos	
2.1 – Objetivo Geral -----	41
2.2 – Objetivos Específicos -----	41
3- Capítulo 1: ARTIGO	
3.1 - Título: Correlação do comprimento dos telômeros com parâmetros clínico- patológicos na mielofibrose -----	43
4- Capítulo 2: ARTIGO	
4.1 – Título: Análise cromossômica por Microarray (CMA) de uma coorte de pacientes com mielofibrose -----	44
5- Conclusões-----	72
6- Referências Bibliográficas -----	74

Lista de Abreviaturas

aCML- Leucemia mieloide crônica atípica

ASXL1 – Regulador transcricional 1

CALR – Calreticulina

CBL - Linfoma de linhagem B Casitas

CGH - Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*)

CHIP - Hematopoiese Clonal de Prognóstico Indeterminado (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Significance*)

CMA – Análise Cromossômica por *Microarray* (*Chromosome Mycroarray Analysis*)

CN–LOH - Perda de Heterozigose com Número de Cópias Neutro (*Copy Number Neutral Loss of Heterosigosity*)

CNV – Variação do Número de Cópias (*Copy Number Variation*)

COSMIC – Banco de dados on-line de mutações (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*)

CSF1 - Fator de Crescimento de Monócitos/Macrófagos (*Colony Stimulating Factor-1*)

CTH – Células Tronco Hematopoieticas

CTL – Células Tronco Leucêmicas

DIPSS – Sistema de Pontuação de prognóstico Intenacional Dinâmico (*Dynamic International Prognostic Scoring System*)

DNMT3A - DNA metiltransferase

Epo – Eritropoetina

EZH2 - Histona H3 lisina 27 metiltransferase

FC - Fatores de Crescimento

FISH - Hibridizacão *In-Situ* por Fluorescência (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

FMO – Fibrose de medula óssea

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

GIPSS – Sistema de pontuação prognóstica geneticamente inspirado para mielofibrose primária

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias Granulocito-Macrofago (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GST – Gene Supressor de Tumor

GWAS - Estudos de Associação Genômica Ampla (*Genome-wide Association Studies*)

IHBDF – Instituto Hospital de Base do Distrito Federal

HR – Razão de Risco (*Hazard Ratio*)

IC – Intervalo de Confiança

IDH 1/2 - Isocitrato desidrogenase 1/2

IL3 – Interleucina 3

IKZF1 – proteína de ligação ao DNA Ikaros

IPSS – Sistema de escore prognóstico internacional (*International Prognostic Scoring System*)

JAK2 – Janus-quinase 2

Kb – quilobases

LDH - lactato desidrogenase

LFS – sobrevida livre de progressão

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crônica

LNK – proteína adaptadora SH2B3 (homologa Src 2 B3, SH2B3)

LOH – Perda de Heterozigose (*Loss of heterozygosity*)

MAPK – Proteína quinase específica da família de serina/treonina (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAR – Regiões Minimamente Afetadas (*Minimally Affected Region*)

Mb – megabases

MF – Mielofibrose

MFP – Mielofibrose Primária

MIPSS 70 + V20 – Escore prognóstico internacional mutação e cariótipo

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MPL – Receptor de Trombopoetina

NFE2 - fator nuclear E2

NGS – Sequência de nova geração - *Next Generation Sequencing*

NMP – Neoplasias Mieloproliferativas

OMIM – Base de dados que cataloga todas as doenças humanas que tenham uma componente genética - *Online Mendelian Inheritance in Men*

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG - Perfil de expressão gênica

PI3K - Fosfatidil-Inositol Quinase 3 (*Phosphatidylinositol Kinase-3*)

PPMD1 - proteína fosfatase induzível por p53 1

PV – Policitemia Vera

KMT2C / MLL3 - lisina N-metiltransferase 2C / proteína de leucemia de linhagem mista 3

RE – Reticulo Endoplasmático

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa

ROC - Característica de Operação do Receptor (*Receiver Operating Characteristic*)

SDF1 - *Stromal Derived Factor-1*

SF3B1 - Fator de emenda 3b 1

SIFT - *Separate Tolerable from Intolerable*

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SRSF2 -Fator de emenda, rico em arginina / serina 2

ST – Sobrevida total

STAT - *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TE – Trombocitemia Essencial

TEV – Tromboembolismo Venoso

TET2 - Membro da família do oncogene TET 2

TGF-Beta – Fator de crescimento beta

TN – Triplo Negativo

TP53 - Proteína tumoral p53

TPO – Trombopoetina

WBC - Glóbulos brancos

U2AF1 - Fator de emenda U2AF1

1-Introdução e Revisão da literatura

As neoplasias hematológicas são aquelas originárias de células da linhagem hematopoiética (leucemias) e do sistema imunitário (mielomas e linfomas) (12).

Anormalidades cromossômicas clonais adquiridas estão presentes nas células tumorais de muitas malignidades hematológicas. Certas anormalidades citogenéticas estão intimamente (às vezes de forma única) associadas a subconjuntos morfológicamente ou clinicamente distintos de leucemias ou linfomas e, em muitos casos, a análise citogenética é importante para diagnóstico, estratificação de tratamento, estimativa de prognóstico ou distinção de populações de células benignas de malignas (82).

1.1 - Classificação das Neoplasias Hematológicas

Uma classificação operacional das neoplasias hematológicas distingue as neoplasias linfoides das mieloides; por sua vez, cada uma dessas categorias é classificada como aguda ou crônica, dependendo da proporção de precursores morfológicos e imunofenotipicamente imaturos (blastos) na medula óssea ou no sangue periférico.

Assim, as neoplasias hematológicas mieloides são divididas em leucemia mieloide aguda (LMA; 20% ou mais de blastos na medula óssea ou no sangue periférico) e os distúrbios mieloides crônicos (blastos na medula óssea ou no sangue periférico inferiores a 20%). No entanto, na presença de certas anormalidades citogenéticas recorrentes (por exemplo, translocação (8;21), inversão (16)), é feito um diagnóstico de LMA independentemente da contagem de blastos (19,36,38,39,40).

Os distúrbios mieloides crônicos abrangem várias entidades clínico-patológicas. Conceitualmente, eles podem ser organizados naqueles que exibem displasia morfológica significativa nas linhagens eritroide e/ou granulocitária (síndromes mielodisplásicas e

neoplasias mielodisplásicas/sobrepostas mieloproliferativas) ou naquelas que não apresentam alterações displásicas, neoplasias mieloproliferativas (NMP) (19).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são caracterizadas por displasia celular, graus variáveis de citopenias sanguíneas periféricas e hiperplasia da medula óssea (ou menos frequentemente, hipoplasia). O paradoxo da medula óssea proliferativa juntamente com citopenias sanguíneas periféricas na SMD pode ser explicado pelo aumento da apoptose das células precursoras mieloides intramedulares (18,19).

As neoplasias mieloproliferativas (NMP), ao contrário da SMD, geralmente exibem expansão celular terminal mioide no sangue periférico (36,38,39,40). As NMPs incluem policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), leucemia mielóide crônica (LMC), mielofibrose primária (MFP), leucemia neutrofílica crônica e outras entidades menos bem definidas, como leucemia eosinofílica crônica, não categorizadas de outra forma (33,34,35,37,45).

As neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP) incluem distúrbios que manifestam características displásicas e proliferativas. Estes incluem leucemia mielomonocítica crônica, leucemia mielomonocítica juvenil, LMC atípica (aCML, BCR-ABL1 negativa), NMD/NMP com sideroblastos de anel e trombocitose e NMD/NMP não classificável (33,34,35,37,45).

1.2 - Neoplasias Mieloproliferativas Clássicas

São quatro as NMPs clássicas, PV, MFP, TE, LMC dentre elas, apenas a LMC é geneticamente caracterizada por translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (76).

Essa translocação t(9;22) está associada ao cromossomo 22 (o cromossomo Filadélfia) em 95% dos casos (38). Nos demais casos, a t(9; 22) pode ser demonstrada por FISH ou RT-PCR para detecção do rearranjo BCR-ABL1 (76, 77).

Assim, com as descobertas dos mecanismos moleculares envolvidos nas NMPs, a Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com sua última revisão em 2016, classifica as neoplasias mieloides crônicas de acordo com a presença ou ausência do cromossomo Filadélfia (gene de fusão BCR/ABL1) classificando de NMP positivo para BCR/ABL1, a leucemia mieloide crônica (LMC) que é responsável por 15 a 20% das leucemias em todo o mundo, com incidência de 1 a 2/100.000 (76).

Embora anormalidades citogenéticas sejam comuns na MFP (aproximadamente 30% no momento do diagnóstico) e incomum na TE (aproximadamente 5% no momento do diagnóstico), nenhuma anormalidade citogenética específica foi associada à NMPs além da LMC (36) sendo classificadas como pertencentes ao grupo de NMPs definidas como doenças BCR/ABL1 negativos (76).

Dentre os principais critérios de NMP negativa para BCR/ABL1, destaca-se a presença de variantes em genes driver, assim como o gene Janus quinase 2 (*JAK2* — HGNC: 6192), o gene receptor de trombopoietina (*MPL* — HGNC: 7217) e o gene da calreticulina (*CALR* -HGNC: 1455). Variações nesses genes, classificadas como mutações condutoras, são determinantes no fenótipo clínico observado nas NMPs e resultam na ativação constitutiva de vias de sinalização intracelular. Geralmente, essas variações genômicas são consideradas mutuamente exclusivas entre entidades negativas para BCR/ABL1, e sua ausência não exclui seu diagnóstico. No entanto, duas variantes podem ser encontradas no mesmo indivíduo, provavelmente de diferentes subclones neoplásicos e aqueles que estão frequentemente associados à progressão da doença. (19,36,38,39,40,41,42, 77).

Embora *JAK2* V617F esteja ligado à herança autossômica dominante, a maioria dos casos de herança familiar não está associada a variantes do gene *JAK2*. No entanto,

mutações no *EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *HIF* e *EGLN* gene foram encontrados em casos de policitemia familiar congênita (77).

Em TE e MFP, 12% dos pacientes não apresentam nenhuma das mutações *driver* e são chamados de triplo-negativos (77).

- A PV é considerada presente quando um aumento inexplicável de hematócrito/ massa de glóbulos vermelhos é acompanhado pela presença de uma mutação *JAK2*.
- A MFP (ou metaplasia mieloide agnogênica, mielofibrose com metaplasia mieloide, mielofibrose idiopática crônica) é caracterizada pela presença de fibrose da medula óssea que não pode ser atribuída a outro distúrbio mieloide, como LMC, PV, TE ou SMD. No entanto, deve-se notar que o fenótipo morfológico do MFP pode existir sem a presença de fibrose evidente da medula óssea (isto é, MFP pré-fibrótico).
- TE é um diagnóstico de exclusão, representando trombocitose clonal ou autônoma não classificável como PV, MFP, LMC ou SMD.

1.3 – Mielofibrose

A mielofibrose primária (MFP) é uma neoplasia mieloproliferativa (NMP) crônica, caracterizada coletivamente pela proliferação clonal de células mieloides com maturidade morfológica variável e eficiência hematopoiética, associada a fibrose da medula óssea, citopenias, sintomas constitucionais, hepatoesplenomegalia e / ou hematopoiese extramedular.

A MFP tem o prognóstico menos favorável dentre as NMPs e os pacientes correm risco de morte prematura devido à progressão da doença, transformação leucêmica, complicações trombo-hemorrágicas e infecções (41,42).

O processo primário da MFP é um distúrbio clonal de células-tronco hematopoiéticas que resulta em mieloproliferação crônica e hiperplasia megacariocítica atípica. O processo secundário de fibrose da medula óssea (FMO) é o resultado da proliferação fibroblástica e hiperatividade não clonais induzidas por fatores de crescimento anormalmente desprovidos de megacariócitos clonais expandidos. A FMO é a marca registrada do MFP e contribui para a hematopoiese prejudicada que leva à anemia grave (46).

1.3.1 – Epidemiologia

A mielofibrose (MF) é a menos frequente dentre as doenças mieloproliferativas crônicas.

A MF ocorre principalmente em adultos de meia idade e mais velhos. A idade média de apresentação é de 67 anos (1). Aproximadamente 5 e 17% dos pacientes são diagnosticados antes dos 40 e 50 anos, respectivamente (2). A condição é rara na infância. As formas familiar e idiopática na infância podem estar associadas a anomalias congênitas e anormalidades cromossômicas (3).

1.3.2 – Mutações driver e cooperativas

Na MFP as mutações driver *JAK2*, *CALR* e *MPL* são frequentes e ocorrem de forma mutualmente exclusiva (21-25). Mutação no gene *JAK2* ocorre em 60 a 65% dos pacientes, *CALR* de 20 a 25% e mutação em *MPL* 7%. A caracterização genômica de 2035 pacientes com essas NMPs descobriu que uma dessas três mutações era a única anormalidade genética em 45% dos pacientes. Aproximadamente 8 a 10% dos casos de MF carecem de mutações convencionais em *JAK2*, *CALR* e *MPL* (ou seja, NMPs "triplos negativos") (21-25).

Mutações do gene *JAK2*, um gene encontrado no braço curto do cromossomo 9 (9p), parecem ser responsáveis pela hipersensibilidade das células progenitoras hematopoiéticas nas NMPs a fatores de crescimento e outras citocinas (41-42).

Essas mutações surgem preferencialmente em um haplotipo *JAK2* (chamado de 46/1 ou GGCC), encontrado em aproximadamente 50% dos indivíduos normais da população (77).

A mutação mais comum no gene *JAK2* é a substituição de uma fenilalanina por uma valina na posição 617 no domínio JH2 ou pseudoquinase (*Val617Phe, V617F*), que regula negativamente o domínio cinase, causando a ativação independente de citocinas do *JAK-STAT*, outras vias implicadas na sinalização do receptor de eritropoietina (EPO) e a via da fosfatidilinositida-3 quinase (*PI3K*) que regula a apoptose (77).

Uma única mutação de ponto de ganho de função no *JAK2* no exon 14 ou 12 foi identificada em praticamente todos os pacientes com PV, e em 60 a 65% daqueles com TE e MF. A presença de mutações *JAK2* em colônias eritróides independentes da EPO vincula essa mutação à hipersensibilidade aos fatores de crescimento (36,38,39,40).

Mutações do gene da Calreticulina (*CALR*), foram observadas em aproximadamente 70% dos pacientes com TE ou MF que não apresentam mutação no *JAK2* ou no *MPL* e raramente foram observados em pacientes com PV; todas as mutações *CALR* conhecidas envolvem mutações de deslocamento no éxon 9 que geram uma proteína mutante com um novo terminal C. A *CALR* codifica uma proteína também conhecida como alregulina, é uma proteína de ligação ao Ca⁺ localizada principalmente no retículo endoplasmático (RE), mas também é encontrada no núcleo, nas membranas celulares e na matriz extracelular (21-25).

O gene *CALR* está localizado no cromossomo 19p13.2 e contém nove éxons. A região C-terminal da calreticulina de tipo selvagem inclui um domínio de ligação ao cálcio e um motivo de retenção no retículo endoplasmático (21-25).

As funções normais da calreticulina incluem o dobramento adequado de glicoproteínas recém-sintetizadas dentro do RE e a modulação da homeostase do cálcio; as mutações associadas ao TE e a MF perturbam os domínios de retenção do retículo de ligação ao cálcio e endoplasmático. Essas mutações parecem alterar a função da proteína, resultando em crescimento independente da citocina e ativação da sinalização JAK/STAT que é sensível à inibição farmacológica da *JAK2*. O *CALR* mutante interage diretamente com o receptor da trombopoietina (*MPL*), resultando na ativação constitutiva do *MPL* e das moléculas de sinalização na via JAK/STAT (72).

Mais de 50 mutações diferentes no *CALR* foram descritas, mas uma deleção de 52 pares de bases (tipo 1), ou uma inserção de 5 pares de bases (tipo 2) representam mais de 80% das mutações (21-25).

Mutações no gene *MPL*, identificadas em 2006, foram descritas em 5% dos pacientes com MF e 1% de pacientes com TE. Essas mutações não são encontradas em pacientes com PV. São mutações de ponto do códon 515 (W515L e W515K) e, menos frequentemente, em S505N, do gene que codifica o receptor de Trombopoetina (*MPL*). Foram observadas em 16 de 143 pacientes (11%) com TE e em 3 de 32 pacientes (9%) com MF. Em outro estudo com 603 pacientes com MF, *MPL* mutante foi detectado em 8,1% e *JAK2 V617F* em 58%. A análise multivariada não revelou diferença significativa na sobrevida livre de doença ou na evolução para leucemia aguda entre os grupos com mutação no *MPL* e com mutação no *JAK2* (23,25,72).

