



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*RAFAELA REIS VIEIRA*

Mielofibrose Primária: Análise do perfil clínico e genômico

**Orientador (es):** Dra. Ilana Zalcborg Renault

**Coorientador (es):** Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**RIO DE JANEIRO  
2021**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*RAFAELA REIS VIEIRA*

Mielofibrose Primária: Análise do perfil clínico e genômico

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Oncologia

**Orientador (es):** Dra. Ilana Zalcberg Renault

**Coorientador (es):** Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**RIO DE JANEIRO  
2021**

V658m Vieira, Rafaela Reis

Mielofibrose Primária: Análise do perfil clínico e genômico / Rafaela Reis Vieira. – Rio de Janeiro, 2021.  
84 f.: il. Color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2021.

Orientador: Dra. Ilana Zalberg Renault

Coorientador: Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

1. Biologia Molecular. 2. Mielofibrose Primária. 3. Sistemas de Estratificação de Risco. 4. NGS.  
I. Renault, Ilana Zalberg (Orient.). II. Monte-Mór, Bárbara da Costa Reis (CoOrient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99441

Catálogo na fonte  
Kátia Simões CRB7/5952



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

***AUTOR: RAFAELA REIS VIEIRA***

**Mielofibrose Primária: Análise do perfil clínico e genômico**

**Orientador (es):** Dra. Ilana Zalcborg Renault

**Corientador (es):** Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**Aprovada em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira- INCA – Titular

Profa. Dra. Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes – USP – Titular

Profa. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira – INCA - Titular

Dra. Renata Bianto Gomes– INCA - Suplente

Prof. Dr. Gustavo Jacob Lourenço – UNICAMP – Suplente

**RIO DE JANEIRO**

**2021**

iv

## DEDICATÓRIA

**À minha mãe, minha avó e minha madrinha** que sempre me apoiaram com muito carinho, não medindo esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

**Ao meu pai** que sempre me apoiou incondicionalmente, sem ele esta dissertação e muitos dos meus sonhos não seriam possíveis.

## AGRADECIMENTOS

**À minha orientadora científica Dra. Ilana Zalcborg** por todos os ensinamentos, pela oportunidade e por me receber tão bem em seu laboratório, que foi imprescindível no desenvolvimento desta dissertação e na minha vida acadêmica.

**À minha coorientadora científica Dra. Bárbara Monte-Mor**, por todos os ensinamentos que foram muito importantes para realização desta dissertação, e principalmente pela amizade sincera.

**À todos do laboratório de biologia molecular do CEMO**, em especial à **Dra. Luciana Gutiyama** pelo auxílio e conselhos em todos os momentos.

**Ao Dr. Adelmo Dumas e a Dra. Cristiana Solza** por cederem as amostras e dados clínicos utilizados nesta dissertação.

**Aos pacientes**, sem os quais este estudo não seria possível.

**Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia (PPGO)**, e a todos os **professores** pelos quais passei nesses anos por todos os ensinamentos que tornaram possível me tornar a profissional que sou hoje.

**Aos meus amigos** pelo apoio constante, em especial a **Rafaella Naressi** pelas disciplinas realizadas em conjunto e os conhecimentos compartilhados, e a **Beatriz Melges** por ser meu apoio constante em todos os momentos.

**Ao Ministério de Saúde, CAPES, CNPq e FAPERJ** pelo apoio técnico e financeiro para que este trabalho pudesse ser realizado.

*“Toute réussite déguise une abdication”*

*Simone de Beauvoir*



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**Mielofibrose Primária: Análise do perfil clínico e genômico**

**Rafaela Reis Vieira**

A mielofibrose primária (MFP) é uma neoplasia mieloproliferativa (NMP), doença que tem origem em uma célula tronco-hematopoética mutada. A MFP cursa com expressão anormal de citocinas, fibrose medular, hematopoiese extramedular, hepatoesplenomegalia, trombose, anemia e sintomas constitucionais. A progressão da doença envolve transformação para leucemia mieloide aguda. Atualmente, a única modalidade de tratamento com potencial curativo é o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Sistemas de estratificação de risco como The International Prognostic Scoring System (IPSS) consideram características clínicas e laboratoriais para classificar pacientes com MFP em baixo, intermediário 1 e 2 e alto risco. Diversos estudos descreveram a arquitetura clonal da MFP e mostraram o impacto prognóstico de diferentes alterações genômicas, incluindo número e combinação de mutações somáticas. Novas propostas de sistemas de classificação buscam incorporar informações acerca de marcadores moleculares para estratificação de risco. Neste estudo, analisamos características clínicas, laboratoriais e genômicas de 32 pacientes com MFP, provenientes de dois centros no Rio de Janeiro (HUPE e HUAP) e referidos ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO-INCA. As características demográficas, clínicas e laboratoriais foram coletadas através da ficha clínica elaborada pelo grupo de pesquisa em NMPs. A caracterização genômica foi realizada em nosso laboratório e incluiu: análise dos marcadores moleculares de diagnóstico *JAK2V617F*, *CALR* e *MPL* e de sequenciamento de próxima geração (NGS) para um painel customizado, cobrindo a região exônica completa de 37 genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides. Em 94% dos pacientes pelo menos uma mutação de driver foi encontrada. Pacientes com mutação em *JAK2*, quando comparados a pacientes com mutação em *CALR*, apresentaram idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina significativamente maior. Com relação às mutações adicionais analisadas por NGS, a maioria foi do tipo missense. O gene com maior frequência de mutações foi *ASXL1* (11 mutações). 12 pacientes apresentaram 1 mutação, 8 pacientes, 2 mutações, 6 pacientes, 3 mutações e 6 pacientes apresentaram 4 ou mais mutações. Quando agrupados em função da quantidade de mutações, os pacientes apresentaram diferença estatisticamente significativa na sobrevida. Além disso, verificou-se que 33,3% dos pacientes apresentaram mutações em genes que foram descritos na literatura como tendo impacto negativo no prognóstico (High Molecular Risk ou HMR), sendo que a presença de duas mutações HMR foi detectada em 12,1%. Quando estratificados pelo sistema de pontuação IPSS, 9 pacientes encontravam-se na categoria de risco baixo, 11 pacientes na categoria de risco intermediário-1, 10 pacientes na categoria de risco intermediário-2 e 2 pacientes na categoria de risco alto. Utilizando as informações clínicas, laboratoriais e genômicas disponíveis, aplicamos o modelo de estratificação de risco personalizado descrito por Grinfeld et al. Por meio desse sistema, foi possível observar heterogeneidade na sobrevida esperada para cada paciente, mesmo entre pacientes classificados no mesmo grupo de risco pelo IPSS. E pacientes que apresentavam maior número de mutações apresentavam um pior risco prognóstico. A análise realizada neste trabalho corrobora a relevância da caracterização genômica dos pacientes para determinação de seu prognóstico personalizado, o que poderia contribuir para individualização terapêutica na MFP.





**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

## Primary Myelofibrosis: Analysis of the clinical and genomic profile

**Rafaela Reis Vieira**

Primary myelofibrosis (PMF) is a myeloproliferative neoplasm (MPN), a disease that originates in a mutated hematopoietic stem cell. PMF courses with abnormal expression of cytokines, fibrosis, extramedullary hematopoiesis, hepatosplenomegaly, thrombosis, anemia and constitutional symptoms. The progression of the disease involves transformation to acute myeloid leukemia. Currently, the only treatment modality with curative potential is the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Risk stratification systems such as The International Prognostic Scoring System (IPSS) consider clinical and laboratory characteristics to classify patients with PMF as low, intermediate 1 and 2 and high risk. Several studies have described the clonal architecture of the PMF and shown the prognostic impact of different genomic changes, including the number and combination of somatic mutations. New proposals for classification systems seek to incorporate information about molecular markers for risk stratification. In this study, we analyzed the clinical, laboratory and genomic characteristics of 32 patients with PMF from two centers in Rio de Janeiro (HUPE and HUAP) referred to the CEMO-INCA Molecular Biology Laboratory. Demographic, clinical and laboratory characteristics were collected through the clinical form prepared by the MPNs research group. Genomic characterization was executed in our laboratory and included: analysis of the diagnostic molecular markers *JAK2V617F*, *CALR* and *MPL* and next generation sequencing (NGS) for a customized panel, covering the complete exonic region of 37 recurrently mutated genes in myeloid neoplasms. In 94% of patients, at least one driver mutation was found. Patients with mutation in *JAK2*, when compared with patients with mutation in *CALR*, had a significantly higher age at diagnosis, leukocyte count and hemoglobin levels. Regarding the additional mutations analyzed by NGS, the majority were of the Missense type. The gene with the highest frequency of mutations was *ASXL1* (11 mutations). 12 patients had 1 mutation, 8 patients, 2 mutations, 6 patients, 3 mutations and 6 patients had 4 or more mutations. When grouped according to the number of mutations, the patients showed a statistically significant difference in survival. In addition, it was found that 33.3% of patients had mutations in genes that have been described in the literature as having a negative impact on the prognosis (High Molecular Risk or HMR), with the presence of two HMR mutations being detected in 12.1%. When stratified by IPSS, 9 patients were in the low risk category, 11 patients in the intermediate risk category-1, 10 patients in the intermediate risk category-2 and 2 patients in the high risk category. Using the available clinical, laboratory and genomic information, we apply the personalized risk stratification model described by Grinfeld et al. Through this system, it was possible to observe heterogeneity in the expected survival for each patient, even among patients classified in the same risk group by the IPSS. And patients who had a higher number of mutations had a worse prognostic risk. The analysis demonstrated in this work corroborates the relevance of the genomic characterization of patients to determine their personalized prognosis, which could contribute to therapeutic individualization in PMF.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Modelo hierárquico da hematopoese humana .....	1
Figura 1.2. Via JAK-STAT .....	3
Figura 1.3. Modelo da interação da proteína ASXL1 com os complexos protéicos responsáveis pela regulação das histonas.....	9
Figura 1.4. Modelo do papel de DNMT3A em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) .....	10
Figura 1.5. Funções de EZH2 .....	12
Figura 1.6. Frequência e distribuição de genes mutados nas Neoplasias Mieloproliferativas BCR-ABL negativas clássicas (NMPs) .....	19
Figura 3.1. Fluxograma de análise molecular de pacientes com mielofibrose primária (MFP) nesse estudo .....	28
Figura 3.2. Calculadora de risco personalizado proposta por Grinfeld J. e colaboradores.....	35
Figura 4.1. Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos 32 pacientes com mielofibrose primária (MFP) .....	37
Figura 4.2. Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes com mielofibrose primária (MFP), comparando os diferentes grupos estratificados de acordo com o sistema IPSS.....	38
Figura 4.3. Distribuição de mutações <i>driver</i> em pacientes com mielofibrose primária (MFP) .....	39
Figura 4.4. Comparação entre o grupo de pacientes com mielofibrose primária portadores de mutação em <i>JAK2</i> e o grupo de portadores de mutação em <i>CALR</i> , com relação a variáveis demográfica e laboratoriais .....	40
Figura 4.5. Perfil molecular dos pacientes com mielofibrose primária (MFP) .....	46
Figura 4.6. Genes mutados em mielofibrose primária (MFP) nesse estudo.....	47
Figura 4.7. Distribuição dos pacientes com mielofibrose primária (MFP) em função do número de mutações.....	48
Figura 4.8. Avaliação do impacto de mutações na sobrevida dos pacientes com mielofibrose primária (MFP) nesse estudo .....	50
Figura 4.9. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Baixo pelo IPSS .....	53
Figura 4.10. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Intermediário 1 pelo IPSS.....	53
Figura 4.11. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Intermediário 2 pelo IPSS.....	58

Figura 4.12. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Alto pelo IPSS .....	<b>59</b>
Figura 5.1. Os receptores de citocinas e mecanismos patogênicos subjacentes à mutação <i>JAK2V617F</i> e inserções e deleções em <i>CALR</i> .....	<b>62</b>
Figura 5.2. Modelagem do desfecho de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs) segundo Grinfeld e colaboradores. ) .....	<b>64</b>
Figura 5.3. Mutações em TP53 e a transformação leucêmica a partir de neoplasias mieloproliferativas (NMPs) .....	<b>65</b>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.1 Critérios para diagnóstico de Mielofibrose Primária .....	<b>21</b>
Tabela 1.2 Sistema de pontuação prognóstica internacional (IPSS) .....	<b>22</b>
Tabela 1.3. Variáveis dos diferentes sistemas de classificação de risco .....	<b>24</b>
Tabela 4.1. Variáveis clínicas e laboratoriais .....	<b>36</b>
Tabela 4.2. Estratificação de pacientes segundo IPSS.....	<b>37</b>
Tabela 4.3. Variáveis clínicas e laboratoriais de pacientes com MFP de acordo com a mutação driver.....	<b>40</b>
Tabela 4.4. Variantes novas encontradas pelo NGS Tabela.....	<b>44</b>
Tabela 4.5. Informações utilizadas para cálculo do modelo prognóstico dos pacientes classificados como risco baixo pelo IPSS Tabela .....	<b>52</b>
Tabela 4.6. Informações utilizadas para cálculo do modelo prognóstico dos pacientes classificados como risco intermediário 1 pelo IPSS Tabela .....	<b>54</b>
Tabela 4.7. Informações utilizadas para cálculo do modelo prognóstico dos pacientes classificados como risco intermediário 2 pelo IPSS Tabela.....	<b>57</b>
Tabela 4.8. Informações utilizadas para cálculo do modelo prognóstico dos pacientes classificados como risco alto pelo IPSS .....	<b>59</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Alo-TCTH** - Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas
- AML1** - Acute myeloid leukemia 1 protein
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASXL1** - Homólogo humano do gene Additional Sex Comb (Asx) de *Drosophila melanogaster*
- CALR** - Gene da calreticulina
- CBL** - Casitas B-lineage Lymphoma
- CEMO** - Centro de Transplantes de Medula Óssea
- CHIP** - Clonal de potencial indeterminado
- COSMIC** - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
- CUX1** - CUT-like homeobox 1
- dbSNP** - The Single Nucleotide Polymorphism Database
- DIPPS-plus** - Dynamic International Prognostic Scoring System Plus
- DIPSS** - Dynamic International Prognostic Scoring System
- DMP** - Doenças Mieloproliferativas
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DNMT3A** - DNA methyltransferase 3A
- DP** - Profundidade de cobertura
- EPO** - Eritropoietina
- EPOR** - Receptor de Eritropoietina
- EZH2** - Enhancer of zeste homolog 2
- G-CSF-R** - Receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos
- GATK** - Genome Analysis Tool Kit
- GIPSS** - Genetically Inspired Prognostic Scoring System
- GMAF** - Frequência global de alelo menor
- HMR** - Mutações de alto risco molecular
- HSCs** - Células-tronco hematopoiéticas
- HUAP** - Hospital Universitário Antônio Pedro
- HUPE** - Hospital Universitário Pedro Ernesto

**IDH1** - Isocitrato Dehidrogenase 1  
**IDH2** - Isocitrato Dehidrogenase 2  
**IGV** - The Integrative Genomics Viewer  
**INCA** - Instituto Nacional de Câncer  
**INDEL** - Insertion–deletion mutations  
**IPSS** - International Prognostic Scoring System  
**JAK2** - Janus Tirosina-quinase 2  
**KIT** - KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase  
**KRAS** - Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten  
**LDH** - Lactato desidrogenase  
**LMA** - Leucemia Mieloide Aguda  
**LMC** - Leucemia Mieloide Crônica  
**LMMJ** - Leucemia mielomonocítica juvenil  
**LNC** - Leucemia Neutrofílica Crônica  
**MFP** - Mielofibrose Primária  
**MIPSS70** - Mutation-Enhanced International Prognostic Score System  
**MIPSS70-plus** - Mutation-Enhanced International Prognostic Score System Plus  
**MNV** - Multi-nucleotide variants  
**MPL** - Myeloproliferative Leukemia Vírus Oncogene  
**MPL** - Receptor de Trombopoietina  
**MPN-SAF-TSS** - Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form -Total Symptom Score  
**mRNA** - RNA mensageiro  
**MT** - Sequência mutada  
**NGS** - Next-Generation Sequencing  
**NMPs** - Neoplasias Mieloproliferativas  
**OMS** - Organização Mundial da Saúde  
**PCR** - Polymerase Chain Reaction  
**POLYPHEN** - Polymorphism Phenotyping  
**PRC1** - Polycomb repression complex  
**PRC2** - Polycomb repression complex 2  
**PTPN11** - Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11  
**PV** - Policitemia Vera

**RNA** - Ácido ribonucleico  
**RR** - Razão de risco  
**RUNX1** - Runt-related transcription factor  
**SF3B1** - Splicing factor 3b subunit 1  
**SIFT** - Sorting Intolerant from tolerant  
**SMD** - Síndrome Mielodisplásica  
**SNVs** - Variantes de nucleotídeo único  
**TCLE** - Termo de consentimento livre e esclarecido  
**TE** - Trombocitemia Essencial  
**TET2** - Ten-eleven translocation 2  
**TKI** - Inibidores da Tirosina Quinase  
**TN** - Triplo negativos  
**TP53** - Tumor protein P53  
**TPO** - Trombopoietina  
**U2AF1** - U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1  
**UTR** - Região do DNA não traduzida  
**VAF** - Variant Allelic Frequency  
**VEP** - Preditor de Efeito de Variante do Ensembl  
**WT** - Sequência selvagem  
**ZRSR2** - Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich

# ÍNDICE GERAL

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Neoplasias mieloproliferativas	1
1.2. Fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas	2
1.3. Genômica das NMPs - Mutações drivers	4
1.3.1. <i>JAK2</i>	4
1.3.2. <i>MPL</i>	5
1.3.3. <i>CALR</i>	6
1.3.4. Triplo Negativos	7
1.4. Genômica das NMPs - Mutações adicionais	8
1.4.1. Regulação epigenética ( <i>ASXL1, DNMT3A, EZH2, IDH1 / 2, TET2</i> )	8
1.4.2. Processamento de mRNA ( <i>SF3B1, U2AF1, ZRSR2</i> )	13
1.4.3. Regulação transcricional ( <i>RUNX1, CUX1</i> )	15
1.4.4. Vias de sinalização celular ( <i>CBL, KIT, KRAS, PTPN11</i> )	16
1.4.5. Ciclo celular e apoptose ( <i>TP53</i> )	18
1.5. Mielofibrose Primária	19
1.5.1 Prognóstico de MFP	21
<b>2. Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1. Principal	25
2.2. Específicos	25
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>25</b>
3.1. Aspectos éticos e pacientes	25
3.2. Amostras biológicas	26
3.3. Extração de DNA	26
3.4. Análise molecular de diagnóstico	27
3.5. Análise de dados NGS	31



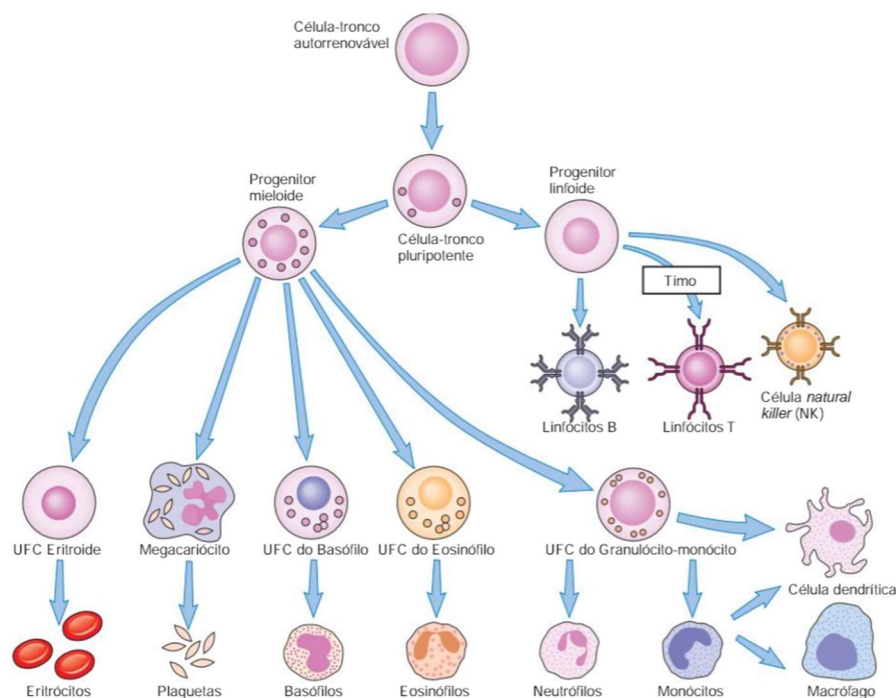
3.6. Sistemas de estratificação de risco .....	32
3.7. Análise estatística .....	35
<b>4.Resultados.....</b>	<b>35</b>
4.1.Casuística .....	35
4.2 Frequência das mutações drivers e sua correlação com as variáveis clínico-laboratoriais ao diagnóstico.....	38
4.3 Análise do perfil genômico .....	41
4.4 Impacto do perfil genômico dos pacientes no prognóstico.....	48
<b>5.Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>6.Conclusões .....</b>	<b>66</b>
<b>7.Referências Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Apêndices .....</b>	<b>85</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Neoplasias mieloproliferativas

Em 1951, as neoplasias mieloproliferativas foram agrupadas pela primeira vez como doenças mieloproliferativas (DMP) em função das semelhanças clínicas/biológicas, caracterizadas pela proliferação excessiva de precursores hematopoiéticos na medula óssea e produção excessiva de células sanguíneas maduras. Foram propostas quatro entidades: leucemia mieloide crônica (LMC), policitemia vera (PV), mielofibrose primária (MFP), e trombocitemia essencial (TE) e eritroleucemia (DAMESHEK, 1951). Em sua edição de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou como neoplasias mieloproliferativas (NMPs) além das quatro entidades clássicas—LMC, PV, MFP e TE, leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica-não especificada de outra forma e NMP não classificável (ARBER D. A., 2016).