Além de *JAK2*, *CALR* e *MPL*, os genes que são mais comumente mutados em PV, TE e MFP são (72): *TET2* (TET oncogene family member 2), *ASXL1* (Additional sex

combs 1), *DNMT3A* (aDNA methyltransferase), *CBL* (Casitas B-lineage lymphoma), *TP53* (Tumor protein p53), *PPMD1* (p53-inducible protein phosphatase 1), *SRSF2* (Splicing factor, arginine/serine-rich 2), *U2AF1* (Splicing factor U2AF1), *KMT2C/MLL3* (Lysine N-methyltransferase 2C/mixed-lineage leukemia protein 3), *SF3B1* (Splicing factor 3b 1), *NFE2* (Nuclear factor E2), *EZH2* (histone H3 lysine 27 methyltransferase), *LNK* (Src homology 2 B3, SH2B3), *IDH 1/2* (Isocitrate dehydrogenase 1/2), *IKZF1* (IKAROS family zinc finger 1) (tabela 1)

Quadro 1. Mutações somáticas na mielofibrose primária (PMF) e nas neoplasias mieloproliferativas negativas de BCR-ABL1 intimamente relacionadas (MPN), incluindo policitemia vera (PV) e trombocitemia essencial (ET)

Genes e principais mutações	Localização cromossômica	Frequência da mutação	Relevância na patogênese da doença
<i>Jak 2</i> (<i>Janus kinase 2</i>) <i>JAK2V617F</i> exon 14	9p24	PV ~ 96% ET ~ 55% PMF ~ 65%	Contribui para mieloproliferação anormal e hipersensibilidade ao fator de crescimento de células progenitoras
<i>JAK 2</i> exon 12	9p24	PV ~ 3%	Contribui principalmente para a mieloproliferação eritroide
<i>CARL</i> (calreticulina) Exon 9 deleções e inserções	19p13.2	PMF ~ 25% ET ~ 20% PV 0%	<i>CALR</i> de tipo selvagem é uma chaperona de proteína de ligação ao Ca ²⁺ multifuncional localizada principalmente no retículo endoplasmático
<i>MPL</i> (vírus oncogene da leucemia mieloproliferativa) Mutações <i>MPL</i> associadas a NMP envolvem exon10	1p34	ET ~ 3% PMF ~ 10%	Contribui principalmente para a mieloproliferação megacariocítica
<i>LNK</i> (como em Links) também conhecido como <i>SH2B3</i> (uma proteína de ligação de membrana) As mutações associadas ao NMP foram monoalélicas e envolveu o exon 2	12q24.12	PV ~ raro ET ~ raro PMF ~ raro BP-MPN ~ 10%	<i>LNK</i> tipo selvagem é um regulador negativo da sinalização <i>JAK2</i>

<i>TET2</i> (Membro da família do oncogene <i>TET 2</i>) Mutações envolvem vários éxons	4q24	PV ~ 16% ET ~ 5% PMF ~ 17% BP-MPN ~ 17%	As proteínas <i>TET</i> catalisam a conversão de 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), o que favorece o DNA desmetilado. Tanto o <i>TET1</i> quanto o <i>TET2</i> exibem essa atividade catalítica. Mutações <i>IDH</i> e <i>TET2</i> podem compartilhar um efeito patogênico comum.
<i>ASXL1</i> Mutações do Exon	20q11.1	ET ~ 3% PMF ~ 13% BP-MPN ~ 18%	O <i>ASXL1</i> de tipo selvagem é necessário para hematopoiese normal e pode estar envolvido na coativação de fatores de transcrição e repressão transcricional.
<i>IDH1/IDH2</i> (Isocitrato desidrogenase) Mutações do Exon	2q33.3/ 15q26.1	PV ~ 2% ET ~ 1% PMF ~ 4% BP-MPN ~ 20%	Mutações de <i>IDH</i> induzem perda de atividade na conversão de isocitrato em 2-cetoglutarato (2-KG) e ganho de função na conversão de 2-KG em 2-hidroxiglutarato (2-HG). 2-HG pode ser o mediador da função <i>TET2</i> prejudicada em células com expressão de <i>IDH</i> <i>mutante</i> .
<i>EZH2</i> (potenciador de homólogo de zeste 2) Mutações envolvem vários éxon	7q36.1	PV ~ 3% PMF ~ 7% MDS ~ 6%	<i>EZH2</i> de tipo selvagem é parte de uma histona metiltransferase (complexo repressivo polycomb 2 associado a H3 Lys-27 trimetilação). Mutações <i>EZH2</i> associadas a NMP podem ter atividade supressora de tumor, que contrasta com a atividade de ganho de função para mutações <i>EZH2</i> associadas a linfoma.
<i>DNMT3A</i> (DNA citosina metiltransferase 3 a) Mutações mais frequentes afetam aminoácidos R882	2p23	PV ~ 7% PMF ~ 7% BP-MPN ~ 14%	As DNA metil transferases são essenciais para estabelecer e manter os padrões de metilação do DNA em mamíferos

<i>CBL</i> (Proto-Linfoma de linhagem B Casitas-oncogene) Mutações de éxon 8/9	11q23.3	PV ~ raro ET ~ raro MF ~ 6%	<i>CBL</i> é uma ligase de ubiquitina E3 que marca quinases mutantes para degradação. A atividade transformadora requer a perda dessa função.
<i>RAS</i> (Rat sarcoma viral oncogene homolg) KRAS-Kirsten RAS;HRAS-Harvey RAS;NRAS-Neuroblastoma RAS:Códons 12,13 ou 6	12p12.1 11p15.5 1p13.2S	PV ~ raro ET ~ 1% MF ~ 5%	As proteínas RAS abrigam atividade GTPase e sinalizam através dea via RAS-MAPK, que se torna desregulada como resultado de mutações
<i>IKZF1</i> (família IKAROS dedo de zinco 1) Principalmente deleções, incluindo intr.	7p12	CP-MPN ~ raroBP-MPN ~ 19%	<i>KZF1</i> é um regulador de transcrição e tumor putative supressor
<i>TP53</i> (proteína tumoral p53) Exons 4 -9	17p13.1	PMF ~ 4% BP-MPN ~ 27%	Uma proteína supressora de tumor que tem como alvo genes que regulam a parada do ciclo celular, apoptose e reparo
<i>SF3B1</i> (fator de emenda 3B subunidade 1) Exons 14 e 15	2q33.1	PMF ~ 7%	<i>SF3B1</i> é um componente do spliceossomo de RNA <i>SF3B1</i> mutações estão intimamente associadas com o anelsideroblastos
<i>SRSF2</i> (fator de splicing 2 rico em serina/arginina) Exon 2	17q25.1	PMF ~ 17%	O <i>SRSF2</i> é um componente do spliceossomo de RNA, cuja disfunção promove defeitos no splicing alternativo.
<i>U2AF1</i> (Auxiliar de RNA nuclear pequeno U2 Fator 1)	21q22.3	PMF ~ 16%	<i>U2AF1</i> é subunidade do pequeno núcleo nuclear U2 fator auxiliar de ribonucleoproteína envolvido na pré-processamento de mRNA

- Abreviaturas: BP-MPN, MPN da fase blástica; CP-MPN, MPN de fase crônica; TE, trombocitemia essencial; MF inclui mielofibrose PMF e pós-ET/PV; NMP, neoplasias mieloproliferativas; PMF, mielofibrose primária; PV, policitemia vera (76).

1.3.3 –Etiologia e patogênese da MFP

A causa exata da mielofibrose primária (MFP) é desconhecida. Considera-se que a MFP, juntamente com outros distúrbios mieloproliferativos crônicos, como a LMC, a PV e a TE, provém de uma mutação somática de uma célula progenitora hematopoiética pluripotente (39). Um "nicho" defeituoso de células-tronco na medula óssea foi postulado para MFP (41).

A ocorrência de mielofibrose, em uma minoria de casos, tem sido associada à exposição ao dióxido de tório, substâncias da fabricação de petróleo (especialmente tolueno e benzeno) e radiação ionizante. Uma maior incidência da doença foi observada em pacientes que receberam material de contraste radiográfico baseado em tório e em indivíduos expostos a bombas atômicas em Hiroshima (47,48,49).

Aproximadamente 50 a 60% dos pacientes com MFP apresentam anormalidades cariotípicas clonais no diagnóstico (36,38,39,40). No entanto, nenhuma dessas anormalidades é específica para esse distúrbio. Os achados mais comuns, responsáveis por 50 a 65% das alterações cariotípicas, são a exclusão de um segmento do cromossomo, na região onde está o gene do retinoblastoma, deleção 20q e trissomia parcial 1q. Pacientes com essas anormalidades citogenéticas têm um prognóstico pior (11,20,26).

Em um estudo com 884 pacientes com MFP os autores verificaram que alterações no carótipo são associadas a menor sobrevida global. Essas alterações incluem o cariótipo +8, -7 / 7q-, i (17q), -5 / 5q-, 12p-, inv (3) e rearranjo 11q23 (22).

Os ganhos do cromossomo 9 ou 9p também foram observados em estudos (13% a 50%), sugerindo que os genes no 9p podem desempenhar um papel crucial na patogênese do MFP. De interesse, mutações do *JAK2* (Janus quinase 2), um gene localizado em 9p, foram encontradas em aproximadamente 50% dos pacientes com MFP (76).

Várias mutações genéticas e polimorfismos de nucleotídeo único foram identificados em pacientes com MFP e outras neoplasias mieloproliferativas associadas à transformação leucêmica (28,29,30,31,32). Como exemplo, um polimorfismo A3669G do receptor glicocorticoide (GR) contribuiu para o fenótipo de excesso de mieloproliferação na MFP (por exemplo, maior número de glóbulos brancos, baço maior, maior frequência de células CD34 + no diagnóstico) e, em cooperação com a mutação *JAK2* V617F, aumentando o risco de transformação blástica (15,16,17,50).

Em 2005, foi relatado que o ganho adquirido de mutação funcional do gene *JAK2* nas células hematopoiéticas, resulta em uma ativação constitutiva do caminho de sinalização JAK-STAT, que causaria a ativação dos sinais proliferativos que sustentam a doença, pelo menos em seu início e curso inicial. Nos anos seguintes, foi identificado o ganho de mutações funcionais nos genes *MPL* e *CALR*, resultando também na ativação da via de sinalização JAK/STAT. Em cerca de 10% dos pacientes que são triplos negativos para mutações driver, a ativação da via JAK/STAT foi documentada como consequência de mutações que afetam genes que regulam negativamente a atividade *JAK2*, como *LNK*, enquanto em outros ocorre como consequência de mutações atípicas nos três genes driver (78).

O significado de *JAK2*, *MPL*, *CALR* e outras mutações na gênese dos NMPs, bem como seus papéis relativos na determinação do fenótipo da doença, transformação leucêmica e o nível de envolvimento de células-tronco nesses distúrbios ainda não são claros no momento. No entanto, dados de análises genômicas integradas sugerem que pacientes com PV, TE ou MF, independentemente do diagnóstico ou status mutacional do *JAK2*, são caracterizados por uma assinatura distinta da expressão gênica com regulação positiva dos genes alvo do *JAK-STAT*, demonstrando a importância central dessa via na patogênese das NMPs. (78).

Em células portadoras de *JAK2* V167F, foi visto que as funções inibitórias do domínio da pseudoquinase JH2 são interrompidas, resultando em superativação da via JAK/STAT. *JAK2* V167F em megacariócitos desempenhando um papel vital na manutenção do estado mieloproliferativo de células hematopoiéticas mutantes e não mutantes. A proliferação excessiva de células pode levar ao aumento da eritropoiese e fibrose. A falta de megacariócitos nos modelos *JAK2* V167F e *MPL* W515L BMT leva a policitemia e leucocitose significativamente aliviadas, indicando que a ativação da via JAK/STAT em megacariócitos está positivamente ligada à mieloproliferação e promove a progressão das NMP. Pacientes idosos podem adquirir mutações mais frequentes de *JAK*. Supõe-se que o aumento da idade pode ser um fator de risco crucial para a progressão das NMP (75).

A maioria dos pacientes com NMP apresenta inflamação crônica com aumento das citocinas pró-inflamatórias circulantes. É bem conhecido que a inflamação contínua pode contribuir para a progressão das NMP. Assim, a atividade da via JAK/STAT pode estar elevada em resposta a aumentos nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Estudos anteriores mostraram que as proteínas STAT3 ativadas podem promover a produção de citocinas em uma variedade de cânceres. O uso de um inibidor de *JAK2* para tratar camundongos com NMP resultou em níveis reduzidos de citocinas e sintomas sistêmicos atenuados. Nas NMPs, a ativação anormal na sinalização JAK/STAT é comumente acompanhada por mutações em tirosino quinases. É bem conhecido que a estimulação de TPO ativa JAK2-STAT3/5. Com mais investigações sobre as NMP, a importância do Lnk foi gradualmente percebida no campo. Lnk como um membro da proteína adaptadora tem um efeito negativo nas vias de sinalização ativadas por TPO-R/MPL em megacariopoiese ou HSCs. A falta de Lnk leva a uma interferência significativa na função hematopoiética de camundongos, incluindo um aumento de três vezes nos glóbulos brancos e plaquetas

na circulação, o acúmulo de células B com diferentes estados na medula óssea e no baço e a expansão de HSC. Dados de experimentos bioquímicos implicam que, em resposta à estimulação de TPO, o domínio SH2 de Lnk interage com o resíduo de tirosina fosforilado 813 (Y813) de JAK2, o que torna a ativação de *JAK2* suprimida para restringir a quiescência e autorrenovação de HSCs. Além disso, os estudos publicados revelam que a deficiência em Lnk mostrou sinalização avançada de JAK/STAT de maneira independente de citocina e o aumento da capacidade de *JAK2* oncogênico de promover a expansão de progenitores mieloides tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, os inibidores de *JAK* inibem linhagens celulares com deficiência de Lnk, sugerindo que o tratamento com inibidores de *JAK2* pode ser uma nova escolha para pacientes com NMP com deficiência de Lnk (75).

Em resumo, as mutações na MFP envolvem principalmente *JAK2*, mas também em menor extensão as mutações nos genes que atuam como reguladores epigenéticos da expressão gênica. Esses genes incluem modificadores epigenéticos (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1* e *2*, *EZH2* e *DNMT3A*), reguladores de RNA (*SRSF2*, *U2AF1* e *SF3B1*), supressores tumorais (*TP53*) e reguladores de sinalização de citocinas (*CBL*). Em particular, *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* e *IDH2* têm sido associados a um prognóstico pior (36,37,38,39,40, 78).

1.3.4 – Manifestações clínicas

A queixa mais comum na MF é a fadiga grave, ocorrendo em 50 a 70% dos pacientes (3,7,18,44).

Os sintomas devido ao aumento do baço foram descritos em 25 a 50% dos pacientes, enquanto um número menor observa perda de peso e 5 a 20% experimentam outros sinais de um estado hipermetabólico, como febre baixa, dor óssea e sudorese noturna (3,7). Aproximadamente 15 a 30% são assintomáticos, com o diagnóstico sendo

realizado durante a investigação de esplenomegalia (ocorrendo em pelo menos 90% dos pacientes), hepatomegalia (40 a 70%) ou achados anormais no sangue (3,10). O aumento do baço e do fígado deve-se à acentuada hematopoiese extramedular associada à MF.

A hipertensão pulmonar detectada em pacientes com MF; embora frequentemente assintomática, tem sido associada à redução da sobrevida global (5,6,51).

A incidência de eventos trombóticos arteriais e venosos na MF é de 2 em 100 pacientes/ano. Em uma análise retrospectiva de 205 pacientes com MF, 13,2% haviam experimentado um evento trombótico no momento ou antes do diagnóstico e 10,7% desenvolveram trombose pós-diagnóstico em um seguimento médio de 31 meses (8,9).