As neoplasias mieloproliferativas se iniciam a partir da expansão clonal de uma célula tronco-hematopoética mutada, levando à proliferação aumentada e maturação de uma ou mais células da série mieloide (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Modelo hierárquico da hematopoese humana.** Segundo o modelo hierárquico da hematopoese, uma célula tronco hematopoética pode se autorrenovar ou dar origem aos progenitores linfoide ou mieloide. O progenitor mieloide dá origem a unidades formadoras de colônias (UFC)

eritroide, megacariocítica, de basófilo, de eosinófilo e granulócito-macrófago. Enquanto o progenitor linfóide, dá origem aos linfócitos B, T e células *natural killer* (NK). Nas neoplasias mieloproliferativas clássicas a célula tronco-hematopoética mutada leva ao aumento da proliferação de células das linhagens mielóides. (Fonte: (Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 5e, Philadelphia, 2004).Fonte: (Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 5e, Philadelphia, 2004).

## 1.2 Fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas

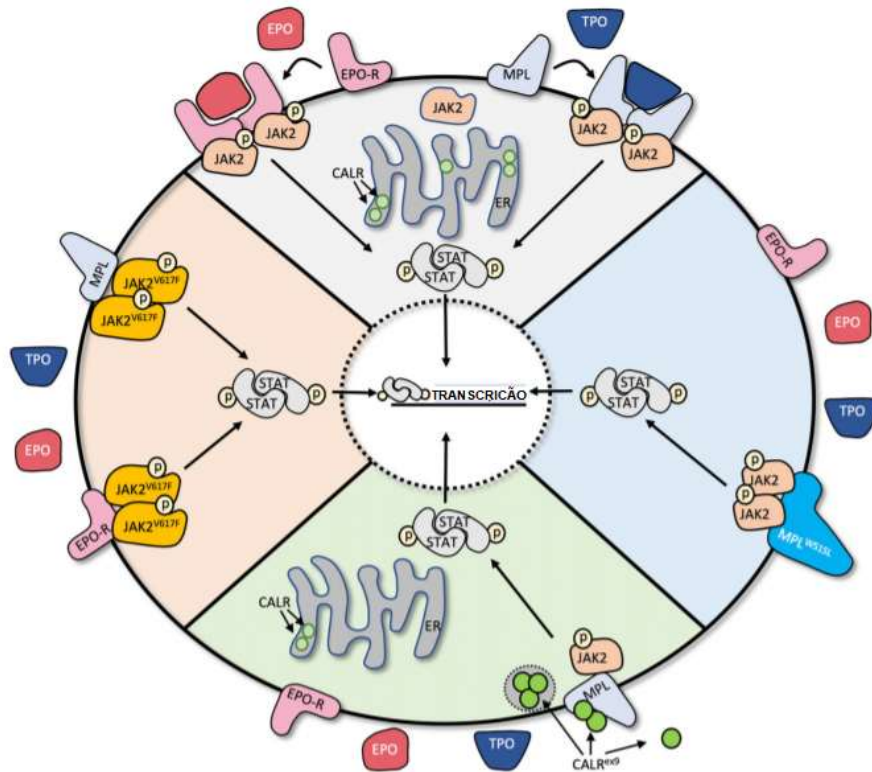
Desde 1960, a origem da LMC já era conhecida, a translocação entre os cromossomos 9 e 22 t(9:22)(q34;11) é responsável pela formação do gene quimérico BCR-ABL, a nova proteína formada possui intensa atividade tirosino quinase provocando proliferação das células neoplásicas (NOWELL PC., HUNGERFORD DA., 1960). Em 1974, já havia evidência de que células progenitoras eritroides de pacientes com PV podiam formar colônias *in vitro* na ausência de fator de crescimento (eritropoetina) (PRCHAL., JF, AXELRAD AA.,1974). Posteriormente, estudos foram capazes de demonstrar que havia uma hipersensibilidade a vários tipos de fatores de crescimento em células progenitoras eritroides e mielóides nos pacientes. Inclusive, comportamento semelhante podia ser observado em uma proporção de pacientes com TE e MFP idiopática (LI Y., HETET G., MAURER A-M., et al.,1994). Em virtude dessas observações, surgiu a hipótese de que a alteração primária das neoplasias mieloproliferativas clássicas BCR-ABL negativas (PV, TE e MFP) poderia estar em um componente de sinalização *downstream* aos receptores de fator de crescimento.

De fato, hoje se sabe que a maior parte dos casos de NMPs BCR-ABL negativas apresentam mutações de ganho de função em *JAK2* (*JAK2* V617F), *CALR* (deleções e inserções no éxon 9) ou *MPL* (principalmente nos aminoácidos W515 e W505) (KLAMPFL T., et al., 2013), sendo a detecção de mutações nesses genes um critério maior para o estabelecimento do diagnóstico das NMPs.

O que os estudos celulares e moleculares revelaram foi que as NMPs são neoplasias que decorrem da ativação constitutiva da via de sinalização intracelular JAK/STAT (Figura 1.2). As proteínas da família janus quinase (JAK) são tirosino-quinases que se apresentam ligadas aos receptores de citocina na sua porção intracelular. A ativação de JAK é feita quando ocorre a ligação de citocinas na porção extracelular, provocando mudanças na conformação dos receptores. Quando JAK está na sua conformação ativa, fosforila outras moléculas de

sinalização, como a família de proteínas STAT (KRALOVICS., 2017), que se dimerizam e vão para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição.

Nas NMPs, foi demonstrado que as mutações são capazes de ativar constitutivamente a via JAK-STAT, e esta crescente sinalização leva à proliferação exacerbada das linhagens mieloide, eritrocítica, megacariocítica e granulocítica, estabelecendo o fenótipo mieloproliferativo e o caráter clonal (TEFFERI A., 2016).



**Figura 1.2. Via JAK-STAT.** A via JAK-STAT é uma das principais vias ativadas em resposta a citocinas hematopoéticas. No painel cinza no topo da figura está representada a ativação fisiológica da via: a citocina eritropoietina (EPO) ou trombopoietina (TPO) se liga a seu respectivo receptor na membrana plasmática (EPO-R, MPL), levando à fosforilação e ativação da tirosino-quinase citoplasmática JAK2, que por sua vez fosforila proteínas STAT, que na forma dimérica se translocam para o núcleo e atuam como fatores de transcrição, ativando a transcrição de genes alvo. Da esquerda para direita, estão representados os mecanismos patológicos que levam à ativação constitutiva da via JAK/STAT nas neoplasias mieloproliferativas, subjacentes respectivamente à mutação JAK2V617F (painel bege), inserções e deleções em CALR no exon 9 (painel verde) e MPLW515L (painel azul). A mutação JAK2V617F leva à fosforilação constitutiva de JAK2 e ativação das vias *downstream* a EPO-R e MPL de forma independente do ligante. Já a proteína chaperona calreticulina, quando mutada, está ligada ao receptor MPL e ativa a via de sinalização *downstream* a este receptor. Por fim, as mutações no aminoácido triptofano na posição 515 em MPL levam a ativação constitutiva desse receptor e da via de sinalização *downstream*. FONTE: Adaptado de (Schieber et al. Blood Cancer Journal 2019).

### 1.3 Genômica das NMPs - Mutações drivers

Como falado, as NMPs são caracterizadas por mutações drivers, ativadoras da via JAK/STAT:

#### 1.3.1 JAK2

Em 2005, diversos estudos identificaram mutações no gene Janus tirosina-quinase 2 (*JAK2*). Em pacientes com PV a presença desta mutação é >90% e em pacientes de TE e MFP é de 50-60% (JAMES C, UGO V, LE COUEDIC JP et al., 2005; KRALOVICS R, PASSAMONTI F, BUSER AS, et al., 2005; LEVINE RL, WADLEIGH M, COOLS J, et al., 2005; ZHAO R, XING S, LI Z, et al., 2005). A proteína *JAK2* é caracterizada por dois domínios: um domínio quinase cataliticamente ativo na região C-terminal e um domínio pseudoquinase cataliticamente inativo que previne a autoativação do domínio quinase. A mutação mais frequente é *JAK2V617F*, que consiste na substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 no domínio pseudoquinase (JH2) da proteína, através da mudança de uma Guanina (G) por uma Timina (T) no nucleotídeo 1849 do exon 14, levando a um ganho de função (NM\_004972.3). Essa mutação V617F em *JAK2* é capaz de ativar constitutivamente a via JAK-STAT (BASQUIERA AL, SORIA NW, RYSER R, et al., 2009) e dessa forma ativa constitutivamente EPOR (receptor de eritropoietina), MPL (receptor de trombopoietina), G-CSF-R (receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos) levando à proliferação de todas as três linhagens celulares. Além da mutação canônica *JAK2V617F*, também podem ser encontradas mutações no éxon 12, presentes em 3% de casos de PV, negativos para *JAK2V617F* (SCOTT LM, TONG W, LEVINE RL, et al., 2007).

A mutação *JAK2V617F* é raramente encontrada em outras neoplasias malignas. Contudo, *JAK2V617F* é encontrada em idosos saudáveis com uma frequência de 0,5% (MCKERRELL T., PARK N., MORENO T., et al., 2015; HINDS DA., BARNHOLT KE., MESA RA., et al., 2016) e é uma das mutações mais frequentes encontradas na hematopoiese clonal associada ao envelhecimento (hematopoiese clonal de potencial indeterminado) (GENOVESE G., KAHLER AK.,

HANDBAKER RE., et al., 2014; STEENSMAS DP., BEJAR R., JAISWAL S., et al., 2015).

A mutação JAK2V617F, em níveis de expressão baixos, é capaz de reproduzir um fenótipo consistente com TE em ratos, e pode ser observada uma tendência similar em humanos (TIEDT R, et al. 2008). Em modelos de camundongos um fenótipo semelhante a PV foi observado, o transplante de células em expansão JAK2V617F murinas em animais de tipo selvagem é capaz de induzir hiperplasia das três linhagens e, com penetrância variável, fibras de reticulina na medula óssea, consistente com fenótipo de policitemia vera humana e sua evolução para MFP (LACOUT C, et al. 2006).

A frequência alélica de JAK2V617F, ou seja, a razão entre o alelo mutado pelo total de alelos nas células hematopoiéticas tem sido associada a certos fenótipos clínicos, tais como, uma maior incidência de prurido, esplenomegalia e um risco aumentado de trombose em pacientes com PV e TE. Existe um consenso de que um fenótipo mais agressivo na PV com homozigose de JAK2 está associado à progressão para MFP ou Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Na MFP a homozigose VAF>50% está associada a progressão, normalmente acompanhada de mutações adicionais (VANNUCCHI, et al., 2011).

### **1.3. 2 MPL**

Embora a descoberta da mutação JAK2V617F tenha esclarecido algumas questões sobre a patogênese molecular da PV, TE e MFP, algumas ainda ficaram sem resposta. Em particular, os pacientes com TE e MFP que não apresentam mutação JAK2V617F.

Em 2006, novas mutações foram descritas em pacientes com MFP negativos para JAK2V617F, afetando o exon 10 do gene MPL (myeloproliferative leukemia vírus oncogene) no triptofano W515 localizado na fronteira dos domínios transmembrana e citosólico, sendo as mutações mais frequentes as: MPLW515L e MPLW515K.

Geralmente heterozigotas, mas podendo ser homozigotas durante a progressão da doença, estas mutações são exclusivas de pacientes com TE e MFP, acometendo 2-3% e 3-5% respectivamente. Em condições normais, a ativação espontânea de MPL é prevenida pela localização do triptofano 515 que se encontra

no domínio anifpático de MPL, substituições nessa posição levam à ativação de MPL sem a necessidade de citocina (trombopoietina) e dessa forma ativam JAK2 constitutivamente (DING J., KOMATSU H., WAKITA A., et al., 2004; PIKMAN Y., LEE BH., MERCHER T., et al., 2006; CHALIGNÉ R., JAMES C., TONETTI C., et al., 2007; BEER PA., CAMPBELL PJ., et al., 2008).

Em 1% dos casos de TE e em 7% dos casos de MFP, pode-se encontrar uma outra mutação no éxon 10, S505N, localizada no domínio transmembrana e que induz a formação de um dímero ativo.

Alguns fenótipos são associados a pacientes mutados para MPL, como: sexo feminino, idade avançada, menor nível de hemoglobina e maior contagem de plaquetas (GUGLIELMELLI P., PANCRAZZI A., BERGAMASCHI G., et al., 2007).

### **1.3.3 CALR**

No final de 2013, dois grupos utilizando whole-exome sequencing detectaram mutações do tipo *frameshift* no gene da calreticulina (*CALR*), em 70-80% pacientes de MFP e TE *JAK2* e *MPL* negativos. O gene *CALR* é localizado no cromossomo 19 (19p13.2), contém 9 éxons e se expande por 4,6kb. Todas as mutações identificadas foram deleções e inserções localizadas no éxon 9, e resultaram na geração de um novo C-terminal mutante específico carregado positivamente que é compartilhado por todos os pacientes com mutação em *CALR* (KLAMPFL T., et al., 2013; NANGALIA J., et al., 2013).

As mutações mais frequentes correspondem a 80% do total, e foram denominadas de mutação do tipo 1 e mutação do tipo 2. A deleção de 52 pares de bases (p.L367fs\*46), também chamada de tipo 1, perde a maior parte da sequência selvagem (WT) do éxon 9 e os locais de ligação de cálcio, e é mais frequente em MFP. Por outro lado, a inserção de 5 pares de bases (p.K385fs\*47) também chamada de tipo 2, se mantém mais similar da sequência WT mantendo cerca de 50% das cargas negativas. A frequência entre as mutações do tipo 1 e do tipo 2 em pacientes de TE e MFP são bem distintas: pacientes com TE, as mutações de tipo 1 e 2 estão bem distribuídas (55% vs 35%), em oposição a pacientes com MFP, que o tipo 1 é claramente predominante (75 % vs 15%) (PIETRA D., RUMI E., FERRETTI VV., et al., 2016).

O gene *CALR* codifica a proteína calreticulina, que é uma chaperona multifuncional responsável pela ligação de cálcio, atuando principalmente no retículo endoplasmático. Ela é dividida em três domínios principais: um domínio N-terminal globular, uma região intermediária rica em prolina, e uma região acídica C-terminal.

A calreticulina selvagem está envolvida no controle de qualidade de proteínas e armazenamento de cálcio, enquanto a proteína mutada pode levar à ativação da via de JAK-STAT, assim como as outras mutações clássicas de NMPs. A ativação da via só é possível quando C-terminal de *CALR* está modificado e quando o *MPL* é selvagem. Dessa forma, *CALR* é capaz de se ligar ao resíduo N-glicosilado do domínio extracelular de *MPL* no retículo endoplasmático, reforçada pelo C-terminal e sua carga positiva, o que leva à ativação do receptor (TEFFERI., et al., 2014; TEFFERI., PARDANANI., 2015; CABAGNOLS., et al., 2016; VAINCHENKER., KRALOVICS., 2017).

Pacientes com TE com mutação em *CALR* têm menor nível de hemoglobina, menor contagem de leucócitos, maior contagem de plaquetas, menor risco de trombose e maior sobrevida, quando comparados aos portadores da mutação *JAK2V617F*. Já em pacientes com MFP, mutação em *CALR* está associada a uma menor contagem de leucócitos, maior contagem de plaquetas, menor idade ao diagnóstico e maior sobrevida (VAINCHENKER., KRALOVICS., 2017).

### 1.3.4 Triplo negativos

Alguns pacientes não apresentam nenhum destes três tipos de marcadores moleculares (*JAK2V617F*; *CALR* e *MPL*), e são classificados como triplo negativos (TN), representando cerca de 12% de pacientes com TE e 5% de pacientes com MFP (MILOSEVIC FEENSTRA JD. et al., 2016). Esta característica está associada a uma sobrevida relativamente adversa, particularmente em pacientes com MFP (TEFFERI et al., 2014).

Recentemente diversos estudos de sequenciamento em larga escala de pacientes classificados como triplo negativos (TN) tentaram elucidar quais são os eventos genéticos, se houver, os responsáveis por conduzir o caráter mieloproliferativo.

. Mutações em *JAK2* e *MPL* fora dos éxons onde comumente se encontram as mutações clássicas foram identificadas. Mutações somáticas nos éxons 3, 4, 5 e 12



e mutações germinativas no éxon 6 no gene *MPL* foram identificadas em 10,1% dos casos triplo negativos de TE e MFP analisados, sendo que as quatro mutações somáticas afetam o domínio extracelular de ligação de MPL (CABAGNOLS et al., 2015; MILOSEVIC FEENSTRA JD. et al., 2016). Da mesma forma, foram encontradas mutações não canônicas no gene *JAK2* nos éxons 13 e 15, em 8,8% dos casos triplo negativos (HARRISON., VANNUCCHI., 2016).

Todas as novas mutações em *MPL* e 2 novas mutações em *JAK2* detectadas por um grupo resultaram em um ganho de função induzindo a sinalização JAK-STAT independente de ligante quando analisadas em ensaios funcionais (CABAGNOLS et al., 2015; MILOSEVIC FEENSTRA JD. et al., 2016).

#### **1.4 Genômica das NMPs - Mutações adicionais**

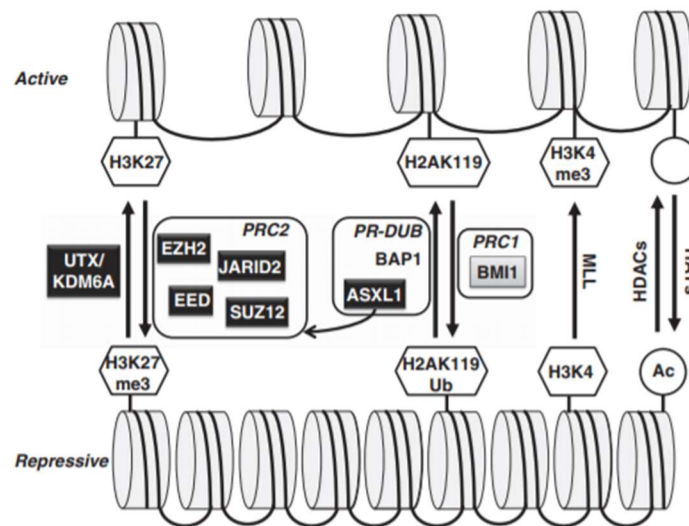
No decorrer dos anos, diversas novas tecnologias de sequenciamento em larga escala possibilitaram a descoberta de novas mutações em Neoplasias Mieloides. Essas mutações são comuns a várias entidades e podem ter implicações na apresentação clínica e/ou no prognóstico das doenças, além de constituírem potenciais alvos terapêuticos. Essas novas mutações somáticas foram encontradas em diversos genes, envolvidos na regulação epigenética, no processamento de mRNA, na regulação transcricional, nas vias de sinalização celular e no ciclo celular.

##### **1.4.1 Regulação epigenética (*ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1/2*, *TET2*)**

O termo epigenética é relativamente recente, foi proposto e estabelecido pela primeira vez em 1942, quando Conrad Waddington tentou interpretar a conexão entre genótipo e fenótipo (WADDINGTON C. H., 2012). É definida como um mecanismo genômico que altera reversivelmente a expressão gênica sem alterar as sequências de DNA. Os eventos epigenéticos envolvem a metilação do DNA, modificação de histonas, a leitura dessas modificações, remodelação da cromatina e os efeitos do RNA não codificante.