1.3.5 - Diagnóstico

Os pacientes com suspeita de mielofibrose procuram atendimento médico pela primeira vez apresentando um ou vários dos seguintes achados: sintomas sistêmicos inespecíficos, esplenomegalia, hepatomegalia (ambos devido à hematopoiese extramedular), anemia e contagem de plaquetas e glóbulos brancos (WBC) altos ou baixos. O esfregaço de sangue periférico fornece a primeira pista para o diagnóstico da doença. As características incluem glóbulos vermelhos em forma de lágrima e os achados leucoeritoblásticos característicos da mielofitose (substituição dos elementos normais da medula por fibrose ou tumor), eritrócitos nucleados e precursores de granulócitos (mielócitos, metamielócitos e blastos).

No entanto, um quadro de resultado laboratorial semelhante pode ser produzido por infiltração da medula óssea por câncer metastático (especialmente próstata ou mama) ou granuloma infeccioso. Assim, a biópsia da medula óssea é necessária para a identificação de fibrose e a ausência de aglomerados de células malignas ou granulomas.

Não existe um "padrão ouro" para o diagnóstico da MF, embora os critérios tenham sido propostos pela Sociedade Italiana de Hematologia, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e outros (33,34,35,37,45).

As revisões de 2016 dos critérios da OMS oferecem critérios de diagnóstico para pré-MF e MFP evidente e MF pós TE/PV (37,45). A distinção entre essas entidades é importante porque elas diferem em relação aos padrões de apresentação, sobrevivência e progressão da doença.

Avaliação diagnóstica - O diagnóstico de MFP e pré-MF requer biópsia da medula óssea (incluindo avaliação semiquantitativa da fibrose) e análise molecular. Na prática, a investigação diagnóstica deve incluir:

- **História clínica direcionada**, incluindo uma avaliação dos sintomas constitucionais, evolução da doença (com contagem sanguínea prévia quando disponível), transfusões anteriores, eventos trombóticos/ hemorrágicos e fatores de risco cardiovascular. O exame físico deve incluir uma avaliação do tamanho do baço por palpação.
- **Estudos laboratoriais**, incluindo um hemograma e análise do esfregaço de sangue periférico, bioquímica com função hepática e renal, eletrólitos, lactato desidrogenase (LDH) e ácido úrico. Deve-se realizar FISH ou RT-PCR para BCR-ABL1 para excluir a LMC.
- **Biópsia da medula óssea**. Esta amostra deve ser enviada para revisão patológica com manchas de tricrômico e reticulina, cariótipo e **teste molecular para mutações no JAK2**. Se o teste *JAK2* for negativo, o teste molecular será realizado para mutações *CALR* e *MPL*. Se estes forem negativos e o diagnóstico ainda for suspeito, a identificação de outras

mutações genéticas pode oferecer prova de clonalidade (mutação *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1 / IDH2*, *SRSF2* ou *SR3B1*).

O diagnóstico de MFP evidente pelos critérios da OMS de 2016 exige os três principais critérios a seguir e pelo menos um critério menor (34):

Critérios principais:

- Proliferação megacariocítica e atipia, acompanhadas de fibrose reticulina e / ou fibrose colágena graus 2 ou 3.
- Critérios da OMS para PV, TE, LMC, síndrome mielodisplásica (SMD) ou outra neoplasia mielóide não atendida.
- Demonstração de uma mutação *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou outro marcador clonal (mutação *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1 / IDH2*, *SRSF2* ou *SR3B1*) ou nenhuma causa identificável de fibrose reativa (por exemplo, infecção, distúrbio auto-imune, distúrbio inflamatório crônico), leucemia de células pilosas ou outra neoplasia linfóide, malignidade metastática ou mielopatia tóxica crônica).

Critérios menores (devem ser confirmados em duas medições consecutivas):

- Anemia não atribuível a uma condição comórbida.
- Leucocitose ≥ 11.000 / microL.
- Esplenomegalia palpável.
- LDH acima do limite superior do normal.
- Leucoeritroblastose

Pré-MFP - O diagnóstico de MFP pré-fibrótico precoce (pré-MFP) pode ser desafiador, pois a apresentação pode imitar a do TE. Os critérios da OMS exigem todos os três dos seguintes critérios principais e pelo menos um critério menor (34):

Critérios principais:

- Proliferação megacariocítica e atipia, sem fibrose reticulina > grau 1, acompanhadas por aumento da celularidade da medula óssea ajustada à idade, proliferação de granulócitos e, muitas vezes, diminuição da eritropoiese. A mielofibrose grau 1 é uma rede frouxa de reticulina com muitas interseções, principalmente em áreas perivasculares.
- Os critérios da OMS para PV, TE, LMC, SMD ou outra neoplasia mielóide não foram atendidos.
- Demonstração de uma mutação *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou outro marcador clonal (mutação *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1 / IDH2*, *SRSF2* ou *SR3B1*) ou nenhuma causa identificável de fibrose reativa (por exemplo, infecção, distúrbio auto-imune, distúrbio inflamatório crônico), leucemia de células cabeludas ou outra neoplasia linfóide, malignidade metastática ou mielopatia tóxica crônica).

Critérios menores (devem ser confirmados em duas medições consecutivas):

- Anemia não atribuível a uma condição comórbida.
- Leucocitose ≥ 11.000 / microL.
- Esplenomegalia palpável.
- LDH acima do limite superior do normal.

A distinção entre pré-MFP e MFP evidente é importante porque os pacientes que se apresentam com pré-MFP têm diferentes padrões de apresentação clínica, sobrevida e progressão da doença (35).

Mielofibrose secundária (pós-PV ou pós-TE) - Pacientes com PV e TE podem desenvolver fibrose da medula óssea imitando a da MFP. Um grupo internacional de pesquisa em mielofibrose propôs os seguintes critérios para o diagnóstico de mielofibrose pós-PV e pós-TE (45):

Critérios principais (ambos necessários):

- Documentação de um diagnóstico anterior de PV ou TE conforme definido pelos critérios da OMS.

- Presença de aumento da fibrose da medula óssea.

Critérios menores (são necessários pelo menos dois):

- Imagem de sangue leucoeritoblástico.

- Grau crescente de esplenomegalia.

- Desenvolvimento de sintomas constitucionais (perda de peso, suores noturnos, febre inexplicável).

- LDH sérico aumentado (apenas mielofibrose pós-TE).

1.3.6 - Prognóstico

A MF é a mais agressiva das neoplasias mieloproliferativas negativas ao BCR-ABL1, que também inclui PV e TE. A MF está associada a uma sobrevida global média (SG) estimada em aproximadamente seis anos (1,11,20,26).

Usando o NGS (sequenciamento de nova geração) em 197 pacientes com NMP, mutações somáticas em um ou mais dos 104 genes especificados foram encontradas em 90% dos pacientes, com 37% portando mutações somáticas em genes que não sejam *JAK2 V617F* e *CALR*. A presença de ≥ 2 mutações somáticas reduziu a sobrevida global e aumentou o risco de transformação em leucemia mielóide aguda. Uma observação semelhante foi feita em um outro estudo de mutações em cinco genes que conferem prognósticos desfavoráveis em 797 pacientes com MF; neste estudo, a sobrevida média foi de 12,3, 7,0 e 2,6 anos, respectivamente, para aqueles com nenhum, uma ou duas ou mais mutações no *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1* ou *IDH2* (76).

A transformação leucêmica é a causa de morte mais comumente identificada em pacientes com MF (28,29,30,31,32). Em estudo multicêntrico, a transformação em leucemia aguda foi responsável por 17% das mortes (86 de 517 mortes), seguida pela

progressão da MF (10%), trombose e complicações cardiovasculares (7%), infecção (6%), sangramento (3%), hipertensão portal (2 %) e segundo câncer (2 %).

Não existe tratamento padrão para a transformação leucêmica, e a participação em um ensaio clínico é incentivada. Não há estudos randomizados ou bem controlados comparando abordagens terapêuticas, e as opções variam de tratamento paliativo / quimioterapia de indução intensiva seguida de transplante alogênico de células hematopoiéticas (TCTH). A decisão de quando e como tratar é influenciada pelo estado clínico geral do paciente e experiência clínico / institucional.

Na avaliação dos fatores prognósticos são levados em consideração dados clínicos e características citogenéticas / moleculares.

1.3.6 – Estratificação do risco

A estratificação de risco permite que decisões de tratamento sejam tomadas no contexto do prognóstico do indivíduo.

Não há consenso sobre a ferramenta prognóstica ideal para a MFP, e o modelo preferido pode variar de acordo com o clínico e/ou a instituição. Em geral, modelos prognósticos que incorporam características citogenéticas e moleculares são mais eficazes para distinguir grupos de risco do que aqueles que utilizam apenas características clínicas. Em ambientes onde as técnicas moleculares não estão disponíveis, é aceitável o uso de modelos baseados apenas em características clínicas e / ou cariótipo.

Em 2009 foi desenvolvido o International Prognostic Scoring System (IPSS), a primeira ferramenta prognóstica para a MFP. O IPSS foi projetado para uso no momento do diagnóstico inicial e aplica cinco preditores independentes de menor sobrevida: idade > 65 anos, hemoglobina <10 g/dL, contagem de leucócitos >25 × 10⁹/L, blastos circulantes ≥1% e presença de sintomas constitucionais. A presença de 0, 1, 2 e ≥ 3 fatores adversos definiram doença de baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto risco,

respectivamente; as sobrevidas medianas correspondentes foram relatadas em 11,3, 7,9, 4 e 2,3 anos, respectivamente (26).

Posteriormente, foi desenvolvido o modelo de prognóstico dinâmico (DIPSS) que utiliza as mesmas variáveis de prognóstico usadas no IPSS, mas pode ser aplicado a qualquer momento durante o curso da doença. O DIPSS atribuiu dois, em vez de um, pontos adversos para hemoglobina <10 g/dL, e a categorização de risco foi modificada de acordo: baixo (0 pontos adversos), intermediário-1 (1 ou 2 pontos), intermediário-2 (3 ou 4 pontos) e alta (5 ou 6 pontos). As sobrevidas medianas correspondentes foram 14,2, 4 e 1,5 anos (27).

A incorporação de três fatores de risco adicionais independentes (contagem de plaquetas $<100 \times 10^9$ /L, necessidade de transfusão de hemácias e cariótipo desfavorável) ao DIPSS levou ao desenvolvimento do DIPSS-plus. As quatro categorias de risco DIPSS-plus com base nos oito fatores de risco mencionados são baixo (sem fatores de risco), intermediário-1 (um fator de risco), intermediário-2 (dois ou 3 fatores de risco) e alto (quatro ou mais fatores de risco), com respectivas sobrevidas medianas de 15,4, 6,5, 2,9 e 1,3 anos (70).

Mais recentemente, a observação de mutações adicionais, além das mutações driver, independentemente do impacto no prognóstico do paciente, levou à incorporação dessas mutações adicionais em novos escores prognósticos. Três novos modelos prognósticos: MIPSS70, MIPSS70+ versão 2.0 (MIPSS v2) e GIPSS (41, 52, 71). Então, esses novos modelos prognósticos incluíram componentes que destacaram a contribuição prognóstica independente do driver e outras mutações, cariótipo, e níveis de hemoglobina ajustados ao sexo. MIPSS70 (sistema de pontuação de prognóstico internacional aprimorado por mutação para pacientes em idade de transplante) utiliza mutações e variáveis clínicas; MIPSS v2(o MIPSS70 com cariótipo aprimorado) utiliza mutações,

cariótipo e variáveis clínicas (41, 71); O GIPSS (sistema de pontuação de prognóstico inspirado geneticamente) é baseado exclusivamente em mutações e cariótipo (52).

O MIPSS70 foi desenvolvido em pacientes com 70 anos ou menos para ser relevante para pacientes em idade de transplante. MIPSS70 inclui nove variáveis, incluindo três genéticas (ausência de *mutação CALR* tipo 1/like; presença de mutações de alto risco molecular, especificamente *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* ou *IDH2*; e presença de ≥ 2 mutações de alto risco molecular) e seis fatores de risco clínicos (hemoglobina < 10 g/dL, leucócitos $> 25 \times 10^9$ /L, plaquetas $< 100 \times 10^9$ /L, blasto circulante $\geq 2\%$, grau de fibrose da medula óssea ≥ 2 e sintomas constitucionais). A pontuação ponderada da razão de risco de “2” foi atribuída a leucócitos $> 25 \times 10^9$ /l, plaquetas $< 100 \times 10^9$ /le presença de ≥ 2 mutações de alto risco molecular e uma pontuação ponderada de “1” para todos os outras variáveis de risco; uma pontuação total de 0-1, 2-4 e ≥ 5 definiu as categorias de baixo, intermediário e alto risco do MIPSS70 de três níveis, com faixas de sobrevida mediana correspondentes de 27,7 anos - "não alcançada", 6,3-7,1 anos e 2,3-3,1 anos, validado em duas coortes separadas (41)

O MIPSS v2 incorpora os níveis de risco citogenético de três camadas recentemente revisados, *U2AF1* Q157 como uma mutação adicional de alto risco molecular (HMR), e novos limites de hemoglobina ajustados por sexo e gravidade. O MIPSS v2 utiliza nove componentes, incluindo cinco genéticos e quatro clínicos. As cinco variáveis genéticas incluem cariótipo de risco muito alto (VHR) (quatro pontos), cariótipo desfavorável (três pontos), ≥ 2 mutações HMR (três pontos), presença de uma mutação HMR (dois pontos) e ausência de tipo 1/ como mutação *CALR* (dois pontos); as quatro variáveis clínicas no MIPSS v2 incluem sintomas constitucionais (dois pontos), anemia grave (definida por níveis de hemoglobina < 8 g/dL em mulheres e < 9 g/dL em homens) (dois pontos), anemia moderada (definida por níveis de hemoglobina de 8-9,9 g/ dL em mulheres e 9-10,9 g/dL

em homens) (um ponto), e blastos circulantes $\geq 2\%$ (um ponto). O MIPSS v2 inclui cinco categorias de risco: risco muito alto (≥ 9 pontos), risco alto (5-8 pontos), risco intermediário (3-4 pontos), risco baixo (1-2 pontos) e risco muito baixo (zero pontos); em pacientes com 70 anos ou menos, as sobrevidas medianas correspondentes (taxas de sobrevida em 10 anos) foram de 1,8 anos ($< 5\%$), 4,1 anos (13%), 7,7 anos (37%), 16,4 anos (56%) e “mediana não atingida” (92%) (71).

O GIPSS é exclusivamente dependente de mutações e cariótipo. Em um estudo colaborativo da Mayo-University of Florence, Itália, com 641 pacientes com MFP, a análise multivariada restrita a fatores de risco genéticos identificou o cariótipo de risco muito alto (dois pontos); cariótipo desfavorável (um ponto); ausência de mutação *CALR* tipo 1/like (um ponto); e presença de mutações *ASXL1* (um ponto), *SRSF2* (um ponto) e *U2AF1* Q157 (um ponto) como fatores de risco independentes para sobrevida. As categorias de risco GIPSS de quatro níveis incluíram baixo (zero pontos), intermediário-1 (um ponto), intermediário-2 (dois pontos) e alto (≥ 3 pontos), com sobrevidas medianas correspondentes de 26,4 anos, 8,0 anos, 4,2 anos e 2 anos. Mais recentemente, as mutações *RAS* / *CBL* em MFP foram associadas a uma resposta ruim à terapia com ruxolitinibe, características de prognóstico ruim e sobrevida inferior; neste último aspecto, entretanto, a incorporação de tais informações ao MIPSS v2 não apresentou valor adicional (52).

1.3. 7 – Tratamento

O tratamento da MF é frequentemente baseado nas necessidades clínicas dos pacientes a fim de aliviar os sintomas associados a doença, prevenir complicações e induzir a uma remissão completa da doença a longo prazo. Atualmente, o único tratamento curativo reconhecido para a doença é o transplante de medula óssea alogênico.

Entretanto, este tratamento pode ser oferecido, a uma minoria de pacientes devido a sua morbidade e mortalidade intrínsecas (76,78).

Para o controle da anemia associada à MF, são usados andrógenos (por exemplo, enantato de testosterona 400-600 mg IM semanalmente, fluoximesterona oral 10 mg TID), prednisona (0,5 mg/kg/d), danazol (600 mg/dia), talidomida (50 mg/dia) ± prednisona, ou lenalidomida (10 mg/d) ± prednisona (10 mg/d). As taxas de resposta a cada uma das drogas acima mencionadas estão em torno de 15% a 25%, e as durações de resposta são em média de 1 a 2 anos. A lenalidomida funciona melhor na presença de del(5q31). Os efeitos colaterais dos medicamentos incluem hepatotoxicidade e efeitos virilizantes para andrógenos, neuropatia periférica para talidomida e mielossupressão para lenalidomida. A pomalidomida é outro análogo da talidomida que pode aliviar a anemia em um subconjunto de pacientes com mutação *JAK2* sem esplenomegalia acentuada ou excesso de blastos circulantes (76).