***ASXL1***: O gene *ASXL1* é o homólogo humano do gene Additional Sex Comb (*Asx*) de *Drosophila melanogaster* e está localizado na região cromossômica

20q11.21 (FISHER CL. et al., 2003). Este gene é formado por 13 éxons e é expresso na maioria das células hematopoiéticas. A proteína ASXL1 é um componente de PRC1 (Polycomb repression complex) e também regula atividade de PRC2 (Polycomb repression complex 2), dessa forma está envolvida na regulação epigenética da expressão gênica (Figura 1.3).



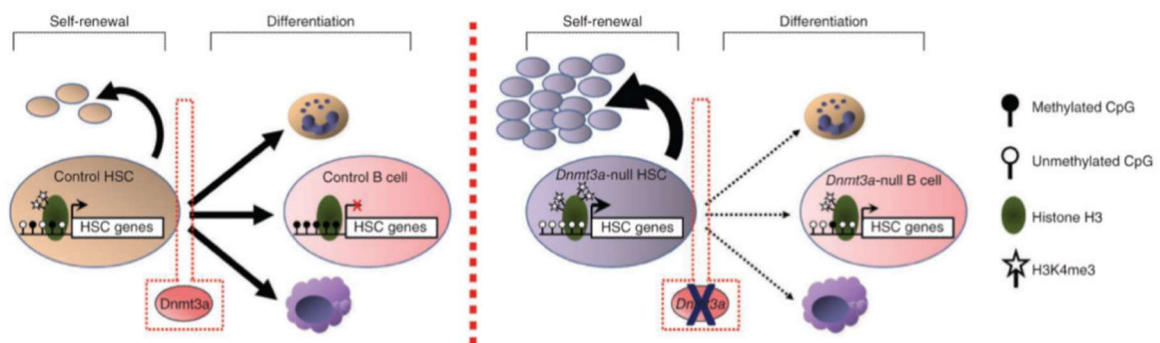
**Figura 1.3. Modelo da interação do gene ASXL1 com os complexos proteicos responsáveis pela regulação das histonas.** ASXL1 pode interagir com BAP1 no complexo Deubiquitinase Repressiva Polycomb (PR-DUB), responsável pela deubiquitinação da lisina 119 da histona H2A (H2AK119ub). Também é capaz de interagir com *Polycomb Repressor Complex 2* (PRC2), complexo responsável pela trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), marca repressiva da cromatina. PRC1= *Polycomb Repressor complex 1*; MLL= *mixed lineage leukemia* ; H3K4me3 = trimetilação da lisina 4 da histona H3; HDACs = deacetilases de histonas; HAT = acetyl-transferases de histonas; Ac = acetilação. Fonte: (Itzykson R, Fenaux P., 2014).

Em 2009, mutações em ASXL1 foram relatadas pela primeira vez em síndromes mielodisplásicas (SMD) (GELSI-BOYER V., et al., 2009) e desde então foram identificadas em todo espectro de neoplasias mieloides (ALVAREZ ARGOTE J., DASANU C., 2017). Hoje em dia, sabe-se que mutações em ASXL1 são encontradas em 32% em pacientes com MFP, 36% MFP secundária a PV, 50% MFP secundária a TE e 18% LMA pós NMP (ABDEL-WAHAB O, PARDANNI A, PATEL J, et al., 2011).

Em todo o espectro de neoplasias mieloides foi observado que ASXL1 está associado a um pior prognóstico. Em NMPs, um estudo retrospectivo em uma

grande coorte com 879 pacientes com MFP, mutações em *ASXL1* foram associadas com menor sobrevida independente da categoria de risco atribuída pelo International Prognostic Scoring System (IPSS) (VANNUCCHI AM, LASHO TL, GUGLIELMELLI P, et al.2013).

**DNMT3A:** O gene DNA methyltransferase 3A (*DNMT3A*) está localizado na região cromossômica 2p23, é formado por 23 exons e é responsável pela geração de uma proteína de 130 kDa. Estudos demonstraram que a família de proteínas DNMT3 está envolvida na metilação de citosinas (5mC), responsável pelo silenciamento do DNA em locais específicos, bem como em elementos repetitivos (BACHMAN KE, ROUNTREE MR, BAYLIN SB, 2001). Apresenta um papel essencial, devido a sua função crucial nas células-tronco, possibilitando as primeiras etapas da diferenciação hematopoiética (Figura 1.4) (CHALLEN GA, SUN D, JEONG M, et al., 2011).



**Figura 1.4. Modelo da atuação do gene *DNMT3A* em células-tronco hematopoiéticas (HSCs).** Genes específicos de HSC são principalmente não metilados e expressos em HSCs normais (esquerda). Assim que a diferenciação se inicia, DNMT3A metila e silencia essas regiões. Isso está associado à perda de H3K4me3 e à repressão gênica nas células B. HSCs DNMT3A-nul (direita) não podem silenciar os genes HSC, portanto, ao receber um estímulo para se diferenciar, os genes específicos de HSC permanecem expressos devido à falta de metilação e H3K4me3 elevado. Após a divisão celular, a via de auto-renovação de HSC permanece ativa em HSCs deletadas para DNMT3A, resultando em seu acúmulo na medula óssea. Poucas HSCs deletadas para DNMT3A conseguem se diferenciar, e tem metilação incompleta e repressão parcial dos genes HSC. Fonte: (CHALLEN GA, SUN D, JEONG M, et al., 2011).

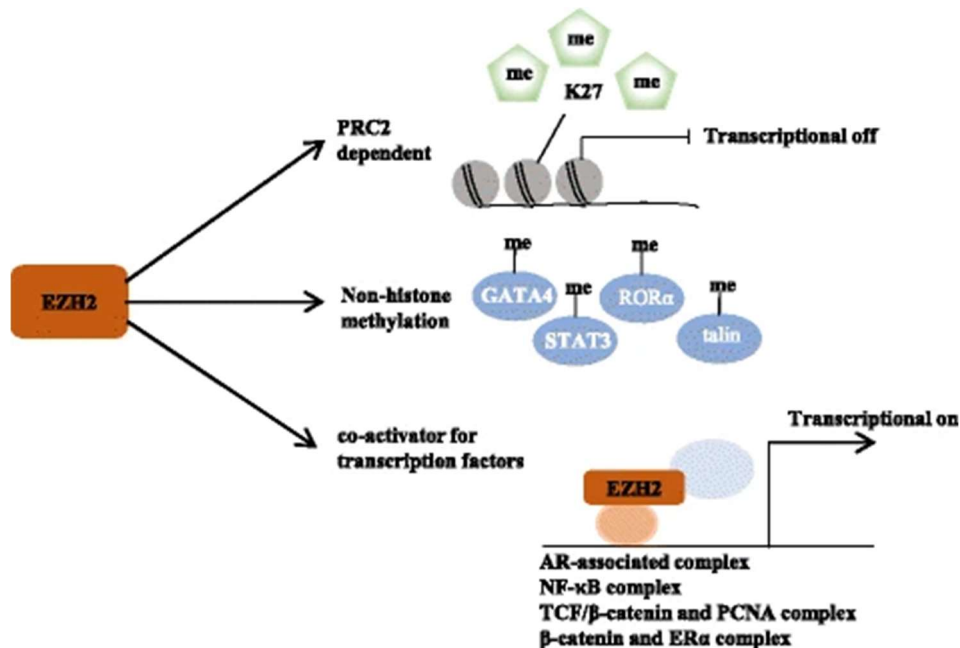
Em 2010, as primeiras mutações em DNMT3A associadas às neoplasias foram identificadas, três grupos relataram mutações em LMA, com frequências de em

cerca de 22% dos casos (YAMASHITA Y. et al.,2010; LEY TJ. DING L, WALTER MJ, et al.,2010), enquanto a frequência em NMPs (TE, PV e MFP) é de 5-10% (STEGELMANN F, BULLINGER L., SCHLENK RF., et al., 2011).

As mutações *DNMT3A* encontradas em LMA secundária a MFP, podem ser rastreadas até o clone original, corroborando com o conceito de que as mutações em *DNMT3A* provavelmente ocorrem frequentemente na hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP), uma condição "pré-leucêmica" envolvendo expansão clonal aberrante de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras na medula óssea, essa condição conhecido como CHIP é encontrada prevalentemente na população idosa. (JAISWAL S., FONTANILLAS P., FLANNICK J., et al., 2014; SHLUSH L.I., ZANDI S., MITCHELL A., et al., 2014).

**EZH2:** O EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) está localizado na posição cromossômica 7q35-36 e é o componente catalítico do PRC2, que promove a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (Figura 1.5).

*EZH2* é responsável por regular negativamente a expressão de genes supressores de tumor e regular positivamente os oncogenes, promovendo a sobrevivência de células cancerosas, proliferação epitelial a mesenquimal e invasão. Estudos também identificaram que *EZH2* está associado à resistência aos medicamentos como Inibidores da Tirosina Quinase (TKI), à quimioterapia e à terapia direcionada (GOLLNER S, OELLERICH T, AGRAWAL SINGH S. et al. 2017).



**Figura 1.5. Funções de EZH2.** A proteína EZH2 têm papel descrito na: (1) trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), dependente do complexo *Polycomb Repressor Complex 2* (PRC2) provocando silenciamento transcricional; (2) metilação de vários substratos de proteínas não-histona (por exemplo, STAT3, GATA4, talin e ROR $\alpha$ ), levando ao silenciamento transcricional ou à ativação transcricional; (3) ativação transcricional, de maneira independente de PRC2, sendo um co-ativador para fatores de transcrição, como complexo associado a ácido retinoico (AR), dentre outros. Fonte: (GAN L. et al., 2018).

Nas NMPs, mutações em EZH2 levam a perda de função gênica e são associadas a aumento da auto-renovação das CTHs. 5-10% de pacientes com MFP apresentam mutações em *EZH2*, e estas estão mais particularmente associadas a JAK2V617F e a um prognóstico ruim (ERNST T, CHASE AJ, SCORE J, et al., 2010; GUGLIELMELLI P, BIAMONTE F, SCORE J, et al., 2011; PUDA A, MILOSEVIC JD, BERG T, et al., 2012). Recentemente, em 2016, três estudos evidenciaram que a perda de EZH2, em um modelo NMP murino que expressa JAK2V617F, modifica dramaticamente o fenótipo da NMP. Camundongos duplo mutantes JAK2V617F/EZH2 apresentam uma redução significativa de sobrevivência devido à rápida aceleração para MFP letal (SASHIDA G., WANG C., TOMIOKA T., et al., 2016; SHIMIZU T., KUBOVCAKOVA L., NIENHOLD R., et al., 2016).

**IDH1/2:** O gene Isocitrato Dehidrogenase 1 (*IDH1*) está localizado na posição 2q33.3, enquanto o gene Isocitrato Dehidrogenase 2 (*IDH2*) está na 15q26.1.

Esses dois genes são responsáveis pela codificação de enzimas que catalisam a descarboxilação oxidativa, convertendo isocitrato em alfa-cetoglutarato. NADP $\beta$  é utilizado como cofator para gerar NADPH, que é importante na produção de glutathiona intracelular. No citoplasma e no peroxissomo é feito por IDH1 e na mitocôndria por IDH2. Dessa forma, o IDH selvagem é extremamente necessário para manutenção da proteção celular do estresse oxidativo (GROSS S., CAIRNS RA., MINDEN MD., et al., 2010).

Mutações em IDH1 e IDH2 são descritas em 1-3% dos casos de MFP (TEFFERI A., LASHO TL., ABDEL-WAHAB O., et al., 2010). Quando o gene está mutado, ocorre uma produção excessiva de 2-hidroxi-glutarato, hipermetilação de histonas e inibição de atividade de *TET2*.

**TET2:** O gene *TET2* (ten-eleven translocation 2) está localizado na posição 4q24 do cromossomo e contém 11 exons. *TET2* tem como papel principal a conversão de 5-metilcitosina (5-mC) em 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), processo particularmente importante na regulação gênica em células-tronco e desenvolvimento embrionário.

Mutações em *TET2* foram as primeiras mutações, junto com *ASXL1*, a serem reportadas em JAK2V617F NMPs. Todas as mutações *TET2* são de perda de função ou deleções. Sua frequência pode variar de 10% a 20%, sendo encontrados em todos os subtipos de NMPs e podem estar associada a pior sobrevida e aumento de progressão para LMA (DELHOMMEAU F., DUPONT S., DELLA VALLE V., et al., 2009). Mutações de perda de função em *TET2* também ocorrem frequentemente na hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP) (JAISWAL S., FONTANILLAS P., FLANNICK J., et al., 2014; SHLUSH L.I., ZANDI S., MITCHELL A., et al., 2014).

#### 1.4.2 Processamento de mRNA (*SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*)

O splicing de RNA só é possível devido a um recrutamento, rearranjo e/ou desligamento de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNA) e proteínas, que catalisam a reação de splicing. O complexo é responsável por remover as sequências não codificantes (íntrons) do RNA mensageiro e ligar as sequências codificadoras (exons) para formar transcritos de mRNA maduros por meio de etapas iniciais e finais. Nas primeiras etapas o reconhecimento das junções exon/intron 5' e 3' é fundamental ribonucleoproteína (YOSHIDA K, SANADA M, SHIRAIISHI Y, et al., 2011).

**SF3B1:** O gene *SF3B1* (splicing factor 3b subunit 1) codifica a subunidade 1 do complexo de proteína do fator de splicing 3b, que forma o complexo de ribonucleoproteína nuclear pequeno U2 (U2 snRNP) junto com o fator de splicing 3a e uma unidade de RNA 12S, e está localizado na região 2q33.1 do cromossomo. Este complexo desempenha um papel fundamental na maquinaria de splicing e regulação da diversidade de variantes de splicing (WAHL MC., WILL CL., LUHRMANN R., 2009). *SF3B1* está envolvido no programa de splicing alternativo de genes que controlam a progressão do ciclo celular e a apoptose, atuando tanto na

modulação da proliferação quanto na sobrevivência de células tumorais, e a proteína SF3B1 é altamente expressa em linhagens hematopoiéticas.

Em 2011, Yoshida et al. descreveram que mutações em genes que codificam proteínas do spliceossomo foram detectadas em diferentes neoplasias hematopoiéticas, mas mais particularmente na SMD (Figura 1.6). Mutações no gene do spliceossomo em NMPs são essencialmente restritas a TE e MFP. A frequência de mutações em *SF3B1* não é alta, ocorrendo <3% de pacientes com TE (LASHO TL., FINKE CM., HANSON CA., et al., 2012).

**U2AF1:** O gene *U2AF1* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) encontra-se na região 21q22.3, e é responsável por codificar a pequena subunidade que desempenha um papel crítico no splicing constitutivo e dependente do intensificador de RNA, mediando diretamente as interações entre a subunidade grande e as proteínas ligadas aos intensificadores.

Em MFP, o gene *U2AF1* é o mais frequentemente mutado na via de spliceossomo (16%) (TEFFERI A, LASHO T., FINKE CM et al, 2016) e é fortemente e inter-independentemente associado com anemia e trombocitopenia (TEFFERI A., FINKE C., LASHO T., et al., 2014).

**ZRSR2:** O gene *ZRSR2* (Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2) é localizado na posição cromossômica Xp22.2 e é formado por 14 exons. A proteína codificada associa-se ao heterodímero de fator auxiliar U2, que é necessário para o reconhecimento de um local de splice 3' funcional no splicing de pré-mRNA. No entanto, uma consideração importante, é que *ZRSR2* desempenha um papel diferente na montagem do spliceossomo, onde é capaz de substituir completamente o complexo U2AF.

A maioria das mutações são nonsense ou frameshift, estabelecendo um papel de perda de função. Esse gene é frequentemente mutado em subtipos de SMD sem sideroblastos em anel (~80%) e está associado a elevada taxa de blastos e maior taxa de progressão para LMA (DAMM F., KOSMIDER O., GELSI-BOYERG V., et al., 2012).

### 1.4.3 Regulação transcricional (*RUNX1*, *CUX1*):

As transições de tipo celular estão sob rígido controle transcricional durante o desenvolvimento, e a perda desse controle pode levar à proliferação aberrante e à transformação leucêmica (FENNELL KA, BELL CC, DAWSON MA., 2019)

***RUNX1*:** O gene *RUNX1* (runt-related transcription factor), também denominado de AML1 (acute myeloid leukemia 1 protein), contém 12 exons e está localizado na posição 21q22.3 do cromossomo. A proteína codificada desempenha um papel crucial na hematopoiese, em particular, no desenvolvimento de células-tronco hematopoéticas.

Em 1999, Osato et al. (OSATO M., ASOU N., ABDALLA E., et al., 1999) e Song et al. (1999) (SONG W-J, SULLIVAN MG, LEGARE RD. et al., 1999) relataram uma mutação pontual *RUNX1* na leucemia mieloide esporádica e familiar, respectivamente.

*RUNX1* é um dos alvos mais frequentes de alterações cromossômicas e genéticas em doenças mieloides. Estudos recentes sugerem que o *RUNX1* selvagem desempenha um papel importante durante a leucemogênese, propondo que o *RUNX1* do tipo selvagem é necessário para a sobrevivência dessas células leucêmicas (BEN-AMI O., FRIEDMAN D., LESHKOWITZ D., et al., 2013).

***CUX1*:** O gene CUT-like homeobox 1 (*CUX1*) está localizado na região cromossômica 7q22.1. *CUX1* foi caracterizado geneticamente como um gene supressor tumoral haploinsuficiente (MCNERNEY ME, BROWN CD, WANG X, et al., 2013; SCHOENMAKERS EF, BUNT J, HERMERS L, et al., 2013).

Mutações somáticas no gene *CUX1* podem ser encontradas em neoplasias mieloides, em particular, em SMDs. Em um estudo com 1480 pacientes com neoplasias mieloides, Aly et al. evidenciaram a disfunção de reparo de DNA resultante de lesões de *CUX1* na patogênese das neoplasias mieloides (ALY M, RAMDZAN ZM, NAGATA Y, et al., 2019). A superexpressão de *CUX1* é capaz de causar síndromes mieloproliferativas em modelo de camundongo (CADIEUX C, FOURNIER S, PETERSON AC, et al., 2006).



#### 1.4.4 Vias de sinalização celular (*CBL*, *KIT*, *KRAS*, *PTPN11*):

A ação das citocinas hematopoiéticas nas células progenitoras da medula óssea está diretamente relacionada com a produção de células mieloides maduras diferenciadas. Elas são responsáveis por conduzir o processo de diferenciação mielóide, a partir da ligação a receptores específicos da superfície celular e ativando as vias de transdução de sinal intracelular. Essas vias de sinalização intracelular regulam a expansão das populações progenitoras e o processo de diferenciação (WARD AC, LOEB DM, SOEDE-BOBOK AA, et al., 2000).

***CBL***: Localizado na região cromossômica 11q23.3, o gene *CBL* (Casitas B-lineage Lymphoma) contém 16 exons e é classificado como um proto-oncogene que codifica uma ubiquitina ligase E3 (SMIT L., BORST J., 1997). Essa proteína é uma das enzimas necessárias para direcionar substratos para degradação pelo proteossoma e funciona como um regulador negativo de muitas vias de transdução de sinal ( RYAN PE., DAVIES GC., NAU MM, et al., 2006).

Indivíduos que apresentam mutações germinativas heterozigóticas apresentam uma condição clinicamente variável conhecida como a "síndrome *CBL*", e apresentam risco aumentado de desenvolver leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), uma neoplasia mielodisplásica e mieloproliferativa agressiva da primeira infância (NIEMEYER CM., KANG MW., SHIN DH., et al., 2010; PEREZ B., MECHINAUD F., GALAMBRUN C., et al., 2010).

Além disso, várias mutações de ganho de função de *CBL* foram descritas em LMA, SMD e NMPs (CALIGIURI M. A., BRIESEWITZ R., YU J., et al., 2007; DUNBAR A. J., GONDEK L. P., O'KEEFE, et al., 2008), freqüentemente encontradas na região de ligação entre o RING finger e os domínios TKB, levando à perda da atividade E3 do *CBL* (SARGIN B., CHOUDHARY C., CROSETTO N., et al., 2007). Em MFP, apresenta uma frequência mutacional de 4% e é associada à progressão para LMA (GRAND FH, HIDALGO-CURTIS CE., ERNST T., et al. 2009).