Em pacientes com esplenomegalia sintomática, os tratamentos farmacológicos dependem principalmente, de drogas como hidroxiuréia ou inibidores Jak como Ruxoltinibe ou Fedratinibe (54). Infelizmente, os pacientes submetidos ao tratamento com Ruxoltinibe perdem sua resposta ao medicamento ou experimentam efeitos colaterais que não permitem que o tratamento seja combinado em doses terapêuticas (54). Assim, outras drogas ou compostos vem sendo investigados em nível experimental e em ambientes clínicos. Eles incluem outros inibidores de Jak (pacritinibe, momelotinibe) imunomoduladores medicamentos imide (IMiDs) e agentes imunossupressores e/ou antiinflamatórios, incluindo interferons e inibidores de pontos de controle imunológico (76,78).

Outros medicamentos, atualmente utilizados apenas em nível experimental em ensaios clínicos, incluem inibidores de bromodomínio e proteína terminal extra (BET),

tais como os seguintes CPI-0610; luspatercept, um receptor de ativina IIA (ligand trap) que melhora a anemia; IPRM – 151, uma forma recombinante de pentraxina2, que demonstrou reverter a formação de fibrose em modelos pré-clínicos; imetelstat, um potente inibidor de telomerase (55); inibidores de fosfatidilinositol 3-quinase (P13K), inibidores da via hedgehog e inibidores de histona deacetilase (76,78).

Com o advento dos inibidores JAK, a ocorrência de esplenectomia em pacientes com mielofibrose é rara. As diretrizes atuais sugerem que a esplenectomia deve ser restrita a pacientes selecionados com hemólise, esplenomegalia sintomática grave, infarto esplênico, hipertensão portal devido à esplenomegalia, ou sintomas hiper-catabólicos graves que são refratários à terapia não cirúrgica (76,78).

1.4– Telômeros

Telômeros são complexos de sequências de DNA repetitivas e não codificantes (TTAGGG), ricas em guanina, combinadas com proteínas que limitam as extremidades do cromossomo e protegem o genoma celular da degradação; mantendo assim a estabilidade e a integridade cromossômicas (53,54,55,56,57, 79,80).

Em 1961 Hayflick e Moorhead mostraram que uma cultura de células somáticas tem um tempo de vida limitado. Em 1971 Olovnikov e Watson sugeriram que o encurtamento das extremidades cromossômicas (telômeros) determina o número potencial de divisões celulares e que é natural que os telômeros dessas células diminuam de tamanho durante seu ciclo de vida, numa taxa de cerca de 30 a 120 pares de base por replicação, sendo um sinal de senescência (envelhecimento) (79,80).

Em indivíduos saudáveis, o comprimento médio dos telômeros (TL) varia entre 5 e 15kb e pode diferir entre indivíduos, cromossomos e braços de cromossomos, células e tecidos. O TL apresenta alta variação interindividual já ao nascimento, sendo mais longo nas mulheres do que nos homens e mais longo nos afro-americanos do que nos brancos

de ascendência europeia. O reparo dos telômeros é regulado positivamente por hormônios sexuais e fatores transcricionais como c-Myc. O TL sofre desgaste progressivo com a idade e é relativamente curto em doenças relacionadas ao envelhecimento (81).

Quando as células obtêm telômeros criticamente curtos, os mecanismos de controle celular impedem as fusões de ponta a ponta, degradação enzimática ou translocações não recíprocas que eventualmente resultam em instabilidade cromossômica, aneuploidia e tumorigênese. (60). No entanto, células com potencial maligno são capazes de escapar do controle celular por falha ou supressão da resposta a danos no DNA: por exemplo, a perda da proteína tumoral p53 e a ativação dos mecanismos de manutenção dos telômeros (60). Como resultado, essas células continuam a crescer, levando à imortalização e à malignidade franca. A maioria dos cânceres humanos exibe telômeros criticamente curtos, sugerindo que os tumores realmente podem surgir a partir de células geneticamente instáveis (79,80,81).

Em 1975 Blackburn e Greider descobriram a enzima telomerase que alonga os cromossomos. Esse complexo de ribonucleoproteínas consiste de componentes absolutamente necessários para sua atividade: a molécula de RNA e a Transcriptase Reversa da Telomerase TERT; também, opcionalmente, várias proteínas associadas à telomerase podem ser incluídas no complexo da telomerase. A telomerase existe nas células humanas como dímeros e contém duas subunidades de transcriptase reversa e duas moléculas de RNA. A atividade da telomerase detectada in vitro aparece em leucócitos na fase G1 do ciclo celular e os telômeros são replicados in vivo durante a fase S. Durante a fase S do ciclo celular, hTERT também se move para os telômeros. Isso significa que há regulação no nível da localização espacial da telomerase ativa (enzima) e do telômero (substrato). Nem sempre é possível obter uma correlação entre a atividade da telomerase

e o comprimento dos telômeros. Por exemplo, não há dependência entre o comprimento dos telômeros e a atividade da telomerase na leucemia (79, 81).

Em linhagens de células embrionárias, a telomerase é ativa e o comprimento dos telômeros é constante. Nas células-tronco, a atividade da polimerase é menor e compensa apenas parcialmente o encurtamento dos telômeros. Como já dito anteriormente, nas células somáticas, a telomerase não é ativa. O encurtamento dos telômeros leva ao momento de M1 e a transição das células para a condição de senescência, que poderia ser resgatada pela inativação ou deleção de RB, p16 ou p53. As células que passam por M1 continuam sua divisão celular e atingem a condição de crise M2, o que leva à morte celular maciça. As células que sobrevivem começam sua transformação em células cancerígenas (79).

As células cancerosas têm a capacidade de divisão celular ilimitada e suportam o comprimento dos telômeros (geralmente devido à atividade da telomerase). Esse mecanismo foi descrito na transfecção de células somáticas que expressam hTR pelo gene hTERT antes do momento de M2; elas, à semelhança das células cancerosas, demonstram alongamento e estabilização dos telômeros (79), e em uma minoria importante (cerca de 10%) a imortalidade celular, é alcançada por um processo conhecido como alongamento alternativo dos telômeros (81).

As células hematopoiéticas são submetidas à erosão dos telômeros durante sua constante diferenciação: portanto, seu comprimento de telômeros (TL) representa um biomarcador confiável da idade celular e potencial mitótico in vitro e in vivo (61,62,63,64). Uma diminuição acentuada e variável do TL foi observada em várias neoplasias hematológicas; em particular, o TL foi encontrado reduzido na leucemia aguda de origem mieloide e linfoide, na síndrome mielodisplásica, na leucemia linfocítica

crônica das células B e em linfomas (65 e 81). Foi demonstrado que o TL também é reduzido na leucemia mieloide crônica, com TL curto correlacionado com evolução clonal e mau prognóstico (65,66,67,68,69).

Alguns estudos recentes também relataram uma redução do TL em pacientes afetados por mielofibrose (53, 57, 54,55, 69).

Várias abordagens terapêuticas vêm sendo estudadas para atuarem na telomerase. Atualmente duas moléculas parecem ser particularmente promissoras: danazol e imetelstat. Os hormônios masculinos são eficazes na terapia da insuficiência medular associada à disfunção dos telômeros, causando melhora hematológica. A redução da erosão dos telômeros pelo danazol pode anular o passo molecular precoce na instabilidade cromossômica e na oncogênese e necessita de investigação em ensaios clínicos. De fato, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da terapia na sobrevida ou progressão para síndrome mielodisplásica ou leucemia aguda. Além disso, o danazol pode ser benéfico no tratamento de outros tipos de desgaste acelerado dos telômeros, como o desgaste que ocorre após a quimioterapia e o transplante de células-tronco hematopoiéticas. Já o Imetelstat, age na região complementar do molde do RNA da telomerase (hTR), atua como um inibidor enzimático competitivo que se liga e bloqueia o sítio ativo da enzima (um "antagonista molde da telomerase"), mostrou-se ativo em indivíduos com doença hematológica, e uma resposta rápida e durável foi observada em pacientes com TE e MF, mas também tem o potencial de provocar efeitos colaterais (55,81).

Há um interesse crescente de estudos populacionais com enfoque em análise do comprimento relativo dos telômeros em leucócitos como preditivo de mortalidade geral e prevalência de câncer. A correlação do comprimento dos telômeros em diferentes tecidos, como sangue ou DNA de células bucais, em diversas doenças tem sido valorizada em análises epidemiológicas. Numerosos estudos de caso-controle propuseram que indivíduos com tumor podem ter menor comprimento relativo de telômeros em leucócitos ou células bucais. Estes incluem estudos de câncer de bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, gástrico e ovário (81).

2 - Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral do nosso estudo é analisar o comprimento relativo dos telômeros, o perfil das alterações cromossômicas e sua relação com o quadro clínico dos pacientes portadores de MFP e MF pós PV/TE, seguidos em Centros de Onco-Hematologia do Distrito Federal.

2.2 – Objetivos Específicos

- a) Comparar o comprimento relativo dos telômeros (T/S) em pacientes com mielofibrose e controles saudáveis.
- b) Correlacionar o comprimento relativo dos telômeros (T/S) dos pacientes com mielofibrose à presença de mutações driver.
- c) Correlacionar o comprimento relativo dos telômeros dos pacientes com mielofibrose à estratificação de risco prognóstico (IPSS).
- d) Realizar análise cromossômica por Microarray (CMA) dos pacientes com mielofibrose.
- e) Correlacionar os achados citogenéticos obtidos por CMA com a mediana de sobrevida global.

Baseado nas informações obtidas neste estudo foram redigidos 02 artigos que farão parte da tese no formato de capítulos.

3- Capítulo 1:

Artigo submetido a revista Genetics and Molecular Biology

ID: GMB -2022-0260

Title:

**TELOMERE LENGTH CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL
PARAMETERS IN MYELOFIBROSIS**

Running title: Telomere length in myelofibrosis

Fernanda P. L. Guedes de Amorim¹, Alexandre Nonino ², Juliana Minuncio³, Rinaldo W. Pereira⁴, Rosangela Andrade ⁴, Silviene Fabiana de Oliveira^{5,6}, Rolando Andre Rios Villacis⁵, Angélica Amorim Amato^{6,7}, Erica C.C. Caldas Rosa⁶, Juliana F. Mazzeu^{1,6,7}

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil

2 CETTRO - Cetro - Centro de Cancer de Brasilia, Brasilia, Brazil

3 Hospital de Base de Brasília, Secretaria de Estado de Saúde, DF, Brazil

4 Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, DF, Brazil

5 Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil

6 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF, Brazil

7 Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF, Brazil

4- Capítulo 2

4.1- Título: Análise cromossômica por Microarray (CMA) de uma coorte de pacientes com mielofibrose

Fernanda P. L. Guedes de Amorim¹, Alexandre Nonino², Juliana Minuncio³, Erica C.C. Caldas Rosa⁵, Raphael S. Bonadio⁵, Milton Rego de Paula Junior^{1,5}, Silviene Fabiana de Oliveira^{4,5}, Aline Pic-Taylor^{1,4,5}, Juliana F. Mazzeu^{1,4,5}

1 Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil

2 CETTRO - Cettro - Centro de Cancer de Brasilia, Brasilia, Brazil

3 Hospital de Base de Brasília, Secretaria de Estado de Saúde, DF, Brazil

4 Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil

5 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF, Brazil

Resumo

A mielofibrose (MF) é uma neoplasia mieloproliferativa crônica BCR-ABL1 negativa, rara, caracterizada por fibrose progressiva da medula óssea, hematopoiese ineficiente e sobrevida reduzida. As manifestações clínicas incluem esplenomegalia, devido à hematopoiese extramedular, pancitopenias e uma série de sintomas constitucionais potencialmente debilitantes. O diagnóstico é baseado na morfologia da medula óssea e critérios clínicos. Mutações driver de genes *JAK2*, *MPL* ou *CALR* são encontrados em aproximadamente 90% dos pacientes, enquanto os 10% restantes sem mutações driver são denominados “triplo negativos”. Essas mutações driver podem ser acompanhadas de

outras mutações, denominadas cooperativas, como *RBI*. A patogênese da mielofibrose se explica através da ativação da via JAK-STAT que resulta em superprodução de megacariócitos anormais, levando à fibrose da medula óssea. Atualmente, sabe-se que a caracterização genômica dos pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMP) pode levar a uma melhor classificação diagnóstica, avaliação prognóstica e planejamento do tratamento. Os objetivos do estudo foram: 1) realizar análise cromossômica por Microarray (CMA); 2) correlacionar os achados citogenéticos obtidos por CMA com a mediana de sobrevida global. Setenta e seis por cento dos pacientes tinham regiões de ganho ou perda cromossômica ou áreas de perda de heterozigose. Os pacientes que tiveram uma sobrevida mediana menor (3,6 meses) apresentaram alterações cromossômicas que abrigavam genes supressores de tumor (*NF1*, *RBI*, *TP53*, *DNMT3A*, *PPM1D*). O presente estudo sugere a possibilidade de melhor caracterização prognóstica de pacientes com mielofibrose através da análise cromossômica por Microarray (CMA).

Palavras-chave: Microarranjo cromossômico, Rearranjos cromossômicos, perda de heterozigose, Mielofibrose

Introdução

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um grupo de desordens hematológicas clonais que surgem da transformação de uma célula-tronco hematopoiética pluripotente (1). São quatro as NMPs clássicas, policitemia vera (PV), mielofibrose primária (MFP), trombocitemia essencial (TE) e leucemia mieloide crônica (LMC). A LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia (Ph) resultante da translocação entre os cromossomos 9 e 22 [t (9;22) (q34;q11)] (gene de fusão BCR/ABL1) associada à ativação anormal da tirosina quinase envolvida na fisiopatologia da doença. Nenhuma

anormalidade citogenética específica foi associada à NMPs além da LMC (27), sendo as demais classificadas como pertencentes ao grupo de NMPs definidas como doenças BCR/ABL1 negativos (28).

Entre os NMPs, a MFP tem a apresentação clínica mais heterogênea. Nos EUA, a taxa de incidência anual varia de 0,1 a 1 por 100.000 (26).

O diagnóstico da MFP, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é baseado na combinação de características clínicas, morfológicas, citogenéticas e moleculares (28).

Ao diagnóstico, o principal sinal verificado ao exame físico é a esplenomegalia ou hepatomegalia. E os sintomas mais comuns relatados são: fadiga, perda de peso, sudorese noturna e febre. Trinta por cento (30%) dos pacientes são assintomáticos na apresentação e a doença é detectada por um hemograma anormal incidental ou pela esplenomegalia (7). A doença evolui gradualmente da fase pré-fibrótica inicial para a fase fibrótica com o aumento da falência da medula óssea (MO).

Na célula cancerígena verifica-se que a presença de uma mutação driver confere vantagem de crescimento e provavelmente é selecionada no microambiente tecidual dentro do qual as células neoplásicas surgem.

Dentre os principais critérios de NMP negativo para BCR/ABL1, destaca-se a presença de variantes em genes driver, assim como o gene Janus quinase 2 (*JAK2* — HGNC: 6192), o gene receptor de trombopoietina (*MPL* — HGNC: 7217) e o gene da calreticulina (*CALR* -HGNC: 1455) (29-33). A mutação *JAK2* é mais prevalente acometendo 60 a 65% dos pacientes com diagnóstico de MFP, seguido de *CALR* de 20 a

25% e a mutação *MPL* de 7%. E aproximadamente 8 a 10% dos casos de MF carecem dessas mutações e denominamos como "triplos negativos" (29-33).

Na MFP, as frequências de mutações inespecíficas são maiores em comparação com PV e TE. Mutações com frequências de 10% ou mais em MFP incluem *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2* e *U2AF1* (12,13). Foi relatado que pacientes com MFP com perfil de mutação *CALR+* / *ASXL1-* têm sobrevida mais prolongada, aproximadamente 18 anos, em comparação com aqueles com *CALR-* / *ASXL1+*, enquanto *CALR+* / *ASXL1+* e *CALR-* / *ASXL1-* pacientes estavam em uma categoria de risco intermediário semelhante (10,13). Outras mutações que são menos frequentes na fase crônica MFP, mas com uma frequência significativamente maior na fase blástica incluem *IDH1* e *IDH2* (14,15), *TP53*, *DNMT3A* (16), *IKZF1* e mutação *LNK* (17).