***KIT***: O gene *KIT*, também denominado de C-KIT, foi descrito pela primeira vez pelo bioquímico alemão Axel Ullrich em 1987 como o homólogo celular do oncogene v-kit do sarcoma felino (YARDEN Y., KUANG WJ, YANG-FENG T., et al., 1987), está localizado na posição cromossômica 4q12 21 21 e abrange 22 exons. Este gene

codifica um receptor tirosina quinase expresso na superfície de vários tipos celulares, fosforila múltiplas proteínas intracelulares que desempenham um papel na proliferação, diferenciação, migração e apoptose e, logo, desempenha um papel importante na hematopoiese e na manutenção de células-tronco. Quando KIT está mutado, a ativação da via é independente de ligante, estimulando a proliferação de células leucêmicas (KUCHENBAUER F, FEURING-BUSKE M., BUSKE C., 2005).

Estudos relataram uma frequência mutacional de KIT em 12-25% de LMA (MROZEK K., BLOOMFIELD CD., 2006), e a presença da mutação está associada com alta taxa de recaída e mau prognóstico (CAIROLI R., BEGHINI A., GRILLO G., et al., 2006; PASCHKA P, MARCUCCI G., RUPPERT AS., et al., 2006).

**KRAS:** O gene *KRAS*, é o outro integrante da família RAS, localizado na posição cromossômica 12p12.1 e abrangendo 6 exons. A origem do nome surgiu devido a sua identificação como um homólogo do oncogene Kirsten ras (TSUCHIDA N, RYDER T, OHTSUBO E., 1982) e também é responsável por codificar uma proteína que é membro da superfamília GTPase.

Johnson et al, demonstraram em 1997 que *KRAS* é indispensável para hematopoiese hepática fetal (JOHNSON L, GREENBAUM D, CICHOWSKI K, et al., 1997). E mais recentemente, em 2016, outro grupo demonstrou a importância de *KRAS* na hematopoiese adulta. A perda de *KRAS* leva à redução da auto-renovação de HSC. Dessa forma, camundongos mais velhos com deficiência de *KRAS* desenvolvem defeitos hematopoiéticos profundos e são propensos a doenças mieloides (DAMNERNSAWAD A., KONG G., WEN Z., et al., 2016).

**PTPN11:** Localizado no cromossomo 12q24 compreendendo 16 exons, o gene *PTPN11*(Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11) é responsável pela codificação de uma proteína com um domínio de homologia Src 2 (SH2) e um domínio tirosina fosfatase contendo o sítio ativo. Este gene está envolvido na hematopoiese normal, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose, responsável por várias funções de transdução de sinal importantes (PANDEY R, SAXENA M, KAPUR R., 2017)

### 1.4.5 Ciclo celular e apoptose (*TP53*):

O ciclo celular é uma sequência complexa de eventos, e sua regulação é essencial para proliferação celular. Muitas proteínas regulatórias, oncogenes e genes supressores de tumor estão envolvidos nesse processo. Mutações e deficiências na regulação ao longo do ciclo celular, podem levar a doenças graves como o câncer (SCHAFER KA, 1998).

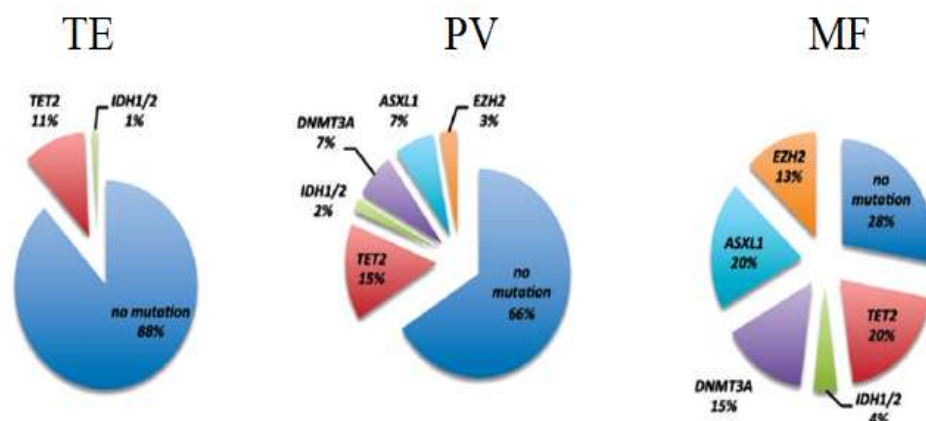
***TP53***: O gene *TP53* (tumor protein P53) localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica a proteína p53. Conhecido como o guardião da célula, fornecendo uma importante barreira para a transformação neoplásica e progressão do tumor por sua capacidade de ser extremamente sensível ao stress celular e de coordenar uma estrutura complexa de diversas vias e processos que protegem homeostase celular e estabilidade do genoma (VOUSDEN KH, PRIVES C., 2009).

Mutações em *TP53* acometem >50% dos tumores humanos, e outros tumores *TP53* selvagem tem atividade p53 atenuada por vários mecanismos (VOGELSTEIN B, LANE D., LEVINE AJ., 2000). *TP53* é extremamente importante na hematopoese, sendo expresso principalmente em HSCs e responsável por sua regulação de quiescência e autorrenovação.

As neoplasias hematológicas apresentam uma incidência menor de alterações quando comparadas aos tumores sólidos, de 10% a 20% (NAHI H., SELIVANOVA G., LEHMANN S., et al., 2008; HARUTYUNYAN A., KLAMPFL T., CAZZOLA M, et al., 2011).

Por outro lado, nos casos de leucemia secundária de NMPs, várias mutações e lesões citogenéticas direcionadas à função tumoral supressora de *TP53* são encontradas, acometendo cerca de 40% a 50% (HARUTYUNYAN A., KLAMPFL T., CAZZOLA M, et al., 2011).

## 1.5 Mielofibrose Primária



**Figura 1.6. Frequência e distribuição de genes mutados nas Neoplasias Mieloproliferativas BRC-ABL negativas clássicas (NMPs).** Além das mutações driver características das NMPs, os pacientes com trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (MFP) podem portar mutações adicionais em outros genes como *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *EZH2* e *TET2*. Estas mutações adicionais são pouco frequentes em pacientes com TE, enquanto 34% de pacientes com PV e 72% de pacientes com MF apresentam mutações adicionais. Fonte: (Vainchenker et al. EHA 2012).

Na Figura 1.8 é possível observar a distribuição e a frequência de genes mutados nas NMPs. A MFP é a entidade que apresenta maior frequência de genes mutados, envolvidos na regulação epigenética, no processamento de mRNA, na regulação transcricional, nas vias de sinalização celular, no ciclo celular e na apoptose. Esse trabalho então se concentra somente em pacientes com MFP.

A MFP é uma doença clonal originada da transformação neoplásica de célula hematopoiética pluripotente (célula-tronco), e é considerada uma doença rara, sendo 0,5 a 1,5 casos por 100.000 habitantes/ano (CHAUFFAILLE MLLF, 2010) acometendo principalmente idosos com idade mediana maior que 60 anos. Essa doença cursa com expressão anormal de citocinas, fibrose medular, hematopoiese extramedular, hepatoesplenomegalia, trombose, anemia e sintomas constitucionais (febre, emagrecimento, sudorese noturna, cefaléia, turvação visual, zumbido, pletora, astenia, prurido e dor abdominal). A progressão da doença envolve transformação para leucemia mieloide aguda (LMA). O diagnóstico requer exame da morfologia da medula óssea, que costuma cursar com hiperplasticidade, proliferação de neutrófilos e megacariócitos, fibrose reticulínica mínima ou ausente e células megacariocíticas atípicas.

Segundo a revisão da OMS de 2016, para o diagnóstico da Pré fibrótica ou Mielofibrose precoce é necessário preencher 3 critérios maiores (1- Presença de proliferação megacariocítica e atipia sem fibrose reticulínica maior que grau 1, acompanhada por aumento de celularidade da medula óssea ajustada para idade, proliferação granulocítica e eritropoiese diminuída; 2- Não preenchimento dos critérios da OMS para TE, PV, LMC BCR-ABL1+, síndromes mielodisplásicas, e outras neoplasias mieloides; 3- Presença de mutações em *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou marcador clonal com ausência de fibrose reticulínica reativa) e pelo menos 1 critério menor (anemia não atribuída a condição comórbida, leucocitose  $\geq 11 \times 10^9/L$ , esplenomegalia palpável, lactato desidrogenase (LDH) acima do limite de referência institucional). Enquanto para o diagnóstico de Mielofibrose é necessário preencher 3 critérios maiores (1- presença de proliferação megacariocítica e atipia acompanhada por fibrose reticulínica ou de colágeno grau 2 ou 3; 2- Não preenchimento dos critérios da OMS para TE, PV, LMC BCR-ABL1+, síndromes mielodisplásicas, e outras neoplasias mieloides; 3- Presença de mutações em *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou marcador clonal com ausência de fibrose reticulínica reativa) e pelo menos 1 critério menor (anemia não atribuída a condição comórbida, leucocitose  $\geq 11 \times 10^9/L$ , esplenomegalia palpável, LDH acima do limite de referência institucional e leucoeritroblastose) (Tabela 1.1) (ARBER et al., 2016)

Atualmente, a única modalidade de tratamento com potencial curativo é transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (Alo- TCTH). Outras opções de tratamento consistem em tratamentos paliativos como esplenectomia, uso de agentes estimuladores da eritropoiese, uso de hidroxiuréia ou do inibidor de JAK Ruxolitinib para tratar esplenomegalia e/ou sintomas constitucionais (CERVANTES F., 2014). No Brasil, o uso do inibidor de JAK2 Ruxolitinib foi autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento de pacientes de risco alto e intermediário 2.

**Tabela 1.1 Critérios para diagnóstico de Mielofibrose Primária**

<b>Critérios Principais</b>
1. Presença de proliferação megacariocítica, acompanhada de reticulínica e/ou fibrose de colágena.
2. Não preencher os critérios da OMS para TE, PV, LMC <i>BCR-ABL1+</i> , síndromes mielodisplásicas, e outras neoplasias mielóides.
3. Presença de mutações em <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> . Na ausência destas, presença de outro marcador clonal ou ausência de mielofibrose reativa.
<b>Critérios Menores</b>
a. Anemia não atribuída a condição comórbida
b. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9/L$
c. Esplenomegalia palpável
d. LDH acima do limite de referência institucional
e. Leucoeritroblastose
Diagnóstico se dá ao preencher os 3 critérios principais e ao menos 1 critério menor

FONTE: Adaptado de (ARBER et al., 2016)

### 1.5.1 Prognóstico de MFP

Diversos estudos têm se dedicado a determinar quais variáveis clínicas e laboratoriais têm impacto no prognóstico dos pacientes com MFP. Cervantes e colaboradores em 2009 estudaram os bancos de dados de 7 instituições, com um total de 1.131 pacientes com diagnóstico de MFP durante o período de janeiro de 1980 a abril de 2007. E concluíram que idade  $> 65$  anos, presença de sintomas constitucionais, hemoglobina  $< 10g / dL$ , leucócitos  $> 25 \times 10^9 / L$  e blastos sanguíneos  $> 1\%$  ao diagnóstico eram variáveis independentes associadas a menor sobrevida. A partir desses achados, foi proposto um sistema de pontuação para estratificação de risco, o IPSS (Tabela 1.2) (CERVANTES et al., 2009). No entanto, considerando que no IPSS a avaliação dos fatores de risco é feita no momento do diagnóstico, o estudo de Passamonti et al. se concentra na aquisição de novos fatores de risco durante o curso da doença e estabelece o Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPPS) como um sistema dinâmico de estratificação de risco em MFP (PASSAMONTI F, CERVANTES F, VANNUCCHI AM, et al., 2009.). Já em 2011, O DIPPS-plus inclui mais três informações prognósticas: cariótipo, contagem de plaquetas e necessidade de transfusão para prever a sobrevida global (GANGAT et al., 2011).

**Tabela 1.2 Sistema de pontuação prognóstica internacional (IPSS)**

<b>Fatores de risco</b>	<b>Pontuação</b>
Idade > 65 anos	+1 ponto
Sintomas constitucionais*	+1 ponto
Hemoglobina < 10,0 g/dL	+1 ponto
Leucócitos > 25.000	+1 ponto
Blastos circulantes ( $\geq 1\%$ )	+1 ponto

<b>Categoria de risco</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Sobrevida</b>
Baixo	0 pontos	135 meses
Intermediário-1	1 ponto	95 meses
Intermediário-2	2 pontos	48 meses
Alto	$\geq 3$ pontos	27 meses

\*Perda de peso de 10% do valor basal no ano anterior ao diagnóstico de MFP e/ou febre inexplicada ou sudorese excessiva persistindo por mais de 1 mês.

FONTE: Adaptado de (CERVANTES et al., 2009)

Mais recentemente, com o avanço do sequenciamento de próxima geração novas mutações foram encontradas em todas as neoplasias mieloides relacionadas a genes envolvidos na regulação epigenética, processamento de mRNA, regulação transcricional, vias de sinalização celular, ciclo celular e apoptose (VANNUCCHI et al., 2013). Especialmente em MFP, os pacientes podem apresentar mutações em genes envolvidos na regulação epigenética (LUNDBERG P, KAROW A, NIENHOLD R, et al., 2014). Vários estudos demonstraram o impacto prognóstico de alterações genômicas em neoplasias mieloides. Por exemplo, as mutações em genes como *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* e *IDH1/IDH2* são consideradas como mutações de alto risco molecular (HMR) e o risco é intensificado pelo número de mutações em um mesmo paciente (VANNUCCHI AM, LASHO TL, GUGLIEMELLI, et al., 2013). Esse novo cenário fomentou a criação de novos sistemas de pontuação, como MIPPS70, MIPSS70-plus e GIPPS (Tabela 1.3).

Em fevereiro de 2018, o MIPPS70 (Mutation-Enhanced International Prognostic Score System) e o MIPSS70-plus foram publicados. Ambos tiveram como objetivo principal a criação de um sistema que fosse capaz de melhorar a capacidade de

seleção de pacientes para o procedimento de Alo-TCHT, integrando dados clínicos, citogenéticos e de mutação relevantes para o prognóstico. Na análise univariável do MIPPS70, a razão de risco (RR) para morte no MIPPS70 foi de 2,40 (1,80 a 3,21) para a presença de mutação no *ASXL1*, 3,40 (2,22 a 5,20) para a mutação *SRSF2*, 4,51 (2,29 a 8,90) para a mutação *IDH1/2* e 5,20 (3,45 a 7,83) para os pacientes com 2 mutações de alto risco molecular (HMR) (GUGLIELMELLI P, LASHO TL, ROTUNNO G, et al., 2018).

O GIPSS (Genetically Inspired Prognostic Scoring system) foi publicado em março de 2018, e é baseado exclusivamente em marcadores genéticos (TEFFERI A, GUGLIELMELLI P, NICOLOSI M, et al., 2018). Nesse estudo, houve uma RR de 2,3 (1,7–3.) para a ausência de mutação *CALR* tipo 1/like, de 2,1 (1,7–2,6) para mutações *ASXL1*, (2,6, 1,9–3,3), para mutações *SRSF2* e 2,6 ( 1,8–3,6) para mutações em *U2AF1*.

Em outubro de 2018, em uma coorte de 2035 pacientes Grinfeld J. et al estabeleceram um modelo para estratificação de risco personalizada, integrando 63 variáveis clínicas e genômicas de pacientes com NMPs (GRINFELD J., NANGALIA J., BAXTER EJ. et al., 2018). A partir da integração das variáveis clínicas e genômicas, esse novo modelo seria capaz de individualizar o preditivo de cada paciente, discriminando os desfechos de pacientes classificados na mesma categoria de classificação de risco. A partir disso, poderia contribuir para individualização terapêutica na MFP. Uma grande vantagem desse sistema é a capacidade de gerar um prognóstico estimado mesmo não tendo todas as variáveis disponíveis, pois através da calculadora fornecida é possível informar a falta da disponibilidade de uma variável.

Assim, considerando: 1- todo o avanço do conhecimento sobre o panorama genômico da MFP e o papel de diferentes mutações na fisiopatologia da doença e no prognóstico dos pacientes, 2- a importância da individualização terapêutica para pacientes com MFP, pois a única modalidade de tratamento com potencial curativo é Alo-TCTH sendo que esse tratamento é considerado de alto risco para o paciente e 3- as novas propostas de integração de dados clínicos e genômicos para estratificação de risco em MFP, neste trabalho analisamos dados clínicos, laboratoriais e moleculares de uma série de pacientes com MFP, aplicamos o sistema de estratificação de risco personalizado proposto por Grinfeld et al e comparamos ao prognóstico estimados pelo sistema IPSS.



Nossa hipótese principal era que com a adição da informação sobre os dados moleculares seríamos capazes de ter uma estratificação mais refinada dos pacientes que eram do mesmo grupo pelo IPSS.

**Tabela 1.3. Variáveis dos diferentes sistemas de classificação de risco**

Variável	IPSS	DIPPS	DIPPS-plus	MIPSS70	MIPSS70-plus	GIPPS
Idade > 65 anos	+	+	+	+	+	
Sintomas constitucionais	+	+	+	+	+	
Hb < 10 g/dL	+	+	+	+	+	
Leucócitos > 25 X 10 <sup>9</sup> /L	+	+	+	+	+	
Blastos ≥ 1%	+	+	+	+	+	
Plaquetas < 100 X 10 <sup>9</sup> /L			+	+	+	
Necessidade de transfusão			+	+	+	
Cariótipo desfavorável*			+		+	+
Grau de fibrose medular ≥ 2%				+	+	
Ausência da mutação <i>CALR</i> tipo 1/like				+	+	+
Categoria HMR ‡				+	+	+
≥2 HMR genes mutados §				+	+	+
Cariótipo Very High Risk#					+	+
Categoria HMR revisada †						+

\*Cariótipo desfavorável para **DIPPS-plus**: +8, -7/7q-, -5/5q-, i17q, 12p-, 11q23 rearranjo

Cariótipo desfavorável para **MIPSS70-plus** and **GIPPS**: 20q2, 13q2, +9, chromosome 1 translocação/duplicação n, 2Y, ou cromossomo sexual anormal além do 2Y (Tefferi et al, manuscript submitted for publication; A. Tefferi, personal communication, October 2017).

‡Categoria HMR indica a presença de mutação em qualquer um dos seguintes genes em um paciente: *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, ou *IDH1/2*.

§Indica a presença de dois ou mais genes mutados entre *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, e *IDH1/2* em um paciente; duas ou mais mutações no mesmo gene contam como uma.

#Very high risk (VHR) cariótipo: única/múltipla anormalidades em -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23, ou outras trissomias autossômicas que não incluem +8/+9 (e.g., +21, +19)

† Categoria HMR revisada indica a presença de mutação em qualquer um dos seguintes genes em um paciente: *ASXL1*, *SRSF2*, or *U2AF1Q157*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Principal:**

Analisar dados clínicos, laboratoriais e genômicos de uma série de pacientes com MFP referidos ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO-INCA e avaliar o uso do sistema de prognóstico personalizado descrito por Grinfeld et al. com intuito de refinar o prognóstico fornecido pelo IPSS nesses pacientes.

### **2.2 Específicos:**

- 1) Analisar dados clínicos e laboratoriais de pacientes com MFP, coletados nos centros de origem dos pacientes (HUPE-UERJ e HUAP-UFF) através de ficha clínica;
- 2) Caracterizar os pacientes com MFP para as mutações JAK2V617F, CALR e MPL discriminando-os em grupos moleculares homogêneos de acordo a presença, ausência e tipo de mutação diretora detectada;
- 3) Analisar os dados genômicos obtidos no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO-INCA por NGS para um painel de genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides;
- 4) Avaliar o impacto clínico das mutações de diagnóstico e mutações adicionais encontradas por NGS;
- 5) Aplicar as informações clínicas, laboratoriais e moleculares disponíveis para determinação do prognóstico personalizado, conforme modelo proposto por Grinfeld et al., comparando ao prognóstico estimado pelo IPSS.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos e pacientes**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer, sob número 062/08 e encontra-se cadastrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE 65974117.9.0000.5274. Para participar, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Como parte de sua avaliação diagnóstica, amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com suspeita de NMP são encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplantes de Medula Óssea (CEMO), INCA para análise molecular. A série de pacientes deste estudo é composta de 32 pacientes com diagnóstico confirmado de MFP de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, acompanhados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) ou Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). Esses dois centros foram selecionados pois todos os pacientes haviam dados clínicos e laboratoriais disponíveis. A coleta de dados clínicos e laboratoriais foi realizada junto ao serviço de origem através de uma ficha clínica elaborada pelo grupo e organizada em banco de dados. Ao diagnóstico foram coletadas cinco variáveis clínicas/laboratoriais (idade, presença de sintomas constitucionais, concentração de hemoglobina, número de leucócitos e presença de blastos circulantes) e utilizadas para avaliação do prognóstico, segundo o sistema iPSS (CERVANTES et al., 2009).