As mutações *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2* fornecem valor agregado no prognóstico molecular e clínico combinado de MFP. 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 para nenhuma mutação (18). Comparado com a melhor terapia disponível, um inibidor de JAK, ruxolitinib, reduziu o risco de morte (hazard ratio 0,57, intervalo de confiança de 95% 0,30–1,08) em pacientes com MFP independente do perfil de mutação (19).

Os estudos mostram que o acúmulo progressivo de alterações genéticas desempenha um papel essencial na tumorigênese e evolução dos cânceres humanos. As alterações genéticas comumente observadas em cânceres humanos incluem translocações cromossômicas, ampliações, perda alélica, perda de heterozigosidade, deleções,

mutações e alterações epigenéticas/metilação do DNA afetando oncogenes e genes supressores de tumor (1).

Aproximadamente um terço dos pacientes com MFP apresentam anormalidades citogenéticas, incluindo del(20q), del(13q), trissomia 8 e 9 e anormalidades do cromossomo 1, incluindo duplicação 1q. Outras lesões menos frequentes incluem -7/del(7q), del(5q), del(12p), +21 e del(6)t(1;6)(q21;p21.3). Os tipos de anormalidades citogenéticas são geralmente semelhantes entre os pacientes com MFP, mielofibrose pós-ET e mielofibrose pós-PV. Com base no efeito sobre o prognóstico, os achados citogenéticos na MFP são classificados como favoráveis ou desfavoráveis. O primeiro inclui cariótipo normal ou del(20q) ou del(13q) isolado e o último inclui todas as outras anormalidades citogenéticas. Um perfil citogenético desfavorável na mielofibrose MFP e pós-PV/ está associado a mutação *JAK2* V617F. Em pacientes que a doença evolui para leucemia geralmente apresentam cariótipos complexos na transformação e uma sobrevida mediana significativamente diminuída (20,21).

A identificação das alterações genéticas em espécimes clínicos ao longo dos anos evoluiu para o nível de nucleotídeo único com os avanços nas tecnologias. A análise citogenética convencional com cariótipo de banda G, permite a diferenciação de aproximadamente 400-500 bandas por genoma haplóide (2). A este nível de resolução, podem ser detectadas alterações cromossômicas superiores a 10 Mb. A hibridização in situ por fluorescência (FISH) oferece alta sensibilidade e especificidade na detecção de anormalidades genéticas, como translocações, aneuploidias, deleções, inversões ou ampliações usando sondas de DNA direcionadas a sequências de DNA conhecidas (3). O FISH pode identificar alterações genéticas com uma resolução de até alguns kilobases (kb), mas não é adequado para a identificação de alterações genéticas

desconhecidas ou anormalidades cromossômicas globais. A evolução da hibridização genômica comparativa baseada em matriz (aCGH) desenvolvida no início da década de 1990 passou a oferecer uma análise eficiente de alto rendimento de todo o genoma para identificação de variações/aberrações do número de cópias (CNVs/CNAs) que geralmente não são detectáveis por cariotipagem convencional ou estudos FISH direcionados, e tem uma resolução melhorada até 100 kb (4,5,6).

As CNVs são um tipo predominante de variação genética estrutural. Eles envolvem segmentos de DNA que abrangem milhares a milhões de bases cujo número de cópias varia entre diferentes indivíduos. Essas diferenças genômicas submicroscópicas no número de cópias de uma ou mais seções do DNA resultam em ganhos ou perdas de DNA. As CNVs podem estar associadas a efeitos fenotípicos, mas em outros casos são clinicamente silenciosas.

Nas últimas décadas a metodologia de análise cromossômica microarray (CMA) tem sido amplamente utilizada na detecção de deleções e duplicações (Variações no Número de Cópias - CNVs) no genoma humano, que podem levar a distúrbios genéticos, além da detecção de grandes regiões de perda de heterozigose (LOH) e dissomia uniparental (UPD).

A CMA, foi rapidamente aplicada à genômica do câncer (6, 7, 8). Em contraste com o aCGH, os arrays são capazes de detectar tanto CNVs/CNAs quanto perda de heterozigose (LOH) ou LOH neutro/dissomia uniparental (UPD), que estão frequentemente envolvidos no desenvolvimento de cânceres (9).

Desde a invenção dos arrays, eles têm sido amplamente aplicados a várias malignidades hematológicas. Embora atualmente não existam diretrizes clínicas sobre o uso do exame em neoplasias hematopoiéticas, o microarray certamente é útil em casos difíceis, especialmente no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas na estratificação de risco, quando outras metodologias não conseguem identificar anormalidades citogenéticas (34).

Em nosso estudo objetivamos a detecção de CNVs e perda de heterozigose (LOH) através do CMA em pacientes com MF a fim de correlacionar os achados citogenéticos dos pacientes a sobrevida visando incluir os dados de CMA nos scores prognósticos.

Material e métodos

Tipo e população do estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo realizado no período de março de 2013 a fevereiro de 2018.

A população estudada é de 36 pacientes com diagnóstico de Mielofibrose, estabelecido conforme os Critérios Diagnósticos da OMS de 2016, os pacientes tiveram diagnósticos confirmados e foram também incluídos aqueles classificados como portadores de MF em fase pré-fibrótica.

Todos os sujeitos incluídos são maiores de 18 anos e concordaram com a participação no estudo, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), sob número de registro CAAE 19493613.5.0000.5553 e parecer número 525.330.

Os pacientes, diagnosticados com mielofibrose foram selecionados do ambulatório e acompanhados regularmente na Unidade de Hematologia do Instituto Hospital de Base do Distrito Federal (IHBDF) e no Cetro - Centro de Câncer de Brasília.

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos nas consultas médicas regulares ambulatoriais. Por exemplo, informações referentes ao diagnóstico (MFP em Fase Fibrótica, em Fase Pré-Fibrótica ou MF pós PV/TE), gênero, idade ao diagnóstico, tempo de seguimento, estratificação de risco de acordo com IPSS, tratamentos realizados e desfechos clínicos (fenômenos trombóticos/hemorragicos, evolução para leucemia aguda e óbito).

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

Os dados de citogenética (cariótipo de medula óssea por bandas G e/ou por CMA de sangue periférico) e status das mutações driver e cooperativas por PCR ou por MLPA foram obtidos de dados de prontuário eletrônico de análises realizadas previamente a nossa pesquisa.

Coleta e preparação das amostras

As amostras de material biológico consistem de alíquotas de 4 a 8 ml de sangue periférico, coletadas através de flebotomia de membro superior realizada por profissional de saúde habilitado, obedecendo técnica asséptica. Para a CMA foram incluídos de 34 pacientes portadores de mielofibrose (em dois pacientes o material era insuficiente para análise).

Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído da amostra de sangue total através do método Puregene “Salting out” (Gentra, Minneapolis, MN, USA), adotado rotineiramente no laboratório.

Microarray (CMA)

A presença de alterações cromossômicas submicroscópicas foi investigada por análise de microarrays usando o Affymetrix Cyto-ScanMTHD ou Affymetrix Cytoscan 750K. Essas plataformas consistem em microarrays contendo sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, bem como sondas SNP polimórficas. Todos os procedimentos foram realizados conforme orientação do fabricante. As lâminas hibridizadas com DNA e marcadas com biotina foram analisadas por um GeneChip®Scanner 3000 7G (Affymetrix) e o software Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix). A chamada das anormalidades considerou um mínimo de (a) 50 sondas consecutivamente duplicadas, (b) 25 sondas deletadas consecutivamente e (c) segmentos de LOH maiores que 5 Mb. Alterações menores envolvendo genes associados ao câncer também foram investigadas. CNVs comuns foram consideradas constitucionais/provavelmente benignas. Os genes candidatos mapeados para grandes segmentos alterados foram definidos com base em genes OMIM associados à doença, previamente relacionados a neoplasias mieloides e/ou outros tipos de câncer.

Análise dos dados obtidos por CMA

Os dados gerados foram submetidos a análise de Controle de Qualidade do software que fornece parâmetros numéricos [MAPD (Median Absolute Pairwise Differences),

SNPQC (Single Nucleotide Polymorphism quality control) e Waviness-SD (Waviness standard deviation)] mínimos sugeridos para seguimento da análise.

Resultados

Os pacientes com MF tinham idade mediana de 60,74 anos com distribuição igual entre os sexos. O tempo médio de diagnóstico da MF foi de 10 anos. Do total de 36 pacientes com MF, 6 (16,66%) foram diagnosticados com MF na fase pré-fibrótica e 30 (83,33%) com MF na fase fibrótica.

No total foram analisados por CMA 34 pacientes sendo 16 pacientes objetos de estudo realizado anteriormente (35). Esses dados foram incluídos com a finalidade de realizar a correlação com a sobrevida dos pacientes.

No total de 34 pacientes, 8 pacientes tiveram *arrays* normais. O CMA detectou alterações no número de cópias ou LOH em 26 dos 34 (76,47%) pacientes (Tabela 1); estes incluíram 15 pacientes apenas com CN-LOH (figura A), sendo 6 pacientes com LOH em 9p (17,6%) (figura B e D), três deles apenas com LOH em 9p sem nenhum outro LOH ou CNV. Dez pacientes apresentaram CNVs (29%); cinco pacientes apresentaram CNVs e LOH e cinco apresentaram apenas CNVs. Um dos pacientes apresentava apenas trissomia do cromossomo 8. Quatro pacientes apresentaram CNVs ou LOH em mosaico (Figura C).

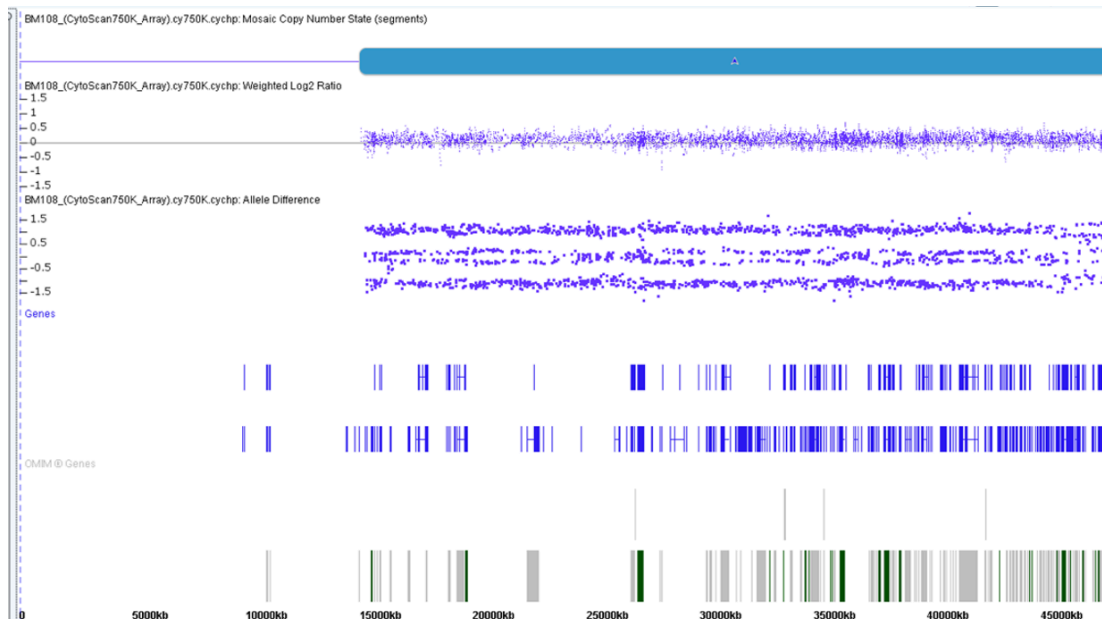


Figura A – Caso representativo de alterações cromossômicas no CMA. Trissomia em mosaico do cromossomo 21 no **paciente 37**.

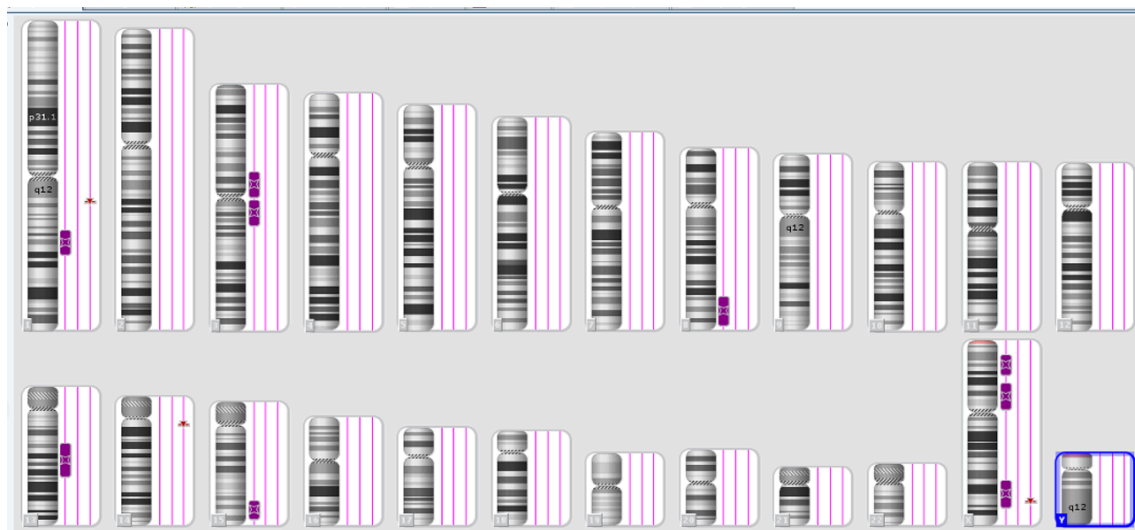


Figura B – Caso representativo de alterações cromossômicas no CMA. Representação gráfica de vários CN-LOH de diferentes cromossomos (representado nos retângulos em vermelho) encontrado por análise de microarray cromossômico no **paciente 35**.

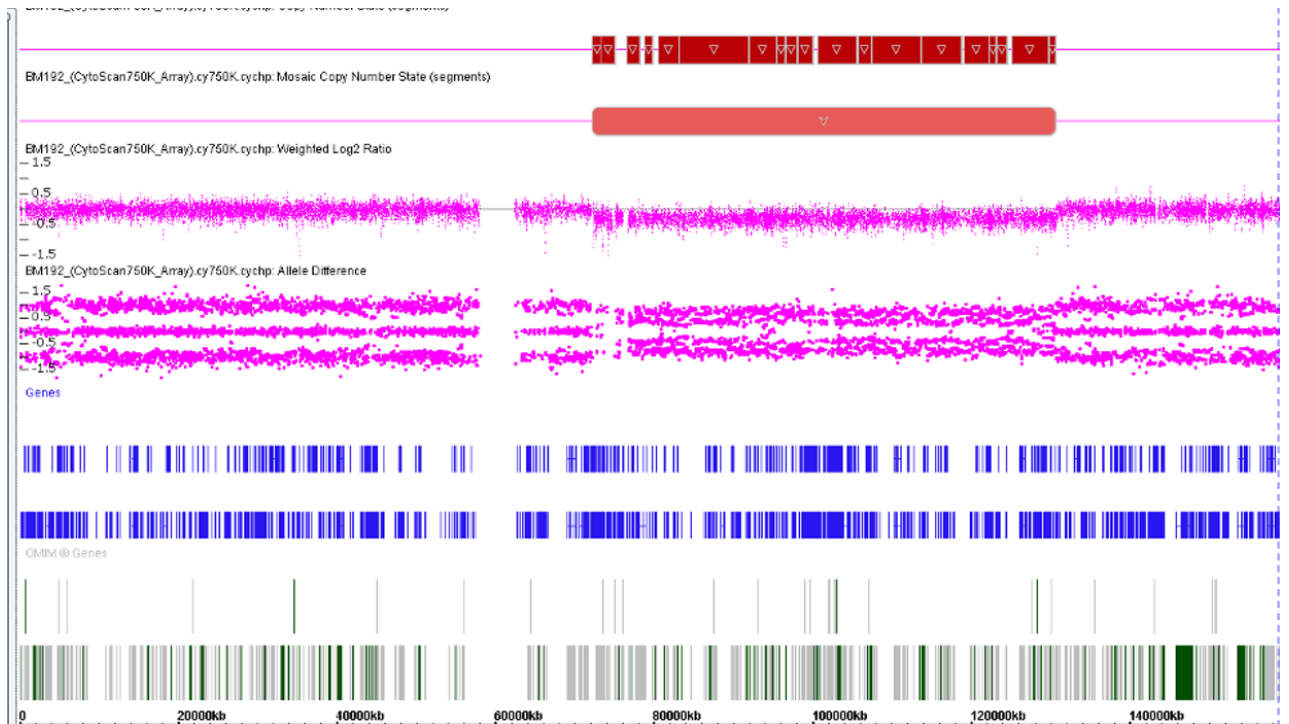


Figura C – Caso representativo de alterações cromossômicas no CMA. Representação gráfica de deleção do cromossomo 7 em mosaico no paciente 8.