#### **3.2 Amostras biológicas**

Ao diagnóstico ou durante o seguimento, amostras de sangue periférico dos pacientes com MFP foram colhidas em tubo com anticoagulante EDTA no serviço de origem e foram referidas ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO, INCA. Ao serem admitidas no laboratório, as amostras foram submetidas a gradiente de densidade em Ficoll-Hystopaque® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para separação da fração de granulócitos. Cada alíquota de 10 ml de sangue periférico foi cuidadosamente colocada sobre 5 ml de Ficoll e submetida à centrifugação (700 g, por 20 min, a 20 °C, sem freio). Em seguida, a fração de células mononucleares foi retirada e a fração de granulócitos foi utilizada para extração de DNA. A seleção de

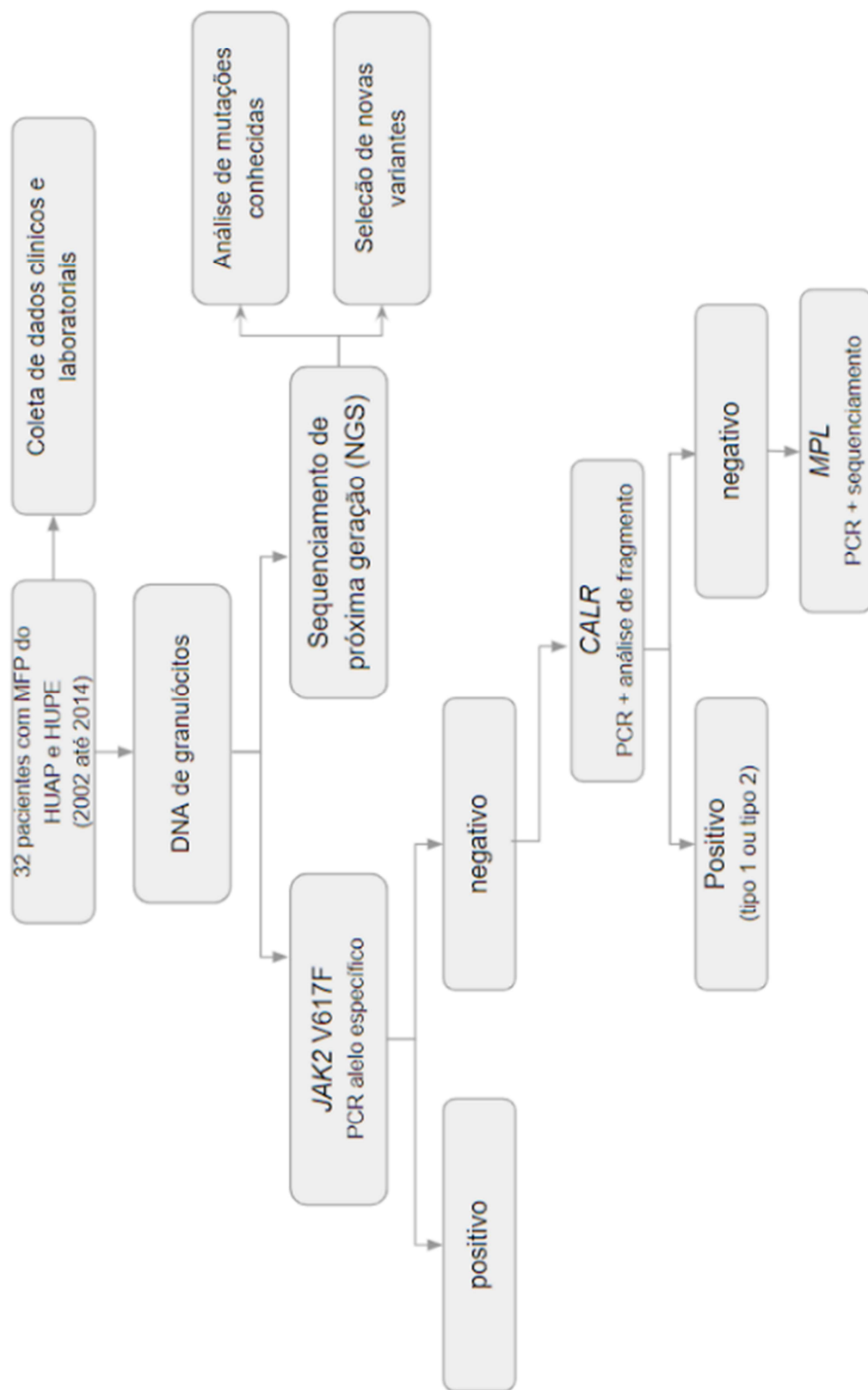
amostras utilizadas no estudo foi feita primeiramente baseada na revisão de dados clínicos e confirmação do diagnóstico de MFP, depois foi verificada a disponibilidade e qualidade da amostra para o NGS e a quantidade de amostras se limitou à quantidade de exames NGS disponíveis.

### **3.3 Extração de DNA**

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o sistema automatizado Maxwell, baseado no uso de partículas de sílica magnetizadas (Promega, Madison, WI, EUA). Brevemente, a suspensão celular de granulócitos foi aplicada no primeiro poço do cartucho, contendo tampão de lise. A seguir, o funcionamento automatizado promoveu o movimento da amostra ao longo dos poços do cartucho para ligação do DNA às partículas de sílica, lavagem do DNA e eluição em tampão, ao final do processo.

### **3.4 Análise molecular de diagnóstico**

Considerando a frequência das mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* em MFP e o fato de que estas mutações são praticamente mutuamente exclusivas, o fluxograma para análise molecular de diagnóstico é realizado conforme ilustrado na Figura 3.1. As amostras de DNA foram primeiramente analisadas para a presença da mutação *JAK2* V617F. Quando esta mutação não foi detectada, realizou-se a análise do éxon 9 de *CALR*. Amostras negativas para *JAK2* V617F e *indels* em *CALR* foram avaliadas quanto à presença de mutações no éxon 10 de *MPL*.



**Figura 3.1. Fluxograma de análise molecular de pacientes com mielofibrose primária (MFP) nesse estudo.** Nesse trabalho, 32 pacientes tiveram diagnóstico de MFP confirmado de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde no Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro ou no Hospital Universitário Antônio Pedro, da Universidade Federal Fluminense e foram referidos ao Laboratório de Biologia Molecular (CEMO), tiveram dados clínicos e laboratoriais coletados, amostra de DNA preparada e análise genômica por sequenciamento de próxima geração (NGS) realizada. Primeiramente, a amostra foi processada e os granulócitos foram separados para extração do DNA. A seguir, a amostra foi testada para mutação JAK2V617F por reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo específico. Se esta mutação não foi detectada, foi realizada a análise para mutação em *CALR* por PCR seguido de análise de fragmentos. Se não houve detecção de mutação em ambos os genes, a amostra foi testada para mutação no éxon 10 de *MPL*, por PCR seguido de sequenciamento direto de Sanger. Paralelamente, foi feito um NGS nessas mesmas amostras de DNA. Após, houve a análise dos dados de NGS para identificação de mutações, tanto aquelas já descritas em bancos de dados, como o *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC), quanto novas variantes, ainda não descritas em bancos de dados.

Para detecção da mutação *JAK2 V617F*, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction) alelo específica, conforme descrito por Baxter et al, utilizando um primer reverse, um primer forward que se anela a montante da região da mutação e um primer forward específico para o alelo mutado.

A PCR ocorreu em termociclador Veriti® 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos foram aplicados em gel 2% agarose contendo brometo de etídeo, submetidos à eletroforese e visualizados no transiluminador Gel Doc XR® (BioRad, Hercules, CA, EUA). Para todas as amostras, a reação gera um produto de 364 pb, funcionando como controle interno de amplificabilidade do DNA. Um produto de 203 pb foi amplificado somente nas amostras portadoras da mutação *JAK2 V617F*.

A presença de inserções ou deleções (indels) no éxon 9 do gene *CALR* foi avaliada por análise de fragmentos, conforme descrito por Kampfl et al. Foi realizada PCR utilizando um primer forward fluoreicinado e um primer reverse e a seguir os produtos, junto com o marcador de peso molecular Liz 500, foram desnaturados em formamida e submetidos à eletroforese capilar no analisador genético 3130xL® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados com o programa ChimerMarker® (SoftGenetics, State College, PA, EUA). Em amostras não mutadas, um produto de 260 pb é amplificado. Para as mutações mais frequentemente descritas, se observam produtos de 210 pb (tipo 1) ou 265 pb (tipo 2).

Para avaliar mutações nos códons 505 e 515 de *MPL*, foi realizada PCR seguida de sequenciamento direto, usando primers específicos. Após verificação da

amplificação, os produtos de 186 pb foram purificados com o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Seguindo o protocolo do fabricante, o volume de reação foi combinado com 500 µL de Capture Buffer. Logo em seguida, a mistura foi pipetada em uma coluna de sílica GFX MicroSpin e centrifugada a 16000 g durante 30 s. A solução que passou pela coluna foi descartada, foram adicionados 500 µL de Wash Buffer 1 (contendo etanol) e repetiu-se o processo de centrifugação. Após descarte da solução que passou a coluna, realizou-se uma outra centrifugação para eliminar qualquer resíduo de etanol. Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo novo e foram adicionados 30 µL de Elution Buffer. O tubo foi incubado por 3 min e centrifugado a 16000g durante 3 min. Uma alíquota foi usada para estimar a concentração das amostras purificadas, por comparação com a intensidade de bandas do marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), após eletroforese em gel de agarose 1,0% com brometo de etídio. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit BigDye V3.1 (NimaGen, Nijmegen, NL), em placa MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA). O mix foi feito com 2,0 µL de Buffer 5X, 1,0 µL de BigDye V3.1 (NimaGen, Nijmegen, NL), 0,5 µL de primer forward ou reverse e 3,0 µL de amostra, completando para volume final de 10 µL com H2O Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, DE). A placa foi levada ao termociclador por 40 ciclos de 94 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. A seguir, foi feita a precipitação adicionando 45 µL de isopropanol 75% em cada poço, com incubação no escuro por 15 min, seguido de centrifugação a 2250 g, por 45 min, a 4 °C. A placa foi vertida sobre papel toalha para descarte do sobrenadante e foram adicionados 150 µL de etanol 70% gelado. Foi feita uma centrifugação a 2250g, por 15 min, a 4 °C e após descarte do sobrenadante, foi realizada uma última centrifugação com a placa invertida brevemente para descarte do resíduo de etanol.

Por fim, a eletroforese capilar foi realizada no analisador genético 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os eletroferogramas foram analisados com os programas Chromas V2.32 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, AUS) e MutationSurveyor® (SoftGenetics, State College, PA, EUA).

### 3.5 Análise de dados de NGS

Em nosso laboratório, uma abordagem de sequenciamento massivo paralelo foi realizada, previamente a este trabalho, para analisar amostras de DNA de pacientes com MFP para um painel de marcadores em neoplasias mieloides, usando a plataforma IonTorrent™ (ThermoFisher, MA, EUA) (Figura 8). O painel customizado utilizado engloba 36 genes recorrentemente mutados em neoplasias mieloides: *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *SUZ12*, *MLL* e *UTX* (Regulação epigenética); *CBL*, *AKT1*, *JAK2*, *MPL*, *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *BAP1*, *PTEN*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *PTPN11* e *NOTCH1* (Transdutores e supressores de tumores); *U2AF1*, *ZRSR2*, *SRSF2* e *SF3B1* (Spliceossoma); *ATRX*, *RUNX1*, *BCOR*, *CEBPA*, *WT1*, *ETV6*, *CUX1* e *PHF6* (Fatores de transcrição). Para tanto, as amostras de DNA foram quantificadas em NanoDrop (ThermoFisher, MA, EUA) e Qubit (ThermoFisher, MA, EUA), segundo instruções dos fabricantes. A seguir, 15 ng de DNA de cada paciente foram utilizados para construção de biblioteca genômica, usando o Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (ThermoFisher, MA, EUA) e adaptadores com códigos de barras. Depois de gerada a biblioteca, foi realizado PCR em emulsão no Ion OneTouch™ usando o Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit e o sequenciamento, utilizando o Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit, foi realizado no Ion Personal Genome Machine™ (PGM, (ThermoFisher, MA, EUA).

No escopo deste trabalho, os dados de NGS obtidos no laboratório a partir de amostras de 32 pacientes com MFP diferentes foram analisados para caracterizar o perfil mutacional da série de pacientes do estudo. Primeiramente, o programa Ion Reporter™ (ThermoFisher, MA, EUA) foi usado para análise dos dados, gerando chamadas de variantes e sua anotação. Para identificar potenciais mutações somáticas de interesse, a lista de variantes de cada paciente foi curada individualmente e foram desconsideradas todas as variantes: 1- com profundidade de cobertura (DP) <30 leituras (para variantes não descritas em bancos de dados); 2- Registradas no banco de dados dbSNP e não registradas no COSMIC; 3- Sinônimas ou localizadas em regiões não traduzidas (UTRs) ou em íntrons; 4- classificadas como benignas pelos programas SIFT e POLYPHEN.

De forma complementar e paralela, com a colaboração da Dra. Mariana Boroni, o pipeline de boas práticas do GATK desenvolvido pelo Broad Institute (Cambridge, MA, EUA) foi usado para chamada de variantes de nucleotídeo único (SNVs) e as



variantes foram anotadas usando o Preditor de Efeito de Variante do Ensembl (VEP). Para selecionar potenciais mutações somáticas de interesse, foram desconsideradas todas as variantes: 1- com profundidade de cobertura (DP) <6 leituras; 2- com frequência global de alelo menor (GMAF)> 0,01 com base nos bancos de dados 1000 Genomes e dbSNP; 3- previstas como LOW (sinônimas) ou MODIFIER (variantes em UTRs ou em íntrons); 4- classificadas como benignas pelos programas SIFT e POLYPHEN.

Finalmente, as variantes selecionadas foram analisadas por inspeção visual da região de sequenciamento, usando o programa IGV. Nessa etapa foram desconsideradas variantes: 1- localizadas na extremidade de amplicons; 2- localizadas em regiões homopoliméricas; 3- localizadas sempre em cis com outras variantes adjacentes, no mesmo amplicon; 4- identificadas somente em uma das direções de sequenciamento.

### **3.6 Sistema personalizado de prognóstico de Grinfeld J. e colaboradores**

Em 2018, Grinfeld J. et al analisaram um total de 2.035 pacientes com intuito de estabelecer um modelo para estratificação de risco personalizada de pacientes com NMPs (GRINFELD J., NANGALIA J., BAXTER EJ. et al., 2018).. As amostras de pacientes diagnosticados com NMP do estudo foram provenientes de ambulatórios do Hospital Addenbrooke e do Hospital Guy's and St Thomas no Reino Unido. Além disso, amostras adicionais foram obtidas do Hospital Universitário de Florença Careggi, na Itália.

O acompanhamento médio da coorte foi de 107, 78 e 53 meses para pacientes com diagnóstico de TE, PV e MFP no momento da coleta, respectivamente. Para análise genômica, foi projetado um painel personalizado de sondas de RNA (Agilent) para capturar região codante completa de 69 genes. Somente genes que apresentaram mutações em cinco ou mais pacientes foram incluídos na análise. Além disso, as amostras também foram submetidas a triagem adicional para mutações em CALR (exon 9), em JAK2 (JAK2V617F) e em MPL (W515 e S505).

Os autores usaram modelos estatísticos multivariados incorporando 63 variáveis e estimaram seu impacto nos desfechos morte em fase crônica (TE ou PV), transformação para MF, morte em MF e transformação para LMA :

- Demográficas:
  - (i) Idade ao diagnóstico
  - (ii) Gênero (feminino/masculino)
  
- Clínico (ao diagnóstico):
  - (i) Trombose (presença/ausência)
  - (ii) Esplenomegalia (presença/ausência)
  - (iii) Concentração de hemoglobina (g/l)
  - (iv) Contagem de leucócitos ( $\times 10^9/l$ )
  - (v) Contagem de plaquetas ( $\times 10^9/l$ )
  - (vi) PV versus TE (para pacientes em fase crônica)
  - (vii) Diagnóstico de MFP de novo ou pós PV/TE
  
- Genômico:
 

Presença(VAF>1%)/ausência de mutação em 33 genes (*JAK2* (V617F ou exon 12), *CALR*, *MPL* (S204/S505/W515 hotspots), *ASXL1*, *BCOR*, *CBL*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *GATA2*, *GNAS*, *GNB1*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *KRAS*, *MLL3*, *NFE2*, *NF1*, *NRAS*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RB1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1* e *ZRSR2*).
  
- Citogenética:
 

Presença/ausência de alterações de número de cópias ou perda de heterozigosidade neutra de número de cópias em 16 regiões: Cromossomo 1 (1p CN LOH ou 1q gain), 4, 5, 7, 8, 9 (9p CN LOH ou trissomia 9), 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20.

Os autores então implementaram uma ferramenta online (<https://cancer.sanger.ac.uk/mpn-multistage/>) onde é possível informar dados clínicos e genômicos de pacientes com NMP, para calcular seu prognóstico personalizado. O resultado é apresentado sob forma de gráfico, como o ilustrado na Figura 3.2. Para os pacientes com mielofibrose primária (MFP), a porção em marrom representa a chance desse paciente estar vivo em MFP, a porção em rosa

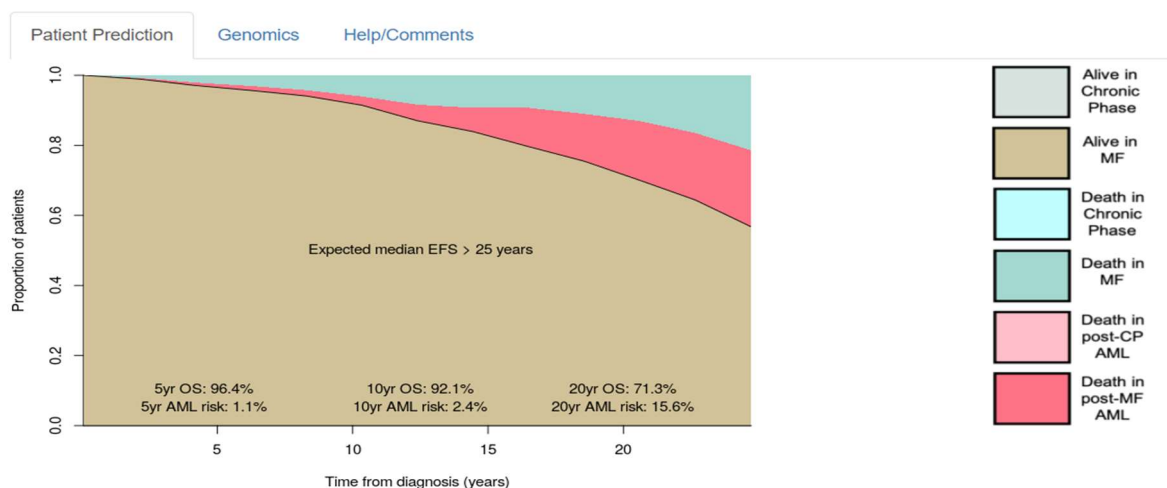
representa a chance desse paciente falecer após evolução para LMA e porção em azul, a chance desse paciente falecer em MFP. A sobrevida global e o risco de transformação leucêmica em 5, 10 e 20 anos são apresentados, assim como a sobrevida livre de eventos mediana esperada.

Nesse modelo é possível calcular o prognóstico personalizado sem a necessidade de preencher todas as variáveis. Dessa forma, utilizamos as variáveis disponíveis da nossa série de pacientes com MFP para obter o prognóstico personalizado de cada paciente. Utilizamos as variáveis listadas a seguir:

- Demográficas:
  - Idade ao diagnóstico
  - Gênero (feminino/masculino)
  
- Clínico:
  - Trombose (presença/ausência)
  - Esplenomegalia (presença/ausência)
  - Concentração de hemoglobina (g/l)
  - Contagem de leucócitos ( $\times 10^9/l$ )
  - Contagem de plaquetas ( $\times 10^9/l$ )
  
- Genômico:

Presença ou ausência de mutação **em 37 genes** (*ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2, DNMT3A, TET2, SUZ12, MLL, UTX, CBL, AKT1, JAK2, MPL, KIT, FLT3, NPM1, BAP1, PTEN, TP53, KRAS, NRAS, HRAS, PTPN11, NOTCH1, U2AF1, ZRSR2, SRSF2, SF3B1, ATRX, RUNX1, BCOR, CEBPA, WT1, ETV6, CUX1, PHF6 e CALR*).

Apesar do painel de NGS utilizado cobrir 36 genes e ter a análise para presença de mutação em CALR ter sido realizada, 10 genes que estão no modelo não foram analisados (*GATA2, GNAS, GNB1, MLL3, NFE2, NF1, PPM1D, RB1, SH2B3 e STAG2*) e outros 14 genes que estavam presentes no painel não estão no modelo (*SUZ12, MLL, UTX, AKT1, FLT3, NPM1, BAP1, PTEN, HRAS, NOTCH1, ATRX, CEBPA, WT1 e ETV6*)



**Figura 3.2. Calculadora de risco personalizado proposta por Grinfeld J. e colaboradores.**

Grinfeld J. e colaboradores estudaram 2035 pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMP), analisando variáveis demográficas, clínicas e genômicas. A partir desses dados, determinaram variáveis com impacto no desfecho dos pacientes: transformação para mielofibrose secundária (a partir de trombocitemia essencial ou policitemia vera), transformação para leucemia mieloide aguda e morte. Foi elaborado um modelo integrando 63 variáveis clínicas e genômicas para predição de risco individualizado dos pacientes. Os autores disponibilizaram uma calculadora online, onde é possível inserir dados clínicos e moleculares de um paciente com NMP e acessar seu risco personalizado. O resultado é apresentado sob forma de gráfico, como o ilustrado na figura. Para os pacientes com mielofibrose primária (MFP), a porção em marrom representa a chance desse paciente estar vivo em MFP, a porção em rosa representa a chance desse paciente falecer após evolução para LMA e porção em azul, a chance desse paciente falecer em MFP. No eixo x está representado o tempo, que varia de 0 até 25 anos. A sobrevivência global e o risco de transformação leucêmica em 5, 10 e 20 anos são apresentados, assim como a sobrevivência livre de eventos mediana esperada. Fonte: (Grinfeld et al., 2018)

### 3.7 Análise estatística

Para análise dos dados demográficos, laboratoriais e clínicos foram utilizados o teste de Fisher ou Mann-Whitney, ANOVA One-Way, teste de Bonferroni, por meio do programa GraphPadPrism (teste bicaudal) e teste de Kruskal-Wallis no programa R. A análise de sobrevivência foi realizada utilizando o método de Kaplan-Meier.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Casuística

Neste trabalho buscamos estudar uma série retrospectiva de pacientes com MFP no Rio de Janeiro. Foram incluídos na análise 32 pacientes diagnosticados com MFP em dois hospitais universitários, HUPE e HUAP (Tabela 4.1). No total, 32 amostras foram analisadas, apesar de ser um n relativamente baixo, é importante ressaltar que essa doença é rara e existem poucos estudos brasileiros.

Nessa série de pacientes, 14 pacientes eram do sexo feminino (43,75%) e a mediana de idade ao diagnóstico foi de 62,5 anos. Ao diagnóstico, os pacientes apresentaram uma mediana de 110 g/L de hemoglobina,  $10,9 \times 10^9/L$  de leucócitos,  $386,5 \times 10^9/L$  de plaquetas e 12 pacientes apresentaram blastos ao diagnóstico, variando de (1 a 12%). Vinte pacientes apresentaram esplenomegalia e 3 pacientes já haviam apresentado trombose ao diagnóstico. Os sintomas constitucionais na MFP: febre, emagrecimento, sudorese noturna, cefaléia, turvação visual, zumbido, pletora, astenia, prurido e dor abdominal, foram estabelecidos de acordo com Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form - Total Symptom Score (MPN-SAF TSS). No total, 22 pacientes apresentaram pelo menos um dos sintomas. O sintoma mais comum apresentado pelos pacientes foi emagrecimento e astenia. A maioria (10) dos pacientes apresentou mais de um sintoma constitucional, dois pacientes apresentaram cinco sintomas. Somente um paciente apresentou febre e sudorese noturna.

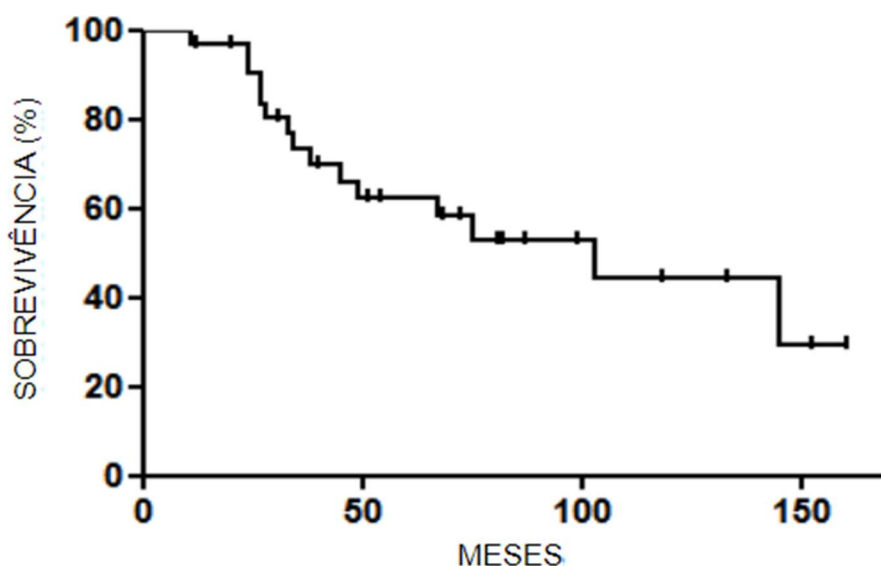
**Tabela 4.1. Variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes com MFP**

<b>Variáveis</b>	
<b>N TOTAL</b>	<b>32</b>
Sexo feminino (N)(%)	14 (43,75%)
Idade, anos	62,5 (42,0 -77,0)
Hemoglobina, g/L	110,0 (40,0 - 196,0)
Leucócitos, $\times 10^9/L$	10,9 (2,1 - 57,6)
Plaquetas, $\times 10^9/L$	386,5 (77,0 - 1435,0)
Blastos circulantes (%)	0% (0% - 12%)
Sintomas Constitucionais* (N)	22
Trombose (N)	3
Esplenomegalia(N)	20

\*Febre, Emagrecimento, Sudorese Noturna, Cefaléia, Turvação Visual, Pletora, Astenia, Prurido, Dor abdominal e Dor Óssea.

O tempo de seguimento dos pacientes teve uma mediana de 53 meses, variando de 11 até 161 meses. No total, 3 pacientes evoluíram para LMA e faleceram. Além desses, 12 outros pacientes foram a óbito durante o

acompanhamento e na figura abaixo é possível visualizar a curva de sobrevida global (Figura 4.1).

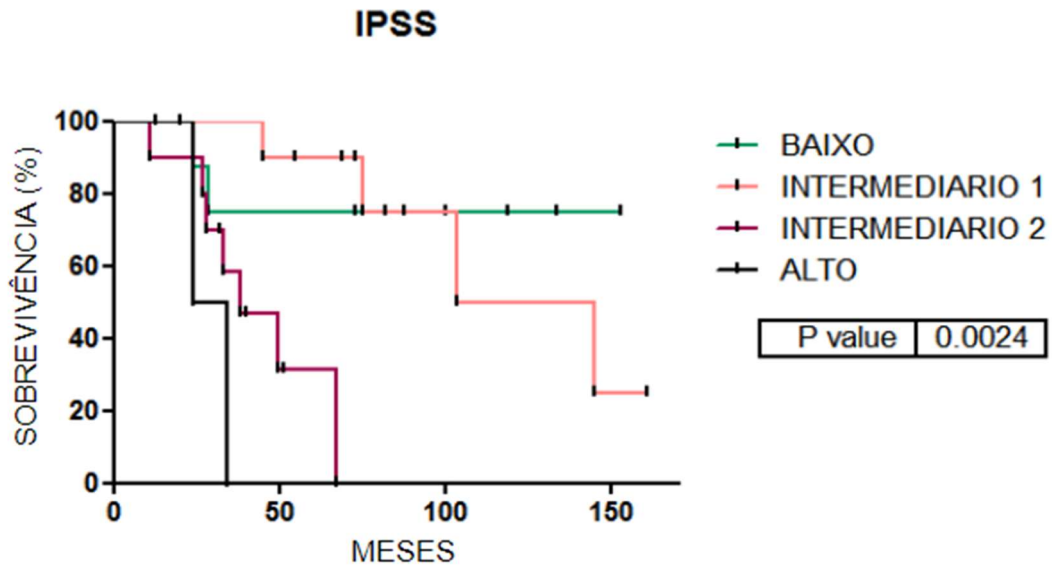


**Figura 4.1. Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos 32 pacientes com mielofibrose primária (MFP).** Nesse trabalho foram estudados 32 pacientes com MFP e o tempo de acompanhamento variou de 11 até 161 meses. Dos 32 pacientes 15 foram a óbito.

Quando estratificados pelo sistema de pontuação IPSS (Tabela 4.2), 9 pacientes encontravam-se na categoria de risco baixo, 11 pacientes na categoria de risco intermediário-1, 10 pacientes na categoria de risco intermediário-2 e 2 pacientes na categoria de risco alto. Estratificando em grupos segundo o IPSS, é possível observar através da análise da curva de sobrevida que a sobrevida global dos grupos é estatisticamente diferentes (Mantel-Cox Test; p.valor:0.0024)(Figura 4.2).

**Tabela 4.2. Estratificação dos pacientes com MFP segundo IPSS**

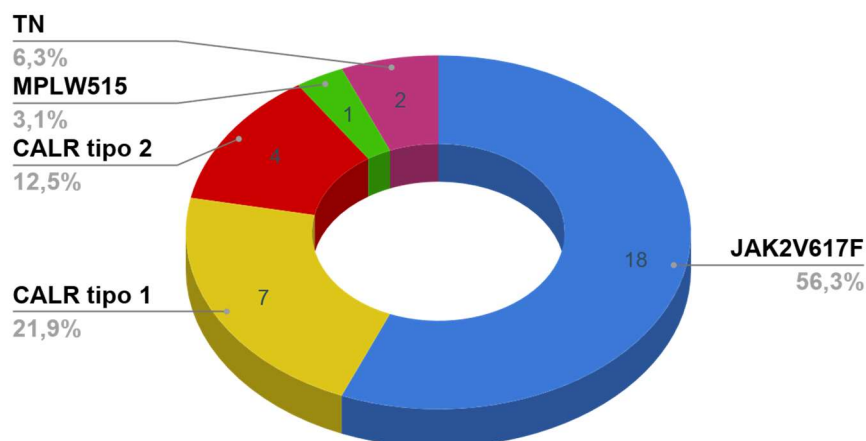
<b>Categoria de risco</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Pacientes</b>
Baixo	0 pontos	9
Intermediário-1	1 ponto	11
Intermediário-2	2 pontos	10
Alto	≥3 pontos	2



**Figura 4.2.** Curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes com mielofibrose primária (MFP), comparando os diferentes grupos estratificados de acordo com o sistema IPSS. A linha verde representa os pacientes com MFP estratificados no grupo de risco baixo pelo IPSS, a linha rosa representa os pacientes com MFP estratificados no grupo de risco intermediário 1 pelo IPSS, a linha roxa representa os pacientes com MFP estratificados no grupo de risco intermediário 2 pelo IPSS e a linha preta representa os pacientes com MFP estratificados no grupo de risco alto pelo IPSS.  $p = 0.0024$ , Mantel-Cox Test.

#### 4.2 Frequência das mutações drivers e sua correlação com as variáveis clínico-laboratoriais ao diagnóstico.

Como parte da abordagem diagnóstica da MFP foi realizada em nosso laboratório a análise molecular quanto à presença das mutações driver de NMP. Em 94% dos pacientes pelo menos uma mutação driver foi encontrada: 18 pacientes eram portadores da mutação JAK2V617F (56,3%), 11 pacientes de mutação CALR sendo 21,9% do tipo 1 e 12,5% do tipo 2, e 1 paciente de MPLW515 (3,1%). Em 6,3% dos pacientes nenhuma dessas mutações foi encontrada e foram classificados como triplo negativos (TN) (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Distribuição de mutações *driver* em pacientes com mielofibrose primária (MFP).** A análise molecular de mutações *drivers* foi realizada em uma série de 32 pacientes com MFP. A mutação *JAK2* V617F foi avaliada por PCR alelo específico, as inserções e deleções em *CALR* foram avaliadas por PCR com primers fluoreicidados seguida de análise de fragmentos e as mutações no códon 515 de *MPL* foram avaliadas por PCR seguida de sequenciamento direto do éxon 10. PCR: reação em cadeia da polimerase; TN: triplo-negativos, pacientes que não apresentam as mutações avaliadas em *JAK2*, *CALR* ou *MPL*.

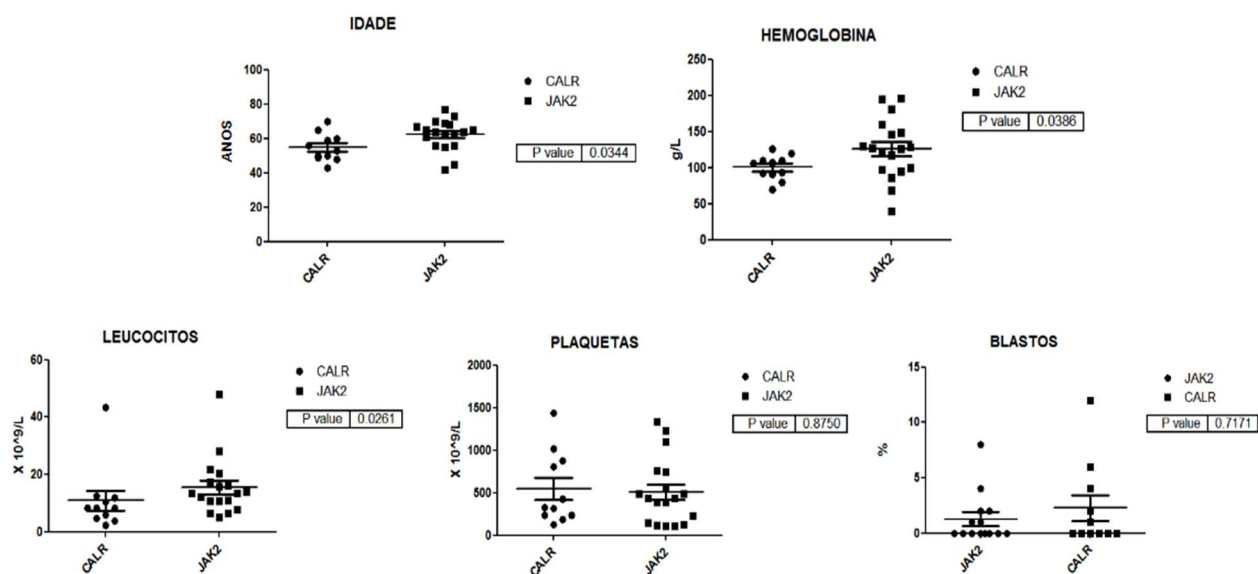
Essas mutações *drivers* não são somente relevantes para a patogênese, mas também podem influenciar na apresentação clínica da doença. Na tabela abaixo (Tabela 4.3), as características clínicas e laboratoriais dos pacientes foram analisadas em função da mutação *driver* apresentada. Devido ao número reduzido de pacientes portadores de mutação em *MPL* e pacientes TN, esses grupos não foram incluídos na análise estatística. Dessa forma, foram comparados os grupos *JAK2* V617F e *CALR*.



**Tabela 4.3. Variáveis clínicas e laboratoriais de pacientes com MFP de acordo com a mutação driver**

Variáveis	JAK2 V617F	CALR INDEL	MPL W515	TN	p valor
<b>N</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
Sexo feminino (N)(%)	6 (33,3%)	7 (63,6%)	0	1 (50%)	0.118
Idade, anos	64 (42-77)	53 (43-70)	75	67 (64-70)	0.034*
Hemoglobina, g/L	126,5 (40,0-196,0)	106 (70-126)	72	94 (78-110)	0.039*
Leucócitos, X 10 <sup>9</sup> /L	13,4 (5,0-47,8)	8,4 (2,2-43,4)	3,9	29,9 (2,1-57,6)	0.026*
Plaquetas, X 10 <sup>9</sup> /L	435 (105-1332)	329 (130-1435)	107	78 (77-79)	0.875
Blastos circulantes (%)	0 (0-6)	0 (0-12)	0	1 (0-2)	0.717
<b>Sintomas</b>					
Constitucionais (N)	11	9	1	1	0.384
Trombose (N)	2	1	0	0	0.865
Esplenomegalia (N)	12	6	1	2	0.521

\*P VALOR<0.05



**Figura 4.4. Comparação entre o grupo de pacientes com mielofibrose primária portadores de mutação em *JAK2* e o grupo de portadores de mutação em *CALR*, com relação a variáveis demográfica e laboratoriais.** Dot Plots comparativos entre os grupos de pacientes com MFP portadores de mutação em *JAK2* e pacientes portadores de mutação em *CALR* são apresentados e a análise estatística foi calculada pelo teste Mann Whitney. Quando os dois grupos foram comparados, pacientes com mutação em *JAK2* apresentaram idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos e hemoglobina significativamente maior do que pacientes com mutação em *CALR* (Mann-Whitney U Test, p=0.034; p=0.039; p=0.026, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para contagem de plaquetas e blastos circulantes.

Após análise estatísticas das variáveis quantitativas e qualitativas, utilizando Mann-Whitney U Test e Kruskal Wallis test respectivamente, foi possível identificar diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos de pacientes (Figura 4.4).

Pacientes portadores da mutação *JAK2* V617F (Grupo JAK+) apresentaram idade ao diagnóstico significativamente maior do que pacientes portadores de *CALR* indel (Grupo CALR+) (Mann-Whitney U Test, p.valor:0.034). Em relação a contagem de leucócitos e a hemoglobina, também foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo CALR+ e o grupo JAK2+ (Mann-Whitney U Test, p.=0.039 e 0.026 respectivamente). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as outras variáveis analisadas, como sexo, contagem de plaquetas, blastos circulantes, trombose e esplenomegalia.

### **4.3 Análise do perfil genômico**

Na última década, a arquitetura genômica das NMPs vem sendo elucidada e mutações em determinados genes poderiam ter impacto clínico na MFP. Assim, em nosso laboratório foi realizada uma abordagem de sequenciamento massivo paralelo, previamente a este trabalho, para análise de amostras de DNA de pacientes com MFP para um painel de marcadores em neoplasias mieloides, usando a plataforma IonTorrent™ (ThermoFisher, MA, EUA). O painel de NGS alvo específico foi customizado para análise da região exônica completa de 36 genes, 588 éxons e envolvendo 1099 amplicons, cobrindo mais do que 109 mil bases. As amostras que foram utilizadas tinham uma mediana de tempo após o diagnóstico de 6,7 meses, podendo variar de dois meses antes do diagnóstico até 121 meses após.

Nesse trabalho, os dados de NGS dos pacientes foram analisados para determinar a paisagem genômica da série de pacientes com MFP. A profundidade de sequenciamento média entre as amostras foi de 204 reads (16 - 1134 reads) e a cobertura da região alvo foi maior do que 98%.

O programa Ion Reporter™ (ThermoFisher, MA, EUA) foi utilizado para análise dos dados e no total 4970 variantes foram chamadas, com mediana de 144 variantes por paciente, variando de 54 a 226. Com relação à localização, 2825 variantes eram intrônicas (57%), 24 estavam em sítios de splicing (0,5%) e 1892 eram exônicas

(38%), sendo que as demais variantes (229 - 4,5%) estavam localizadas em regiões não traduzidas (UTR) ou não tinham a localização identificada.

Dentre as variantes exônicas, observou-se que 93,5% eram *single nucleotide variations* (SNV), 0,8% eram *multiple nucleotide variations* (MNV) e 5,7% eram inserções e deleções (INDEL). Dentre as SNV, 55,1% eram sinônimas, 43,4% missense e 1,5% nonsense.

Para tentar identificar mutações somáticas, realizamos uma curadoria dessas variantes. Foram excluídas todas as variantes: intrônicas (fora de sítios de splicing), UTR, sem localização definida e exônicas sinônimas. Foram consideradas de interesse as variantes: localizadas em sítios de splicing (24) e exônicas - missense (768), nonsense (27), MNV (15) e INDEL (108). A seguir, essas variantes foram verificadas com relação a bancos de dados genômicos. Foram excluídas as variantes descritas no banco de dados dbSNP como polimorfismos. Foram consideradas "mutações somáticas conhecidas" aquelas descritas no banco de dados COSMIC, observando-se informações do banco como: número e tipo de amostra tumoral em que foram encontradas, se já haviam sido confirmadas como somáticas e frequência populacional (quando disponível no dbSNP). Foram consideradas "potenciais novas mutações somáticas" aquelas não descritas em nenhum dos dois bancos, mas preditas como potencialmente patogênicas pelos algoritmos sift/polyphen.