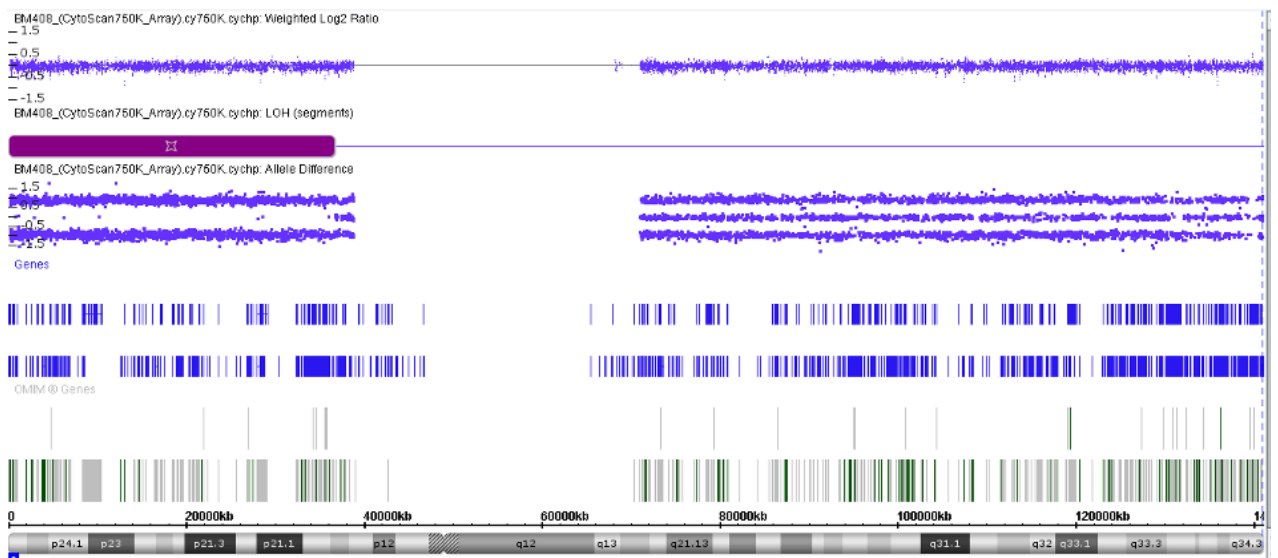


Figura D – Caso representativo de alterações cromossômicas no CMA. LOH do segmento 9p no paciente 15.

Com relação às deleções detectadas, 8 foram identificadas em um único paciente que apresentava 2 rearranjos cromossômicos complexos envolvendo os cromossomos 7 e 12 (Fig. 1). Identificamos 74 CN-LOH em nossa amostra, distribuídos em 12 pacientes, variando de 1 a 13 segmentos de CN-LOH. Cinco pacientes apresentaram um único CN-LOH sem nenhuma outra LOH ou desequilíbrio. (Fig. 1).

A sobrevida mediana da coorte estudada foi de 4 anos (50.87m). Os pacientes que apresentaram mediana de sobrevida menor (MF 30, 31, 32, 35 e 36) 3,6 meses (gráfico 1) apresentaram alterações cromossômicas que abrigavam os genes cooperativos *NFI*, *RBI*, *TP53*, *DNMT3A*, *PPM1D* (Gráfico 2), sendo as mais prevalentes as LOH ou deleções que incluíam *NFI* 18% (supressor tumoral), seguida por *RBI* 11% (supressor tumoral), *TP53* 11% (supressor tumoral) e *SH2B3* 11% (gene de transdução de sinal) (Gráfico 2).

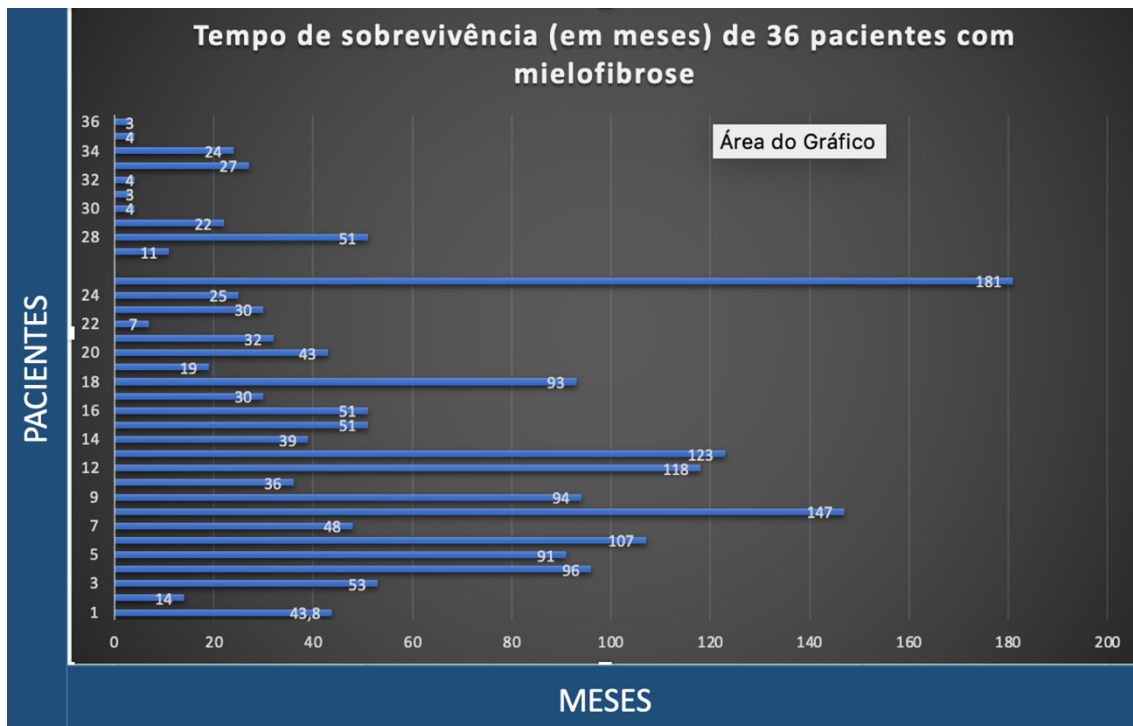


Gráfico 1 – Tempo de sobrevivência (em meses) em 34 pacientes com mielofibrose (MF).

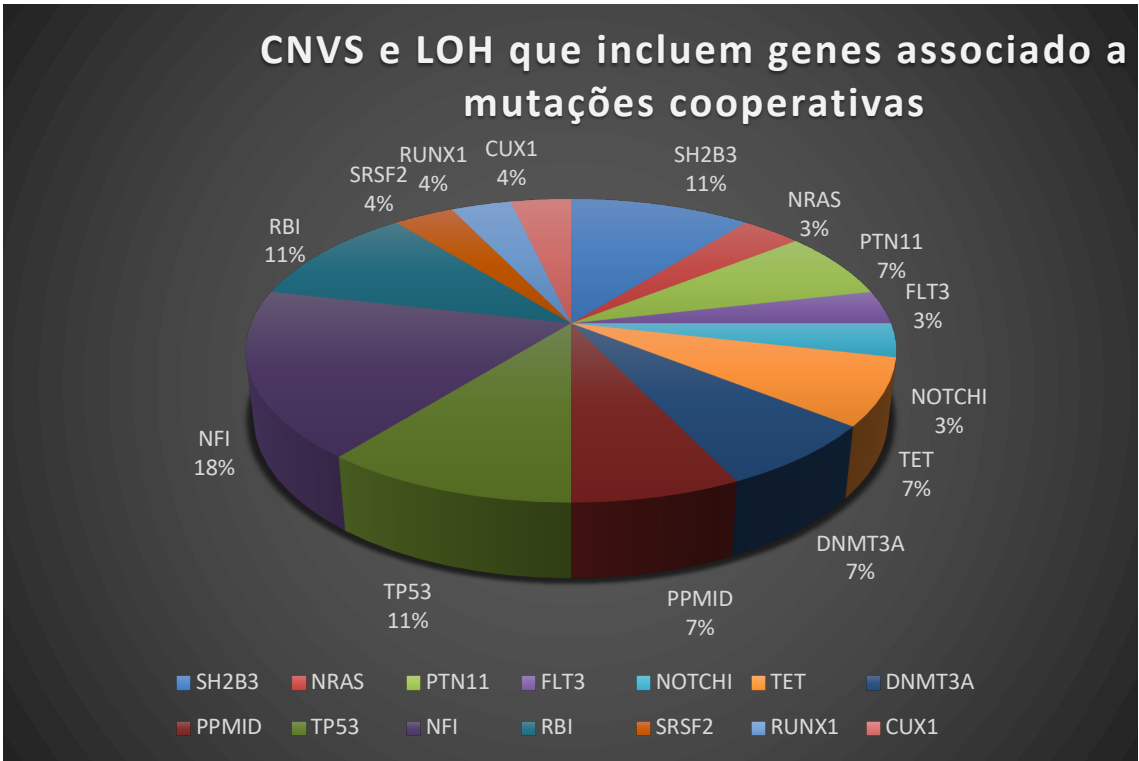


Gráfico 2: Porcentagem de ocorrência das mutações cooperativas (reguladores epigenéticos, vias de transdução de sinais, genes supressores de tumores, processamento do RNA e regulação da transcrição) encontradas na coorte de pacientes com mielofibrose.

Tabela 1- Resultados de CMA dos pacientes do estudo.

PACIENTE	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO	DRIVER	IPSS	RESULTADOS ARRAY CMA	TAMANHO (Mb)	GENES	SOBREVIDA
MF01	M	66	MF pós-TE	JAK V617F	1	4p15.32p15.1(17,707,300-30,328,979)hmz	12,622	JAK2,MTAP e CDKN2A.	vivo após 43,8 m
						9p24.3p13.3(216,123-34,431,079)hmz	34,215	STK11,SMARCA4,CALR e LYL1.	
						19p13.3p13.12(260,911-14,742,924)hmz	14,482		
						22q11.1q11.22(16,888,899-23,275,341) hmz	6,386		
						12q22q23.2(95,963,706-102,978,696) hmz	7,015		
						5q35.1q35.3(171,766,824-180,692,321) hmz	8,925		
MF02	F	84	MFP	JAK V617F	3	4q28.3q34.3(133,645,289-179,928,406)hmz	46,283	TLR2 e PALLD	óbito após 14m
						12q13.2q24.33(56,002,232-133,778,166)hmz	77,776	CDK4,SRGAPi,SH2B3,ALDH2, PTPN11 e POLE1	
						17q21.2q24.3(39,624,325-69,311,217)hmz	29,687	STAT5B,BRCA1,PHB,NME1,MPO, RAD51C, PPM1D,BRIPI, PRKCA e PRKAR1A	
						17q11.1q12(25,309,336-36,049,552)hmz	10,74	NF1,RAD51D e HNF1B	
						Xq21.33q23(97,629,749-111,888,527) hmz	14,259		
						1q41q42.13(222,161,988-229,516,511) hmz	7,355		
						1q24.2q25.2(170,365,327-176,346,512) hmz	5,981		
						17p12p11.1(13,675,000-22,217,883) hmz	8,543		
MF03	F	43	MFP	TN	1	NORMAL		vivo após 53m	
MF04	F	43	MFP	JAK V617F	0	NORMAL		vivo após 96m	

MF05	F	61	MFP	CARL	1	Trissomia 8	146,138	<i>MFHAS1, DLC1, MSR1, L2TS1, TNFRSF10B, NSD3, RB1CC1, PLAG1, NBN, RAD54B, CTHRC1, EXT1, RNF1139 e MYC</i>	<i>óbito após 91m</i>
MF06	F	46	MFP	TN	1	1p35.2p34.2(30,478,995-43,548,398)hmz	13,069	<i>RSPO1</i>	<i>vivo após 107m</i>
						13q14.13q14.2(46,722,034-49,139,504)x1	2,417	<i>LCP1, LINC00563, KIAA0226L, LRCH1, ESD, HTR2A, SUCLA2, NUDT15, MED4, MED4-AS1, ITM2B, LINC00441, RB1, LPAR6, RCBTB2</i>	
						9q33.1q33.2(117,808,079-124,657,456) hmz	6,849		
						11q23.3q24.3(120,972,517-128,650,029) hmz	7,678		
						Xq22.1q22.3(99,700,785-106,311,924) hmz	6,611		
MF07	F	62	MFP	MPL	2	1p22.3p13.1(86,010,458-116,805,160)hmz	30,795	<i>RBM15 e NRAS</i>	<i>viva após 48m</i>
						13q13.1q21.33(33,571,752-69,638,023)x1	36,066	<i>KL, FOXO1A e RB1</i>	
						14q12(27,970,825-29,004,858)x3	1,034	<i>LINC00645 (MIR3171)</i>	
						19q13.33(49,274,808-49,513,502)x1	239	<i>BCAT2, HSD17B14, PLEKHA4, PPP1R15A, TULP2, NUCB1, DHDH, BAX, FTL, GYS1, RUVBL2</i>	
						12q24.31(122,161,101-122,266,479)x1	109	<i>SETD1B</i>	
						11p15.5p12(372,355-41,907,116)hmzmos	331		
MF08	F	48	MFP	CARL	X	3p26.2p24.3(3,807,650-22,204,563) hmz	18,397	<i>OGG1, BVS, MAD1L1, EGFR, POTE 1 CDKN1B.</i>	<i>óbito após 147m</i>
						7p22.3p22.1(861,359-5,499,980)x1	4,639		
						7p14.1p11.2(38,652,686-56,755,583)x1	18,103		
						7q22.3q31.2(107,395,740-116,562,288)x1	9,167		

						7q22.1q22.3(101,428,262-105,113,953)x1	3,686		
						7q31.32q32.1(122,748,812-127,779,114)x1	5,03		
						12p13.2p12.3(12,109,324-18,729,898)x1	7		
						12q21.2(76,448,583-80,275,907)x1	4		
						12q21.31q22(81,467,393-95,908,234)x1	14		
						20q13.13q13.2(47,848,257-53,158,589)x1	5		
						18q11.2q12.1(24,767,485-32,456,354) hmz	8		
MF09	M	68	MFP	CARL	X	11q24.1q25(121,768,985-132,498,284)hmz	10,729	OPCML	óbito após 94m
MF10	M	59	MFP	MPL	3	1p36.33p21.1(849,466-26,290,550)hmzmos	823	MPL, TET2, SRSF2, FLT3	óbito após 36m
						3q13.31q29(114,957,134-197,831,255)hmzmos	83		
MF12	F	47	MFP	TN	1	1p12p11.2(120,553,551-120,624,056)x1	71	NOTCH2	óbito após 118m
						Xq13.1q21.1(70,848,162-77,290,593) hmz	6		
MF13	F	58	MFP	CARL	X			NORMAL	viva após 123m
MF14	M	81	MFP	JAK 2 V617F	3			NORMAL	óbito após 39m
MF15	M	50	MFP	JAK 2 V617F	X	9p24.3p13.2(216,123-36,767,970) hmz		JAK 2, NFI B, PTENP1	vivo após 51m
MF16	F	67	MF pós - TE	CARL	1			NORMAL	viva após 51m
MF17	M	66	MFP	JAK 2 V617F	2	13q13.2q14.3(34,419,875-53,380,149)x1-2		JAK 2, CDKN2A, STK11, CARL, BCR	óbito após 30m