Ainda, foi feita uma inspeção visual no visualizador genômico IGV. Nessa inspeção, foram consideradas possíveis erros de sequenciamento e excluídas variantes que estavam presentes somente em leituras em uma das fitas, variantes localizadas em regiões homopoliméricas ou variantes localizadas na extremidade de um amplicon. Para as "potenciais novas mutações somáticas" só foram mantidas aquelas com profundidade maior do 30 X, pelo menos 6 leituras do alelo variante e variant allelic frequency (VAF) maior do que 5%.

No final dessa análise, 58 "mutações somáticas conhecidas" foram encontradas e 24 "potenciais novas mutações somáticas" foram identificadas. Desse total, 3 variantes estavam em região de splicing (1 conhecida, 2 novas), 15 variantes eram exônicas INDEL (10 conhecidas, 5 novas), 2 MNV (novas), 11 nonsense (10 conhecidas, 1 nova) e 51 variantes missense (37 conhecidas, 14 novas).

Por outro lado, com a colaboração da Dra. Mariana Boroni, os dados de sequenciamento foram também analisados utilizando o pipeline do GATK, para

identificar potenciais mutações somáticas de tipo SNV. Devido às particularidades do sequenciamento pela plataforma IonTorrent esse pipeline não foi utilizado para análise de INDEL. No pipeline do GATK, 42 SNV foram detectadas e identificadas como potencialmente patogênicas.

A maioria das variantes foi detectada pelas duas análises. No entanto, 30 variantes foram detectadas apenas pela análise via Ion Reporter, sendo 18 "mutações somáticas conhecidas". Em especial, a mutação driver (p.W515L) no gene *MPL* detectada no fluxograma de diagnóstico molecular por sequenciamento direto, foi identificada pela análise do IonReporter, porém não foi chamada pelo pipeline do GATK, reforçando a importância da utilização de mais de um pipeline na análise.

Foram excluídas as variantes novas em que a fração alélica da variante (VAF) era menor do que 5%. Para cada "potencial nova mutação somática" foi feita uma análise individualizada, utilizando softwares que avaliam in silico a patogenicidade dessas possíveis mutações, para classificação da variante em patogênica ou provavelmente patogênica (mutação), de significado clínico incerto ou benigna. Ao final, oito novas variantes foram selecionadas. Na Tabela 4. 4, além da nomenclatura e a localização dessas novas variantes também é possível observar as ferramentas que foram utilizadas para selecioná-las como potenciais novas mutações, como os programas: Mutation Taster, PhyloP, Polyphen, Sift e Align GVGD.

**Tabela 4.4. Ferramentas utilizadas para a Classificação das novas variantes**

GENE	CDS <sup>1</sup>	AA <sup>2</sup>	NM <sup>3</sup>	VAF <sup>4</sup>	MUTATION TASTER <sup>5</sup>	PHYLOP <sup>6</sup>	POLYPHEN <sup>7</sup>	SIFT <sup>8</sup>	ALIGN GVGD <sup>9</sup>
ASXL1	c.2493dup	p.Asp832Ter	NM_01533 8.5	14,1%		-0.22			
	c.2134_2155del	p.Ala712Argfs*6	NM_01533 8.5	18,3%		2.89			
TET2	c.4172_4173delinsAT	p.Gly1391Asp	NM_00112 7208.2	46,2%		2.66	1.0	Deleterious (score:0, median: 3.09)	Class C65 (GV:0.00 - GD: 93.77)
	c.2905C>T	p.Gln969Ter	NM_00112 7208.2	34,8%		2.73			
	c.689dup	p.Ser231Valfs*23	NM_00112 7208.2	43,6%		2.3			
EZH2	c.1949T>C	p.Ile650Thr	NM_00445 6.4	43,4%	disease causing (prob: 1)	2.06	0.997	Tolerated (score: 0.32, median: 2.97)	Class C0 (GV:256.1 0 - GD: 0.00)
PTPN11	c.794G>A	p.Arg265Gln	NM_00283 4.3	48,6%	disease causing (prob: 1)	2.86		Deleterious (score: 0.04, median: 3.49)	
CBL	c.2270del	p.Ala757Glufs*109	NM_00518 8.3	47,9%		2.45			

<sup>1</sup>Sequência codante.

<sup>2</sup>Aminoácido.

<sup>3</sup>Registro do mRNA no banco de dados .

<sup>4</sup>Fração alélica da variante (VAF).

<sup>5</sup>Mutation Taster é software utilizado para avaliar variantes de sequência de DNA quanto ao seu potencial causador de doenças.

<sup>6</sup>PhyloP é um software utilizado para medir a conservação evolutiva em locais de alinhamento individuais.

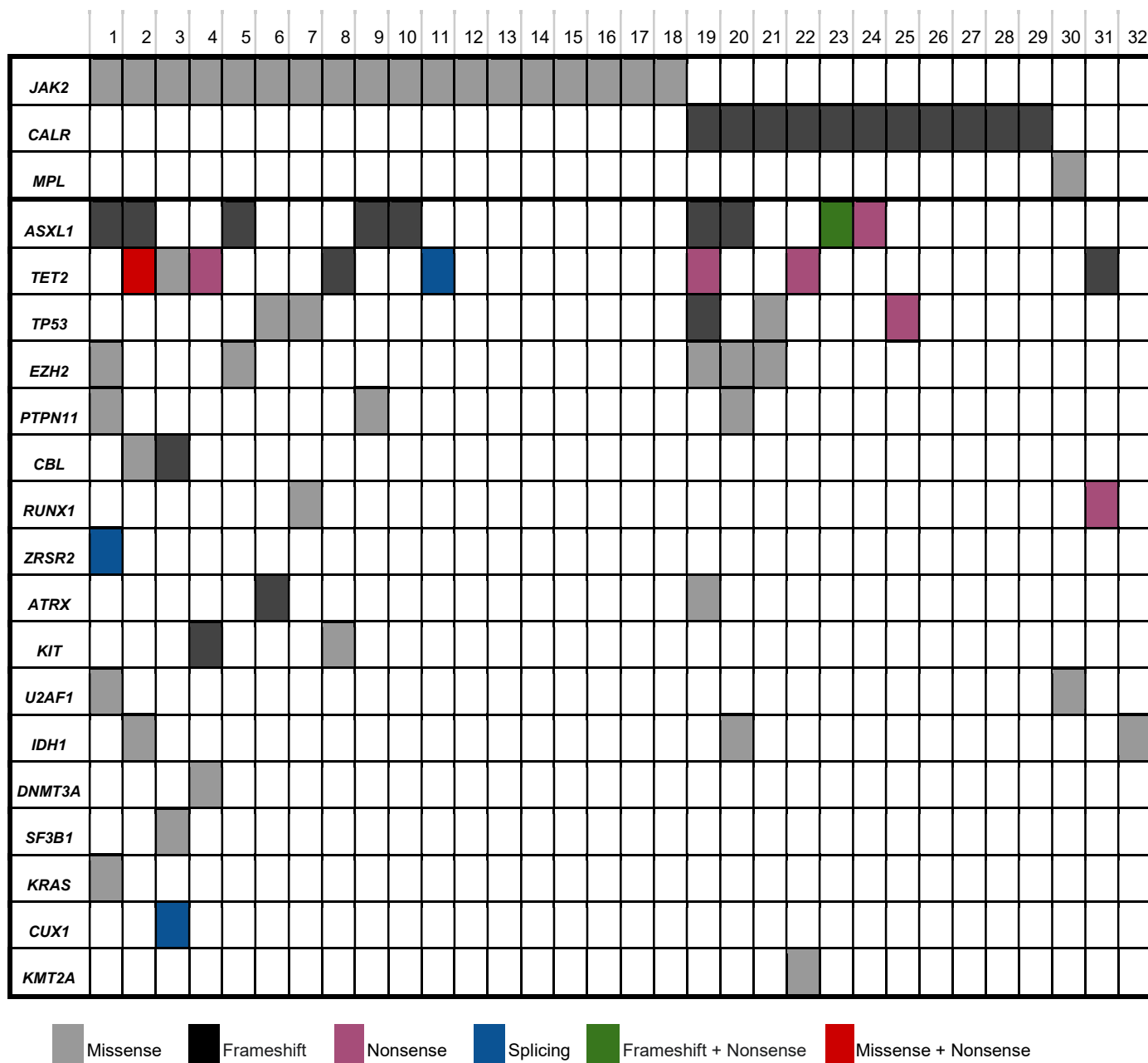
<sup>7</sup>PolyPhen é um software que prediz o possível impacto de uma substituição de aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas.

<sup>8</sup>SIFT é um software que prevê se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína com base na homologia de sequência e nas propriedades físicas dos aminoácidos.

<sup>9</sup>Align-GVGD é um programa que combina as características biofísicas de aminoácidos e alinhamentos de várias sequências de proteínas para prever onde as substituições missense em genes de interesse se localizam.

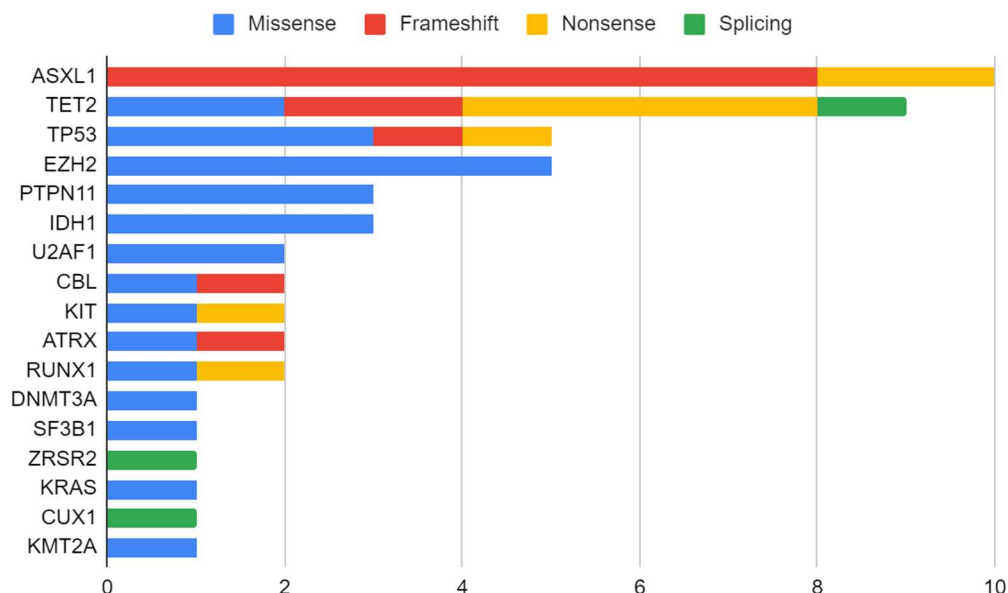
Integrando as análises feitas pelo Ion Reporter e GATK, um total de 83 mutações foram identificadas em 17 genes nos 32 pacientes com MFP (Figura 4.5). Vinte genes do painel não apresentaram nenhuma mutação na série de pacientes, sendo eles: *PHF6*, *FLT3*, *SRSF2*, *IDH2*, *NRAS*, *BCOR*, *SUZ12*, *MLL*, *UTX*, *AKT1*, *NPM1*, *BAP1*, *PTEN*, *HRAS*, *NOTCH1*, *SRSF2*, *CEBPA*, *WT1*, *ETV6* e *CUX1*.

No que diz respeito às mutações driver da MFP, em nosso painel de NGS estão incluídos os genes JAK2 e MPL. Dentre os 18 pacientes positivos para JAK2 V617F identificados por PCR alelo específico no fluxograma de diagnóstico molecular, em 14 pacientes essa mutação driver também foi identificada por NGS. Em 4 casos, a mutação não foi chamada na tabela de variantes, porém inspeção visual da região mostrou que havia leituras de sequência variante correspondente à mutação. No caso do paciente portador de mutação em *MPL* a mutação foi identificada tanto por sequenciamento direto, no fluxograma de diagnóstico molecular, como por NGS (pipeline IonReporter). Nos pacientes com mutação em *CALR* e os TN não foram detectadas por NGS mutações JAK2 ou mutações em *MPL*. A figura abaixo é resultante da integração de todos os resultados obtidos, sendo as mutações drivers detectadas conforme o fluxograma de diagnóstico e as mutações adicionais por NGS (Figura 4.5).



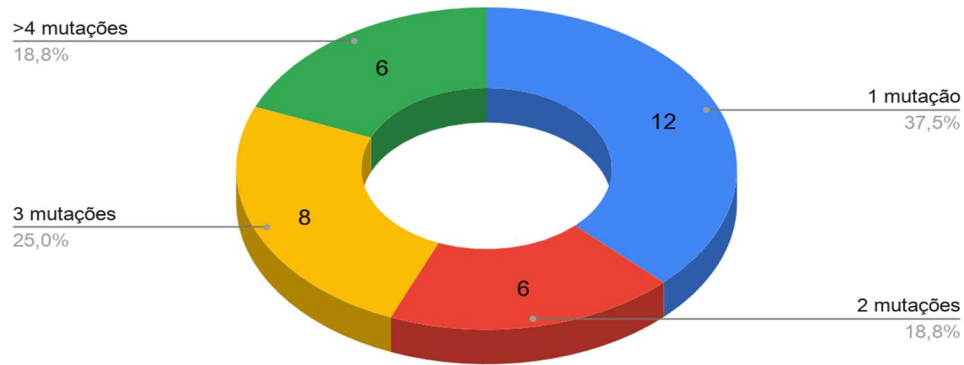
**Figura 4.5. Perfil molecular dos pacientes com mielofibrose primária (MFP.)** Na tabela está ilustrada a distribuição de genes mutados na série de 32 pacientes com MFP analisada nesse trabalho. Cada linha representa um gene e cada coluna, um paciente. As mutações foram representadas por barras coloridas de acordo com o tipo (*missense*, *nonsense*, *splicing* ou *frameshift*). Alguns pacientes apresentam mais de uma mutação no mesmo gene. As mutações *driver* foram identificadas por abordagens gene a gene, de acordo com o fluxograma de diagnóstico molecular, enquanto nos demais genes, por sequenciamento de próxima geração (NGS). Genes que não apresentaram mutação em nenhum dos 32 pacientes do estudo não foram representados na figura: *PHF6*, *FLT3*, *SRSF2*, *IDH2*, *NRAS*, *BCOR*, *SUZ12*, *MLL*, *UTX*, *AKT1*, *NPM1*, *BAP1*, *PTEN*, *HRAS*, *NOTCH1*, *SRSF2*, *CEBPA*, *WT1*, *ETV6* e *CUX1*.

Com relação às mutações adicionais, a Figura 4.6 ilustra a frequência de mutações por gene na série de pacientes com MFP estudada. O gene com maior frequência de mutações foi *ASXL1* (11 mutações). Todas as mutações eram frameshift ou nonsense, sendo que dois pacientes apresentaram duas mutações. Dessas 11 mutações, a mais frequente foi a p.G646fs\*12 (36,4%). Em nosso laboratório, essa mutação foi confirmada anteriormente por sequenciamento direto, pois encontra-se em uma região homopolimérica de difícil identificação pelo NGS usando a plataforma IonTorrent. As mutações somáticas conhecidas e as potências novas mutações somáticas também foram detectadas em nosso laboratório por sequenciamento direto. O segundo gene com mais mutações foi *TET2*, apresentando 9 mutações. Todos os tipos de mutações foram identificadas nesse gene: aquelas localizadas em sítio de splicing, missense, nonsense e INDEL frameshift. Em um trabalho prévio do grupo, as mutações em *TET2*, conhecidas e novas, foram confirmadas por sequenciamento direto. A maioria das mutações encontradas foi do tipo missense, representando 49% das mutações nos genes adicionais.



**Figura 4.6. Genes mutados em mielofibrose primária (MFP) nesse estudo.** A distribuição de mutações por gene na série de 32 pacientes com MFP. A barra azul representa as mutações do tipo *missense*, a barra vermelha do tipo *frameshift*, a barra amarela do tipo *nonsense* e a barra verde as mutações em região de *splicing*.





**Figura 4.7. Distribuição dos pacientes com mielofibrose primária (MFP) em função do número de mutações.** A porção azul representa os 12 pacientes do estudo que apresentaram apenas uma mutação (37,5%), a porção vermelha, os 6 pacientes que apresentaram duas mutações (18,8%), a porção amarela, os 8 pacientes que apresentaram três mutações (25,0%) e a porção verde, os 6 pacientes que apresentaram quatro ou mais mutações (18,8%).

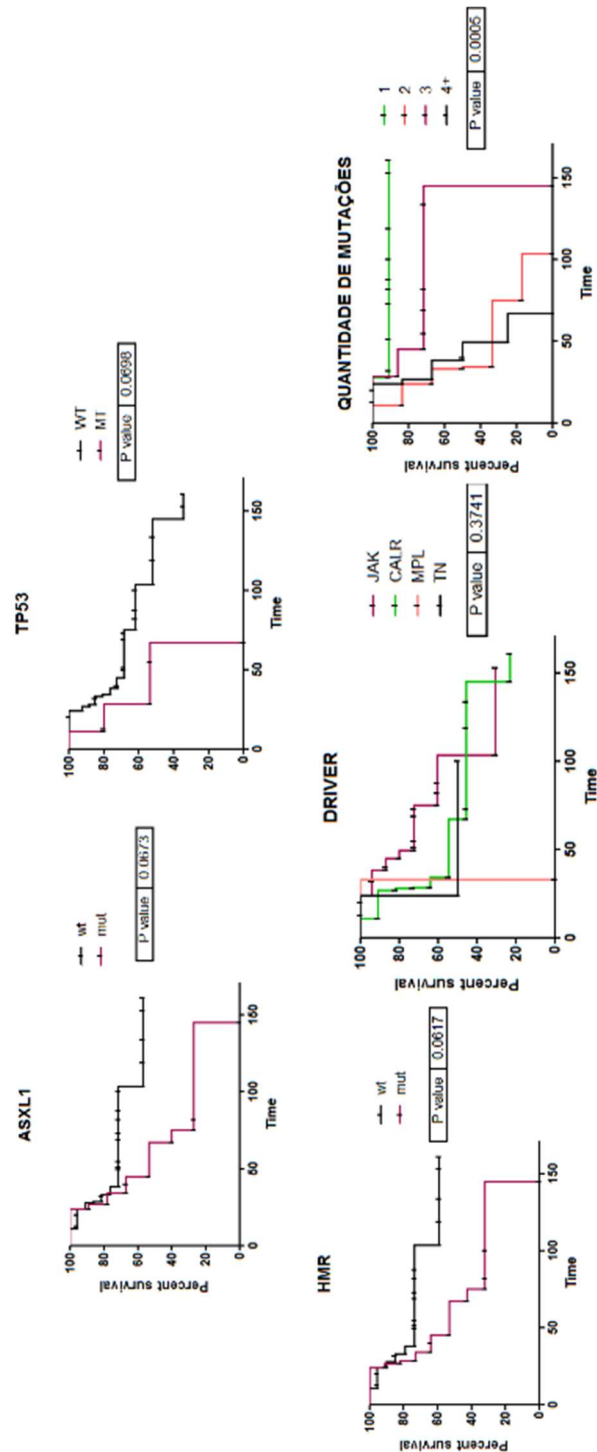
Na Figura 4.7 está apresentado o número de pacientes em função do número de mutações. 12 pacientes apresentaram uma mutação (37,5%), 6 pacientes, 2 mutações (18,8%), 8 pacientes, 3 mutações (25,0%) e 6 pacientes apresentaram 4 ou mais mutações (18,8%). Dos 32 pacientes estudados, aquele com o maior número de alterações apresentou sete mutações (*JAK2*, *ASXL1*, *EZH2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *KRAS* e *PTPN11*).

Foi observado que nove pacientes apresentaram somente as mutações driver das NMPs. Também verificou-se que 33,3% dos pacientes apresentaram mutações do tipo HMR, sendo que a presença de duas mutações do tipo HMR foi detectada em 12,1%. As frequências mutacionais foram de 33,3% para *ASXL1*, 15,1% para *EZH2* e 9% para *IDH1*.