MF18	F	73	MFP	JAK 2 V617F	3	9p24.3p2.1(216123_3066162)hmz		JAK 2, NFIB, PTENP1	viva após 93m
MF19	M	59	MF pré - F	JAK 2 V617F	1	3q28(189,048,804-190,139,329)x1	1.090.525	TP63	óbito após 19m
MF20	F	82	MFP	JAK 2 V617F	1	9p24.3q13(208,454-68,234,097)x3 18p11.32p11.21(136,227-15,170,636)x1		JAK 2, NFIB, PTENP1	óbito após 43 m
MF21	M	37	MFP	CARL	0	NORMAL			vivo após 32m
MF22	M	48	MFP	JAK 2 V617F	4	2p13.1p11.2(74,139,628-89,129,064)hmz 6q22.31q23.2(122,165,276-134,129,708)hmz 7q31.32q36.3(122,153,555-155,964,676)hmz 11p14.3p13(24,549,526-35,437,736)hmz	14,989 11,964 33,811 10,888	POT1,SMOH e BRAF LMO2	óbito após 7m
MF23	F	48	MF pre-F	CARL	0	1p33p31.1(47,858,053-69,907,944)hmz 2p13.2q13(71,835,787-113,889,134)hmz 3p13q22.1(72,568,037-131,849,410)hmz 6p22.3p12.3(15,735,087-49,880,005)hmz 7q21.11q22.1(83,470,313-103,219,027)hmz 10q25.1q26.13(107,670,340-124,523,169)hmz 11q12.1q13.5(56,930,833-76,123,829)hmz 15q14q21.3(39,625,545-57,874,494)hmz Xp11.3p11.1(43,815,818-58,337,890) hmz	22 42,053 59,281 34,145 19,749 16,853 19,193 18,249 14,522	TMEM127,BUB1,IL1B e ILRN GATA2 DEK e GGB MX11 CCNDI e NUMA1 BUB1B	vivo após 30m

						11p11.2p11.12(46,304,337-51,563,636) hmz	5,259	
						9q33.1q33.2(120,027,912-125,306,402) hmz	5,278	
						Xp21.1p11.4(34,218,865-40,790,309) hmz	6,571	
						16p13.2p13.11(9,182,576-16,159,628) hmz	6,977	
MF24	M	35	MFP	CARL	0	NORMAL		viva após 25m
MF25	F	56	MFP	JAK 2 V617F	0	9p24.3p21.1(216,123-30,661,612) hmz	JAK 2, NFIB	viva após 181m
MF27	M	62	MFP	JAK 2 V617F	3	7q11.23q32.3(72,332,472-130,691,329)x1-2 9p24.1p21.2(7,923,327-27,258,655) hmz	PTPN12, MET, CUX1, SH2B2, PIK3CG	óbito após 11m
MF28	F	52	MFP	JAK 2 V617F	3	12q21.31q24.33(82,919,863-133,777,562) hmz	SH2B3, PTPN11, POLE	viva após 51m
MF29	M	56	MFP	JAK 2 V617F	0	NÃO REALIZADO		óbito após 22m
MF30	M	59	MFP	CARL	3	4q28.3q31.3(137,982,758-153,732,214) hmz, 17p13.3p13.1(2,245,751-7,158,485)x1-2 5q15q31.2(94,322,981-139,358,626)x1-2, 6p25.3p24.3(157070_7870497)x1-2 6p21.31p12(34354382_66744310)x1-2 6q27(168,336,561-168,611,331)x3, 11p11.2(44,309,726-44,935,085)x3, 11p11.2(46,838,250-47,071,043)x3, 13q13.1q21.32(32877758_67527643)X12 11q24.2q25(125921329_134937416)x2-3	CALR, TP53, C242F, PPM1D, DNMT3A	óbito após 4m

13q11q12.2(19436286_27848790)x2-3
 18q12.1q23(30,110,073-78,013,728)x1-2,
 18p11.32p11.21(136,227-14,093,049)x1-2

MF31	M	72	MFP	CARL	1	NÃO REALIZADO			<i>óbito após 3m</i>
MF32	M	73	MFP	JAK 2 V617F	3	NORMAL			<i>óbito após 4m</i>
MF33	M	66	MFP	CARL	2	20q11.23q13.2(36,112,919-53,464,314)x1-2		<i>TP53, PTPN1</i>	<i>óbito após 27m</i>
						20q11.23q13.2(35,525,521-52,555,927)x1			
MF34	M	60	MF pré-F	JAK 2 V617F	1	4q24(105,495,445-106,428,401)x1	932.956	<i>TET 2</i>	<i>vivo após 24m</i>
MF35	F	54	MFP	TN	3	13q14.13q22.1(46,724,112-74,601,935) hmz		<i>RBI, MYC</i>	<i>óbito após 4m</i>
						8q24.12q24.3(119,672,133-142,646,555) hmz			
						Xq24q27.1(117,602,294-139,853,006) hmz			
						Xp21.1p11.1(36,681,553-58,227,320) hmz			
						3q11.1q13.31(93,558,925-113,577,241) hmz			
						3p13p11.1(70,516,420-90,485,635) hmz			
						1q24.2q31.1(168,752,297-188,155,305) hmz			
						Xp22.2p21.3(12,367,433-28,727,874) hmz			
						15q25.2q26.2(82,394,360-97,308,588) hmz			
			G						
MF36	F	69	MF pos-PV	JAK 2 V617F	3	9p24.3p21.1(216,123-28,215,883) hmz	27.999.76	<i>JAK2, NFIB</i>	<i>óbito após 3m</i>

						10q11.22(47,132,183-48,311,490)x1	1.179.307		
MF37	M	71	MFP	JAK 2 V617F	4	arr[hg19] 21q11.2q22.3(15,016,486-48,093,361)x2-3	33076.875		
						7p22.3p15.3 (50,943-24,974,375)hmz		<i>RUNXI, DNMT3L, MPL, MUTYH, PIK3CA, MEN1, TP53, SRSF10</i>	<i>vivo em 21m</i>
						1q42.3q44(234,740,879-249,198,164)hmz			
						2p12p11.2(79,121,548-87,053,152)hmz			
						10p15.3p14 (135,330 -7,475,945)hmz			
						2q11.1q11.2(95,550,957-101,844,015)hmz			
						13q14.3q21.2(54,383,476-59,824,028)hmz			
MF38	F	71	MFP	JAK 2 V617F	2	21q11.2q22.3(15,016,486-48,093,361)x2-3		<i>PDGFA</i>	<i>vivo após 53m</i>
						Xp22.31p11.4(7,951,091-37,806,422) hmz			
						1p36.12p34.1(20,745,484-46,602,294) hmz	25856.81		
						5q13.2q15(70,688,401-95,373,029) hmz			
						1q24.2q31.1(167,513,158-190,595,906) hmz			
						3q26.1q26.33(161,478,714-181,637,333) hmz			
						11q12.1q13.3(56,694,717-69,935,447) hmz	13240.73		
						4q31.1q31.3(141,107,903-154,118,168) hmz			
						4p15.2p14(24,026,197-36,594,816) hmz			
						5q11.2q13.2(57,244,231-68,826,246) hmz			
						17p13.3p12(18,900-10,899,108) hmz			

Discussão / Conclusão

A mielofibrose primária é caracterizada por proliferação megacariocítica e mieloide e fibrose progressiva na medula. A mutação *JAK2* V617F é identificada em aproximadamente 60% de MFP. Note-se que a mutação *JAK2A* V617F pode ser detectada em indivíduos saudáveis por métodos de alta sensibilidade. CNVs foram identificados em aproximadamente um terço dos casos de MFP mostrando pequenas perdas genômicas (<5 Mb) com 750K SNP array (19). Em termos de perda de heterozigose (LOH), alterações recorrentes foram observadas apenas no cromossomo 9p. Arroz *et al.* (20) confirmaram que as anormalidades do cromossomo 9, incluindo 9p LOH, trissomia 9, ampliações de 9p13.3-23.3, 9q33.1-34.13 e 9q34.13 foram mais frequentes em neoplasias mieloproliferativas ao analisar 87 casos pelo CMA. Em nosso estudo também foi a alteração mais prevalente, 20,58% dos pacientes apresentaram LOH 9p do total dos 34 pacientes analisados por CMA.

Outras alterações genéticas recorrentes menos frequentes incluíram ganhos de 1p36.31-36.33, 17q21.2-q21.31 e 17q25.1-25.3, e deleções afetando 18p11.31-11.32. No estudo de perfis genéticos de neoplasias mieloproliferativas por 50K SNP array, Kawamata *et al.* (21) encontraram deleção de regiões cromossômicas que abrigam *RBI* (13q14) ou *NFI* (17q11) em 25% dos casos de MFP. Uma subpopulação com 9p a LOH foi detectada em aproximadamente 50% dos casos de MFP (34). No nosso estudo a segunda alteração mais frequente foram deleções afetando 7q.

Um subconjunto de pacientes com NMPs eventualmente progride para leucemia mielóide aguda. A identificação de alterações genéticas adquiridas que facilitem essa transformação seria valiosa para a estratificação do paciente. Em um estudo comparando perfis genômicos de 88 casos de NMP e 71 casos de NMP em fase blástica com matrizes de SNP de 50 e 250 K, a transformação leucêmica foi acompanhada por até três vezes

mais alterações genômicas por caso do que na fase crônica (24). As regiões genômicas comumente afetadas durante a transformação leucêmica abrigaram genes estabelecidos, como *ETV6*, *TP53* e *RUNX1*, e também novos genes candidatos em 7q, 16q, 19p e 21q. Trissomia 8 ou amplificação de 8q24 (*MYC*) foi identificada exclusivamente em *JAK2* V617F (-) fase de atividade da NMP. Um prognóstico ruim após a transformação leucêmica foi associado à perda de heterozigidade neutra em número de cópias (CN-LOH) em 7q ou 9p, incluindo *JAK2* V617F homozigoto. Com arrays SNP 6.0 de maior resolução, Rumi *et al.* (25) mostraram uma estreita relação entre UPD e/ou ganho do cromossomo 9p com progressão de PV para MF pós-PV e aberrações genéticas do cromossomo 5, 7 ou 17p associadas à progressão para LMA e menor sobrevida global (34).

A sobrevida mediana da nossa coorte foi de 4 anos (50.87m). Os pacientes que apresentaram mediana de sobrevida menor (MF 30, 31, 32, 35 e 36) 3,6 meses apresentaram alterações cromossômicas que abrigavam os genes cooperativos *NF1*, *RBI*, *TP53*, *DNMT3A*, *PPMID* que estão associados a pior prognóstico na literatura. Isso demonstra como este método auxilia na descoberta de genes envolvidos na fisiologia das neoplasias.

A frequência de CN-LOH encontrada (55,88%) é relativamente alta. Stegelmann e colaboradores descrevem este achado em 27% dos casos de MFP (36).

Identificamos CNVs em 41% dos pacientes como del (7p), del (13q), del (20q) como já reportado em outros estudos (36).

A ocorrência de mutações somáticas associada a perda de heterozigose (LOH) do gene *TP53*, gene supressor tumoral, está associada à transformação leucêmica das NMPs. A ocorrência de LOH e deleções de regiões que incluem genes importantes para a fisiopatologia da MF como genes supressores tumorais e genes envolvidos em mutações

cooperativas sugerem possíveis mutações nesses genes ressaltando a importância dessas mutações na evolução da doença. Em nosso estudo um paciente (MF30) associado a mutação do *TP53* apresentava del (17p) e sua doença evoluiu para leucemia aguda e óbito em 4 meses.

Analisando os nossos dados e da literatura verificamos a importância da mudança no curso histórico da caracterização diagnóstica e prognóstica dos pacientes com mielofibrose. Os resultados ainda não permitem relacionar as alterações encontradas à sobrevida dos pacientes já que o número de alterações detectadas é muito superior ao encontrado ao cariótipo.

O CMA permite detectar CNVs e LOH não detectando apenas rearranjos balanceados como translocações e inversões. Nosso estudo mostra que as LOHs desempenham um papel importante na evolução da doença sendo muito mais frequentes que as CNVs. Assim, o CMA torna-se mais relevante do que o cariótipo na caracterização de pacientes com MF e, futuramente pode-se considerar a inclusão desses dados em scores prognósticos.

Referências Bibliográficas:

1. Hahn, W.C.; Weinberg, R.A. Rules for making human tumor cells. N. Engl. J. Med. 2002, 347, 1593–1603.
2. Bayani, J.S.J. Traditional banding of chromosomes for cytogenetic analysis. Curr. Protoc. Cell Biol. 2004, S23.
3. Levsky, J.M.; Singer, R.H. Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. J. Cell Sci. 2003, 116, 2833–2838.

4. Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J.W.; Waldman, F.; Pinkel, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992, 258, 818–821.
5. Du Manoir, S.; Speicher, M.R.; Joos, S.; Schrock, E.; Popp, S.; Dohner, H.; Kovacs, G.; Robert-Nicoud, M.; Lichter, P.; Cremer, T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum. Genet.* 1993, 90, 590–610.
6. Kennedy, G.C.; Matsuzaki, H.; Dong, S.; Liu, W.M.; Huang, J.; Liu, G.; Su, X.; Cao, M.; Chen, W.; Zhang, J.; et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1233–1237.
7. Wong, K.K.; Tsang, Y.T.; Shen, J.; Cheng, R.S.; Chang, Y.M.; Man, T.K.; Lau, C.C. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32.
8. La Framboise, T. Single nucleotide polymorphism arrays: A decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 4181–4193.
9. Ley, T.J.; Mardis, E.R.; Ding, L.; Fulton, B.; McLellan, M.D.; Chen, K.; Dooling, D.; Dunford-Shore, B.H.; McGrath, S.; Hickenbotham, M.; et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008, 456, 66–72.
10. Gupta, M.; Raghavan, M.; Gale, R.E.; Chelala, C.; Allen, C.; Molloy, G.; Chaplin, T.; Linch, D.C.; Cazier, J.B.; Young, B.D. Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2008, 47, 729–739.
11. Langemeijer, S.M.; Kuiper, R.P.; Berends, M.; Knops, R.; Aslanyan, M.G.; Massop, M.; Stevens-Linders, E.; van Hoogen, P.; van Kessel, A.G.; Raymakers, R.A.; et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2009, 41, 838–842.

12. Ernst, T.; Chase, A.J.; Score, J.; Hidalgo-Curtis, C.E.; Bryant, C.; Jones, A.V.; Waghorn, K.; Zoi, K.; Ross, F.M.; Reiter, A.; et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* 2010, 42, 722–726.
13. Nikoloski, G.; Langemeijer, S.M.; Kuiper, R.P.; Knops, R.; Massop, M.; Tonnissen, E.R.; van der Heijden, A.; Scheele, T.N.; Vandenberghe, P.; de Witte, T.; et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2010, 42, 665–667.
14. Bejar, R.; Lord, A.; Stevenson, K.; Bar-Natan, M.; Perez-Ladaga, A.; Zaneveld, J.; Wang, H.; Caughey, B.; Stojanov, P.; Getz, G.; et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2014, 124, 2705–2712.
15. Merkerova, M.D.; Bystricka, D.; Belickova, M.; Krejcik, Z.; Zemanova, Z.; Polak, J.; Hajkova, H.; Brezinova, J.; Michalova, K.; Cermak, J. From cryptic chromosomal lesions to pathologically relevant genes: Integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2012, 51, 419–428.
16. Mullighan, C.G.; Miller, C.B.; Radtke, I.; Phillips, L.A.; Dalton, J.; Ma, J.; White, D.; Hughes, T.P.; le Beau, M.M.; Pui, C.H.; et al. BCR-AB11 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008, 453, 110–114.
17. Khorashad, J.S.; de Melo, V.A.; Fiegler, H.; Gerrard, G.; Marin, D.; Apperley, J.F.; Goldman, J.M.; Foroni, L.; Reid, A.G. Multiple sub-microscopic genomic lesions are a universal feature of chronic myeloid leukaemia at diagnosis. *Leukemia* 2008, 22, 1806–1807.
18. Nowak, D.; Ogawa, S.; Muschen, M.; Kato, M.; Kawamata, N.; Meixel, A.; Nowak, V.; Kim, H.S.; Kang, S.; Paquette, R.; et al. SNP array analysis of tyrosine kinase

inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. Blood 2010, 115, 1049–1053.

19. 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, 666–669.

20. Rice, K.L.; Lin, X.; Wolniak, K.; Ebert, B.L.; Berkofsky-Fessler, W.; Buzzai, M.; Sun, Y.; Xi, C.; Elkin, P.; Levine, R.; et al. Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms. Blood Cancer J. 2011, 1.

21. Kawamata, N.; Ogawa, S.; Yamamoto, G.; Lehmann, S.; Levine, R.L.; Pikman, Y.; Nannya, Y.; Sanada, M.; Miller, C.W.; Gilliland, D.G.; et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. Exp. Hematol. 2008, 36, 1471–1479.

22. Wang, L.; Swierczek, S.I.; Lanikova, L.; Kim, S.J.; Hickman, K.; Walker, K.; Wang, K.; Drummond, J.; Doddapaneni, H.; Reid, J.G.; et al. The relationship of JAK2(V617F) and acquired upd at chromosome 9p in polycythemia vera. Leukemia 2014, 28, 938–941.

23. Kilpivaara, O.; Mukherjee, S.; Schram, A.M.; Wadleigh, M.; Mullally, A.; Ebert, B.L.; Bass, A.; Marubayashi, S.; Heguy, A.; Garcia-Manero, G.; et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2 (V617F) – positive myeloproliferative neoplasms. Nat Genet. 2009 Apr; 41(4): 455-9.

24. Thoennissen, N.H.; Krug, U.O.; Lee, D.H.; Kawamata, N.; Iwanski, G.B.; Lasho, T.; Weiss, T.; Nowak, D.; Koren-Michowitz, M.; Kato, M.; et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Blood 2010, 115, 2882–2890.

25. Rumi, E.; Harutyunyan, A.; Elena, C.; Pietra, D.; Klampfl, T.; Bagienski, K.; Berg, T.; Casetti, I.; Pascutto, C.; Passamonti, F.; 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, 974–979.
26. Smith RE, Chelmowski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and pathologic features and treatment. Crit Rev Oncol Hematol 1990; 10:305.
27. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6:627.
28. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2021 Jan;96(1):145-162.
29. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 2013; 369:2379.
30. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med 2013; 369:2391.
31. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014; 28:1472.
32. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. Blood 2014; 123:3714.
33. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood 2016; 127:325.
34. Kawamata, N, et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single – nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. Exp. Hematol. 2008 Nov; 36 (11): 1471-9.

35. Milton Rego de Paula Junior, et al High Frequency of Copy-Neutral Loss of Heterozygosity in Patients with Myelofibrosis. Cytogenet Genome Res 2018;154:62–70.
36. Nonino, Alexandre, et al. Genomic characterization and prognostication applied to a Brazilian cohort of patients with myelofibrosis. International Journal of hematology 2020; 112:361-368.

5– Conclusões

1. Em média, o grupo MF apresentou valores de comprimento relativo dos telômeros (T/L) de 1,757 pontos a menos que o grupo controle ($p = 0,0003$). O grupo controle masculino apresentou valores de comprimento relativo dos telômeros (T/L) em média 0,145 pontos menores que o grupo controle feminino, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1664$). Da mesma forma, pacientes com MF do sexo masculino apresentaram valores relativos de comprimento dos telômeros (T/L) em média 0,012 pontos mais curtos do que pacientes com MF do sexo feminino, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,9168$). Portanto, o gênero não é um fator que explique as variações no comprimento relativo dos telômeros (T/L).
2. Para cada aumento de um ano na idade dos pacientes controle, os valores do comprimento relativo dos telômeros (T/L) caem em média 0,018 unidades ($p = 0,0021$). Por outro lado, para cada aumento de um ano na idade dos pacientes com MF, os valores do comprimento relativo dos telômeros (T/L) aumentam em média 0,004 unidades ($p = 0,4648$). Portanto, a mudança na idade não altera significativamente os valores médios do comprimento relativo dos telômeros (T/L).

3. Os valores médios do comprimento relativo dos telômeros (T/L) não diferem significativamente entre os tipos de mutação (JAK2V617F positivo versus JAK2V617F negativo) ($p = 0,5058$).
4. Os valores médios do comprimento relativo dos telômeros (T/L) não diferem significativamente entre os tipos de IPSS ($p = 0,6613$) e entre os tipos de diagnósticos ($p = 0,3842$).
5. A análise de microarranjo cromossômico (CMA) detectou alterações no número de cópias ou LOH em 26 dos 34 (76,47%) pacientes que realizaram CMA; estes incluíram 12 pacientes CN-LOH, sendo 7 pacientes com LOH em 9p (20,58%) (figura B e D), 9 pacientes apresentaram deleções, 4 deleções em mosaico, 1 duplicação, 1 duplicação em mosaico. Um paciente apresentou uma única anormalidade, uma trissomia do cromossomo 8.
6. A taxa de detecção do CMA de desequilíbrios cromossômicos numéricos e estruturais de CNVs presumidas patogênicas foi de 26/34 pacientes (76,47%). Sete pacientes tiveram um desequilíbrio no número de cópias únicas sem CN-LOH. Em relação às deleções detectadas, 8 foram identificadas em um único paciente que apresentava 2 rearranjos cromossômicos complexos envolvendo os cromossomos 7 e 12. Identificamos 74 CN-LOH em nossa amostra, distribuídos em 12 pacientes, variando de 1 a 13 segmentos de CN-LOH. Cinco pacientes apresentaram um único CN-LOH sem nenhum outra LOH ou desequilíbrio.
7. A sobrevida mediana da coorte estudada foi de 4 anos (50.87m). Os pacientes que apresentaram mediana de sobrevida menor (MF 30, 31, 32, 35 e 36) 3,6 meses apresentaram alterações cromossômicas que abrigavam os genes cooperativos NF1, RBI, TP53, DNMT3A, PPM1D.

8. A mutação cooperativa mais prevalente foi NF1 18% (supressor tumoral), seguida por RBI 11% (supressor tumoral), TP53 11% (supressor tumoral) e SH2B3 11% (gene de transdução de sinal).
9. As LOHs desempenham um papel importante na evolução da doença sendo muito mais frequentes que as CNVs. Assim, o CMA torna-se mais relevante do que o cariótipo na caracterização de pacientes com MF e, futuramente pode-se considerar a inclusão desses dados em scores prognósticos.

6- Referências Bibliográficas

1. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, et al. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. Am J Hematol 1999; 61:10.
2. Visani G, Finelli C, Castelli U, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. Br J Haematol 1990; 75:4.
3. Smith RE, Chelmowski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and pathologic features and treatment. Crit Rev Oncol Hematol 1990; 10:305.
4. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. Medicine (Baltimore) 1983; 62:353.
5. Dingli D, Utz JP, Krowka MJ, et al. Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. Chest 2001; 120:801.

6. Cortelezzi A, Gritti G, Del Papa N, et al. Pulmonary arterial hypertension in primary myelofibrosis is common and associated with an altered angiogenic status. Leukemia 2008; 22:646.
7. Mesa RA, Kantarjian H, Tefferi A, et al. Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for measuring symptomatic improvement: performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2 inhibitor (INCB018424) clinical trial. Cancer 2011; 117:4869.
8. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. Blood 2010; 115:778.
9. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, et al. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. Haematologica 2010; 95:1788.
10. O'Reilly RA. Splenomegaly in 2,505 patients in a large university medical center from 1913 to 1995. 1913 to 1962: 2,056 patients. West J Med 1998; 169:78.
11. Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. Blood 1996; 88:1013.
12. Georgiades CS, Neyman EG, Francis IR, et al. Typical and atypical presentations of extramedullary hemopoiesis. AJR Am J Roentgenol 2002; 179:1239.
13. Koch CA, Li CY, Mesa RA, Tefferi A. Nonhepatosplenic extramedullary hematopoiesis: associated diseases, pathology, clinical course, and treatment. Mayo Clin Proc 2003; 78:1223.
14. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. Br J Haematol 2007; 137:244.

15. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001; 98:3249.
16. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, et al. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol* 2005; 128:42.
17. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005; 23:5688.
18. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, et al. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. *Leuk Lymphoma* 1996; 22:303.
19. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110:1092.
20. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2008; 111:1862.
21. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369:2379.
22. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369:2391.

23. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014; 28:1472.
24. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. Blood 2014; 123:3714.
25. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood 2016; 127:325.
26. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, 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; 113:2895.
27. Cervantes F, Dupriez B, Passamonti F, et al. Improving survival trends in primary myelofibrosis: an international study. J Clin Oncol 2012; 30:2981.
28. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. Blood 2005; 105:973.
29. Cervantes F, Tassies D, Salgado C, et al. Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. Acta Haematol 1991; 85:124.
30. Hernández JM, San Miguel JF, González M, et al. Development of acute leukaemia after idiopathic myelofibrosis. J Clin Pathol 1992; 45:427.
31. Passamonti F, Rumi E, Elena C, et al. Incidence of leukaemia in patients with primary myelofibrosis and RBC-transfusion-dependence. Br J Haematol 2010; 150:719.
32. Huang J, Li CY, Mesa RA, et al. Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. Cancer 2008; 112:2726.

33. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. Blood 2008; 112:231.
34. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127:2391.
35. Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A, et al. Primary myelofibrosis. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL (Eds), IARC Press, Lyon 2008. p.44.
36. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6:627.
37. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. Blood 2017; 129:3227.
38. Vallespí T, Imbert M, Mecucci C, et al. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. Haematologica 1998; 83:258.
39. Georgii A, Buhr T, Buesche G, et al. Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. Leuk Lymphoma 1996; 22 Suppl 1:15.
40. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. Blood 2011; 117:5710.
41. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2013; 88:141.

42. Kvasnicka HM, Thiele J. Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification. Am J Hematol 2010; 85:62.
43. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. J Clin Oncol 2011; 29:3179.
44. Barbui T, Thiele J, Carobbio A, et al. Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. Blood 2012; 120:569.
45. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, 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; 22:437.
46. Burthem J, Cawley JC. The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. Blood 1994; 83:497.
47. Rashidi A, Rouillet MR. Romiplostim-induced myelofibrosis. Blood 2013; 122:2001.
48. Kiely JM, Silverstein MN. Metastatic carcinoma simulating agnogenic myeloid metaplasia and myelofibrosis. Cancer 1969; 24:1041.
49. Yablonski-Peretz T, Sulkes A, Polliack A, et al. Secondary myelofibrosis with metastatic breast cancer simulating agnogenic myeloid metaplasia: report of a case and review of the literature. Med Pediatr Oncol 1985; 13:92.
50. Popat U, Frost A, Liu E, et al. High levels of circulating CD34 cells, dacrocytes, clonal hematopoiesis, and JAK2 mutation differentiate myelofibrosis with myeloid metaplasia from secondary myelofibrosis associated with pulmonary hypertension. Blood 2006; 107:3486.

51. Popat U, Frost A, Liu E, et al. New onset of myelofibrosis in association with pulmonary arterial hypertension. Ann Intern Med 2005; 143:466.
52. Ayalew Tefferi , Paola Guglielmelli , Maura Nicolosi , Francesco Mannelli , Mythri Mudireddy ,Niccolo Bartalucci ,Christy M. Finke ,Terra L. Lasho ,Curtis A. Hanson ,Rhett P. Ketterling ,Kebede H. Begna ,Naseema Gangat ,Animesh Pardanani & Alessandro M. Vannucchi. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis *Leucemia*, 2018; 32 : 1631-1642.
53. Marco Ruella, Silvia Salmoiraghi et al. Telomere shortening in Ph- negative chronic myeloproliferative neoplasms:A biological marker of polycythemia vera and myelofibrosis, regardless of hydroxycarbamide therapy. Experimental Hematology 2013; 41:627-634.
54. G. Caocci, M. Greco, C. Secchi et al. Ruxolitinib therapy and telomere length in myelofibrosis. Blood Cancer J. 2016 Oct;6(10)e479.
55. Ayalew Tefferi, Terra L. Lasho, Kebede H. Begna, MirinalM. Patnaik et al. A Pilot Study of the Teomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. N. Engl. J.Med.2015; 373:908-19.
56. Theresa Vasko, Andrea Kaifie, Matthias B. Stope, Thomas Kraus and Patrick Ziegler. Telomeres and Telomerase in Hematopoietic Dysfunction: Prognostic Implications and Pharmacological Interventions. IntJ.Mol. Sci 2017, 18, 2267.
57. Terasaki.Y, Okumura H, Ohtake S, Nakao S. Accelerated telomere length shortening in granulocytes: a diagnostic marker for myeloproliferative diseases. Exp.Hematol. 2002. Dec;30 (12):1399-404.
58. Mohammad A. Jafri, Shakeel A. Ansari, Mohammed H. Alqahtani and Jerry W. Shay. Roles of telomeres and telomerase in câncer, and advances in telomerase –targeted therapies. Genome Medicine. (2016) 8:69.

59. Susan E. Stanley and Mary Armanios. The Short and Long Telomere Syndromes: Paired Paradigms for Molecular Medicine. Curr. Opin. Genet Dev. 2015 Aug;33:1-9.
60. Chin, L.; Artandi, S.E.; Shen, Q., et al. P53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. Cell. 1999;97,527-538.
61. Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence. Biosays. 1990;12: 363-369.
62. Harley CB. Telomere Loss: Mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res. 1991;256: 271-282.
63. Lindsey J. McGill NI, Lindsey L.A. et al. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. Mutat Res. 1991; 256:45-48.
64. Allsopp RC, Vaziri H et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992;89: 10114-10118.
65. Wentzensen IM, Mirabello L., et al. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20: 1238-1250.
66. Terasaki Y, Okumura H, Ohtake S, Nakao S. Accelerated telomere length shortening in granulocytes: a diagnostic marker for myeloproliferative diseases. Exp Hematol. 2002;30: 1399-1404.
67. Keller G, Brassat U, Braig M, Heim D, et al. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. Hematol Oncol. 2009;27:123-129.
68. Drummond M, Lennard A, Brummendorf T, Holyoake T. Telomerase shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of chronic myeloid leucemia. Leuk Lymphoma. 2004;45: 1775-1781.

69. Bernard L, Belisle C, Mollica L, et al. Telomere length is severely and similarly reduced in JAK2V617F – positive and negative myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2009; 23:287-291.
70. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, 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; 29:392.
71. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype – Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. J. Clin Oncol 2018; 36:1765.
72. Milton Rego de Paula Junior, et al High Frequency of Copy-Neutral Loss of Heterozygosity in Patients with Myelofibrosis. Cytogenet Genome Res 2018;154:62–70.
73. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood 2011; 118:1723.
74. Nascimento J.M. Análise do perfil de expressão de mutações driver por Mlpa em pacientes com mielofibrose. 2017. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Brasília,2017.
75. Xiaoyi Hu, Jing li, Maorong Fu, Xia Zhao, Wei Wang. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Signal Transduct Target Ther. 2021; 6: 402. Published online 2021 Nov 26.
76. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2021 Jan;96(1):145-162.
77. Dania G. Torres, Jhemerson Paes, Allyson G. da Costa, Adriana Malheiro, George V. Silva, Lucivana P. de Souza Mourão, Andréa M. Tarragô JAK2 Variant Signaling:

Genetic, Hematologic and Immune Implication in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Biomolecules*. 2022 Feb; 12(2): 291. doi: 10.3390/biom12020291.

78. Rita Campanelli, Margarida Massa, Vittorio Rosti e Giovanni Barosi. New Markers of disease progression in myelofibrosis. *Cancers* 2021,13 (21), 5324; doi: 10.3390/cancers13215.
79. Skvortzov, M. P. Rubzova, M. E. Zvereva, F. L. Kiselev, O. A. Donzova. The Regulation of Telomerase in Oncogenesis. *Acta Naturae*. 2009 Apr; 1(1): 51–67.
80. Henrique A. Parsons. Telômeros, telomerase e câncer. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*, v. 5, n. 1, p. 54-59, 2003.
81. Allegra, Alessandro; Inão, Vanessa; Pena, Giuseppa; Gerace, Demétrio; Allegra, Andrea G.; Musolino, Catarina. Telomerase and telomere biology in hematological diseases: A new therapeutic target. *Leukemia Research*, 56, 60-74.
82. BullingerL, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin Oncol* 2017;35:934.
83. Nonino, Alexandre, et al. Genomic characterization and prognostication applied to a Brazilian cohort of patients with myelofibrosis. *International Journal of hematology* 2020; 112:361-368.