#### **4.4 Impacto do perfil genômico dos pacientes com MFP no prognóstico**

Trabalhos recentes na literatura vêm demonstrando que o perfil de mutações somáticas de cada paciente poderia ter impacto em seu prognóstico, assim como a quantidade de mutações por pacientes e o tipo de mutação driver. Mutações em genes específicos, como: *ASXL1*, *TP53* e do tipo HMR (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2*) já foram descritos como mau prognóstico para pacientes com MFP. Desse modo, com intuito de avaliar o impacto em nossa série de pacientes, foram

analisadas as curvas de sobrevida de cada grupo (Figura 4.8). Quando comparados os grupos mutado versus selvagem (WT) para genes *ASXL1* (p.=0.07), *TP53* (p.= 0.07) e do tipo HMR (p.= 0.06), utilizando o Mantel-Cox Test o desfecho de nenhum foi significativamente diferente. E quando comparados os desfechos dos grupos discriminados pelas mutações drivers também não foi observada estatisticamente diferente (Mantel-Cox Test; p.=0.37). Entretanto, considerando o número de mutações por paciente, foi observado que quando os pacientes foram agrupados os grupos foram estatisticamente diferentes (Mantel-Cox Test; p.= 0.0005).



**Figura 4.8. Avaliação do impacto de mutações na sobrevida dos pacientes com mielofibrose primária (MFP) nesse estudo.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) comparando os grupos de pacientes com MFP portadores do gene selvagem (WT) ou mutações em *ASXL1* ( $p=0.07$ ), *TP53* ( $p=0.07$ ) ou do tipo *High Molecular Risk* (grupo que inclui os genes *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* e *IDH1/IDH2* (VANNUCCHI AM, LASHO TL, GUGLIELMELLI, et al., 2013)) ( $p=0.06$ ). Também foram comparados os grupos de pacientes com MFP portadores de mutação em *JAK2*, portadores de mutação em *CALR*, portadores de mutação em *MPL* e pacientes triplo-negativos ( $p=0.37$ ).

Finalmente, foram comparados os grupos de pacientes com MFP portadores de uma, duas, 3 ou 4 ou mais mutações ( $p=0.0005$ ).

Em 2018, o trabalho de Grinfeld et al demonstrou que através da integração de dados genômicos com variáveis clínicas, foi possível distinguir subgrupos genéticos distintos em relação ao desfecho e gerar previsões personalizadas dos prognósticos dos pacientes. A partir do modelo desenvolvido esse grupo elaborou uma calculadora on-line que incorpora 63 variáveis clínicas, laboratoriais e dados genômicos de pacientes com NMP para calcular o prognóstico individualizado, que é indicado por um gráfico ilustrando a probabilidade de estar vivo com MFP, probabilidade de morrer com MFP e probabilidade de morrer com LMA secundária.

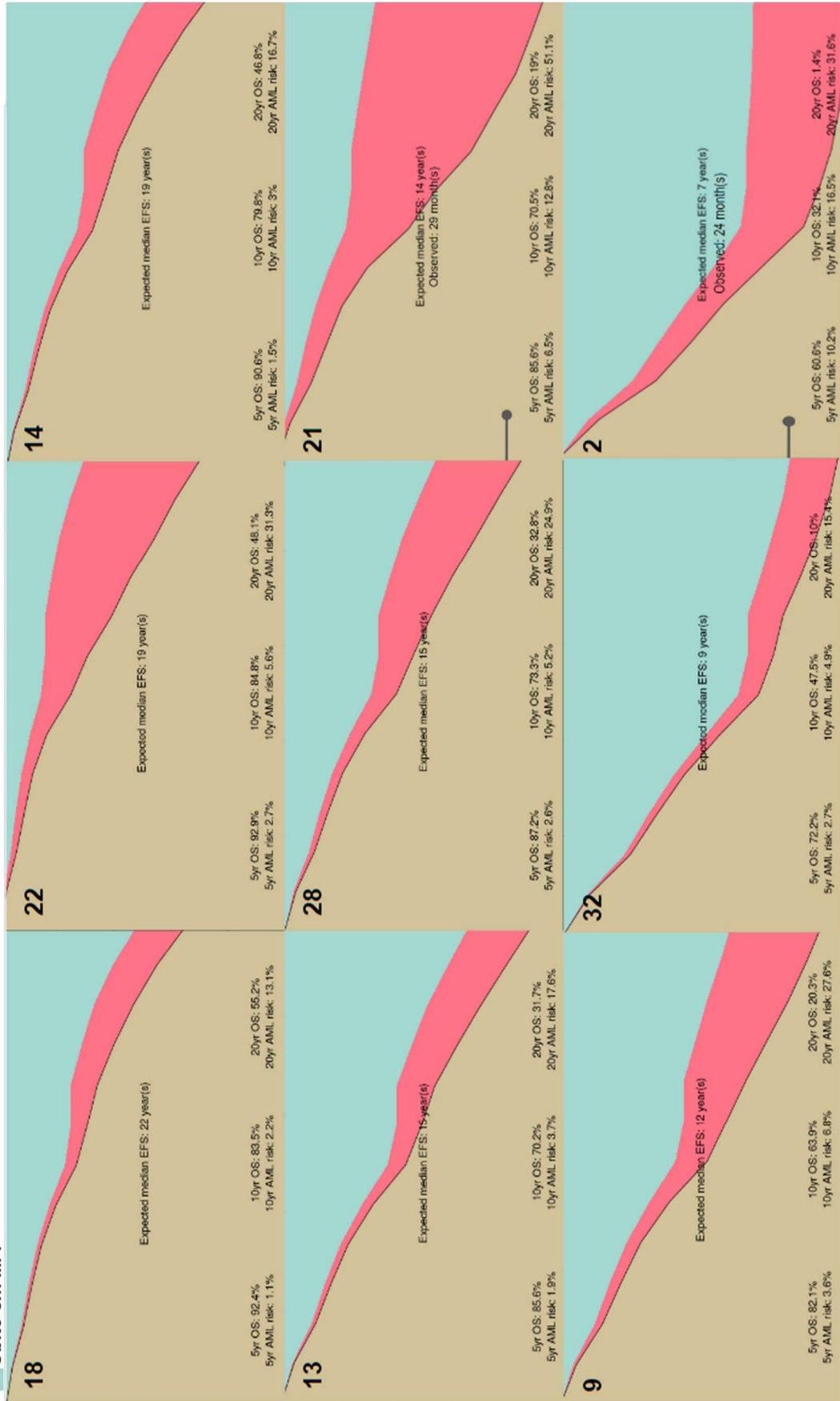
Assim, utilizamos as variáveis clínicas, laboratoriais e moleculares disponíveis para nossa série de pacientes para aplicar no sistema de estratificação de risco personalizado proposto por Grinfeld et al. Nesse modelo, é possível fornecer somente os dados disponíveis: em nosso trabalho não tínhamos informações disponíveis sobre o cariótipo e análise molecular de 12 genes (*SETBP1*, *GATA2*, *MLL3*, *GNB1*, *STAG2*, *MBD1*, *NF1*, *NFE2*, *GNAS*, *SH2B3*, *PPM1D* e *RB1*), por não fazerem parte de nosso painel customizado de NGS.

Primeiramente, avaliamos os 10 pacientes classificados pelo IPSS como Baixo Risco (Tabela 4.5) (Figura 4.9). Quando o prognóstico personalizado foi aplicado, foi possível observar que o grupo não era homogêneo, com sobrevida esperada variando de 7 até 22 anos. Nesse grupo, dois pacientes faleceram durante o tempo de acompanhamento, apresentando uma sobrevida observada de 29 e 24 meses, menor do que o estimado pelo modelo de prognóstico personalizado, que era de 14 e 7 anos respectivamente. A causa do óbito do paciente #21 foi choque séptico, enquanto o paciente #2 foi devido a uma infecção. Na análise do prognóstico preditivo, foi observado que pacientes com mais de uma mutação têm uma menor sobrevida e uma maior taxa de probabilidade de evolução, principalmente os que apresentam mutações em genes HMR (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2*).

**Tabela 4.5. Informações utilizadas para cálculo de prognóstico personalizado segundo Grinfeld et al, para pacientes classificados como risco baixo pelo IPSS**

ID	Idade	Gênero	Hemoglobina (g/l)	Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Trombose	Esplenomegalia	Mutação Driver	Mutações adicionais
18	45	M	196	16,1	435	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	
22	43	F	119	8,4	1012	NÃO	NÃO	CALR (p.L367fs*46)	TET2(p.Gln969Ter)
14	62	F	181	10,9	549	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	
13	56	M	126	10,7	745	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	
28	50	F	110	6,0	130	NÃO	SIM	CALR (p.L367fs*46)	
21	50	F	126	10,3	804	NÃO	NÃO	CALR (p.K385fs*47)	TP53(p.Arg273Cys) EZH2(p.Gly660Arg)
9	64	F	148	10,8	754	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	ASXL1(c.2134_2155del) PTPN11(p.Arg265Gln)
32	64	F	110	2,1	77	NÃO	SIM		IDH1(p.Ser210Asn)
2	61	M	128	12,1	109	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	ASXL1(p.Asp832fs) TET2(p.Cys1263Tyr +p.Ser1586Ter) CBL(p.Asp390Val) IDH1(p.Arg132His)

■ Vivo em MFP      —●— Óbito em MFP  
■ Óbito em LIMA pós MFP  
■ Óbito em MFP



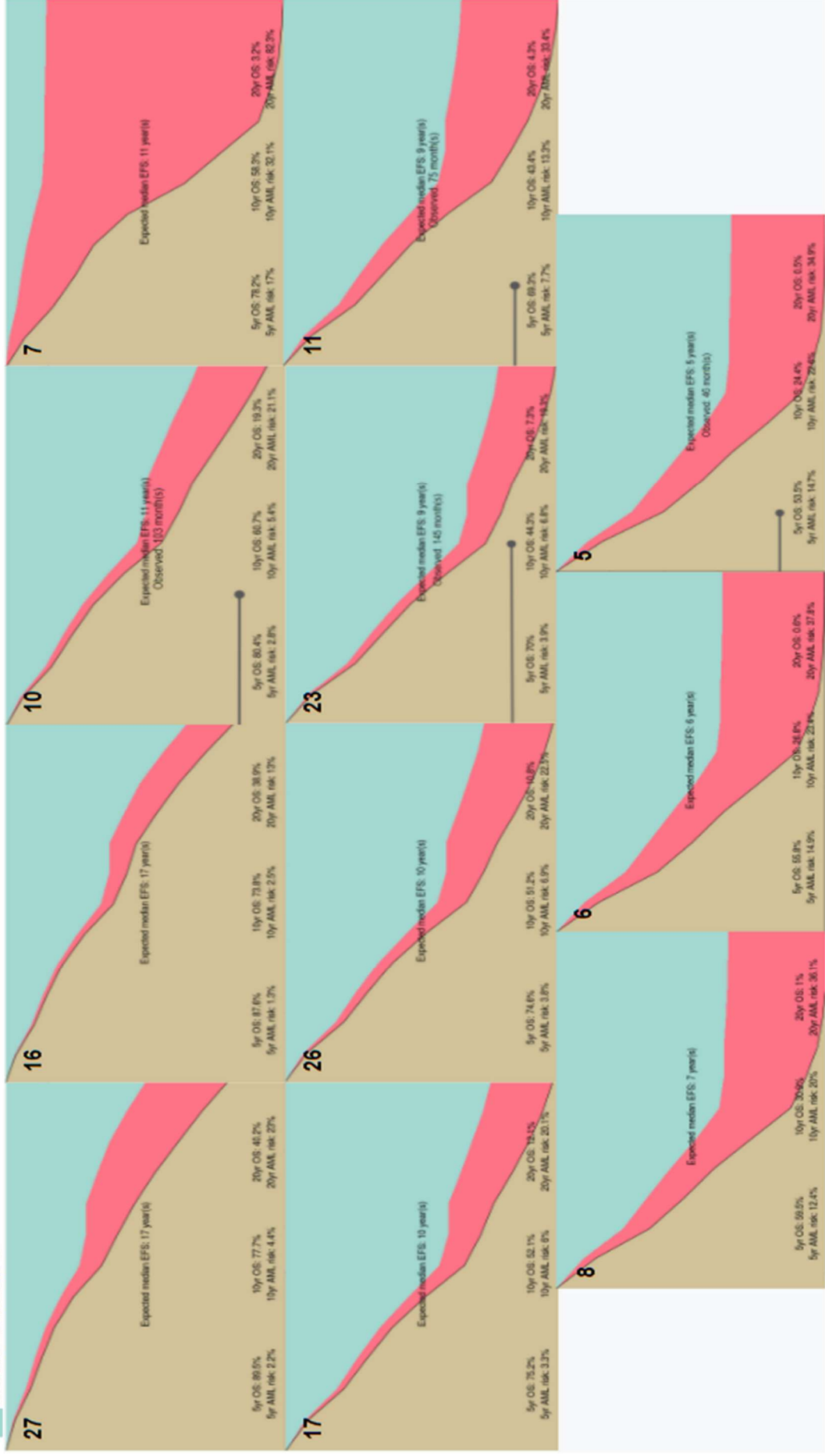
**Figura 4.9. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Baixo pelo IPSS.** A figura mostra os resultados do prognóstico personalizado utilizando a calculadora elaborada por Grinfeld et al de 9 pacientes estratificados na categoria de risco Baixo pelo IPSS. A cor marrom nos gráficos mostram a probabilidade do paciente estar vivo em MFP, a cor rosa a probabilidade de óbito em LMA após MFP e a cor azul a probabilidade de óbito em MFP. A linha preta representa a sobrevida observada em pacientes que foram a óbito durante o acompanhamento, o círculo ao final da linha preenchida com a cor preta representa óbito em MFP.

A seguir, foram analisados os 11 pacientes classificados no grupo de risco Intermediário 1 segundo IPSS (Tabela 4.6) (Figura 4.10). A sobrevida prevista pelo modelo de prognóstico personalizado variou de 5 até 17 anos. Durante o acompanhamento, 4 pacientes faleceram e tiveram uma sobrevida observada de 46, 75, 103 e 145 meses. O paciente #5, que apresentou menor sobrevida esperada e observada, era portador de mutações em dois genes HMR (*ASXL1* e *EZH2*). Nesse grupo, o paciente #7, com 42 anos ao diagnóstico e portador de mutações em *JAK2*, *TP53* e *RUNX1* apresentou o maior risco de evolução para LMA: 32% em 10 anos.

**Tabela 4.6. Info Informações utilizadas para cálculo de prognóstico personalizado segundo Grinfeld et al, para pacientes classificados como risco intermediário 1 pelo IPSS**

ID	Idade	Gênero	Hemoglobina (g/l)	Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Trombose	Esplenomegalia	Mutação Driver	Mutações adicionais
27	53	F	106	4,77	430	NÃO	NÃO	CALR (p.L367fs*46)	
16	63	M	194	13,5	1096	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	
10	56	M	120	47,84	1332	SIM	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	ASXL1(p.G646fs*12)
7	42	F	160	20,3	105	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TP53(p.Pro190fs) RUNX1(p.Gly135Asp)
17	67	F	127	17,2	435	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	
26	60	F	107	8,4	184	NÃO	SIM	CALR (p.K385fs*47)	
23	56	M	110	11,8	329	SIM	SIM	CALR (p.L367fs*46)	ASXL1 (p.Trp796fs + p.Arg693TeR)
11	65	F	117	28,0	391	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TET2(c.3954+1G>A (Chromosome 4))
8	73	F	130	14,1	382	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TET2(p.Ser231fs) KIT(p.Asp816Asn)
6	70	M	146	15,8	485	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TP53(p.Gly245Asp)
5	55	M	100	5,01	112	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	ASXL1(p.Tyr591fs) EZH2(p.Arg690His)

Vivo em MFP  
 Óbito em LMA pós MFP  
 Óbito em MFP





**Figura 4.10. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Intermediário 1 pelo IPSS.**

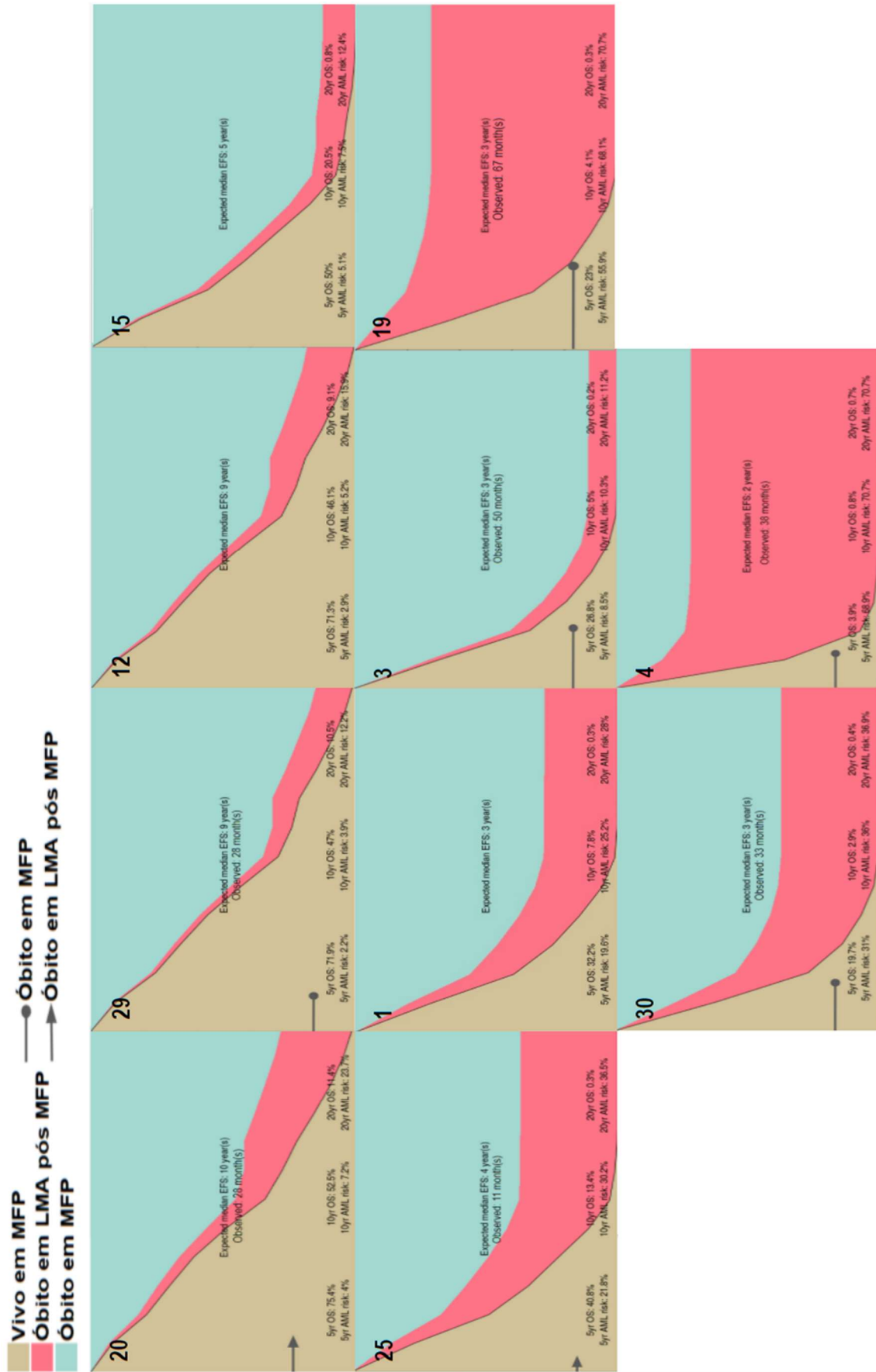
A figura mostra os resultados do prognóstico personalizado utilizando a calculadora elaborada por Grinfeld et al. de 11 pacientes estratificados na categoria de risco Intermediário 1 pelo IPSS. A cor marrom nos gráficos mostram a probabilidade do paciente estar vivo em MFP, a cor rosa a probabilidade de óbito em LMA após MFP e a cor azul a probabilidade de óbito em MFP. A linha preta representa a sobrevida observada em pacientes que foram a óbito durante o acompanhamento, o círculo ao final da linha preenchida com a cor preta representa óbito em MFP.

Na série deste estudo, 10 pacientes foram classificados na categoria de risco Intermediário 2, segundo IPSS (Tabela 4.7). Quando o sistema personalizado foi aplicado, foi possível visualizar que a sobrevida esperada variou de 2 até 10 anos (Figura 4.11). Durante o acompanhamento, 7 pacientes nesse grupo foram a óbito, com sobrevida observada variando entre 11 e 67 meses. Dentre esses, dois pacientes faleceram após transformação leucêmica (#20 e #25), com as sobrevidas observadas mais baixas dentre o grupo, de 11 e 28 meses. No entanto, esses dois pacientes não estavam entre os que apresentavam os maiores riscos de transformação para LMA, segundo o modelo de prognóstico personalizado. Nesse grupo, os pacientes #19, #30 e #4 apresentaram maior risco de evolução: respectivamente 68,1%, 36% e 70,7% em 10 anos.

Apesar de ambos os pacientes terem evoluído tão rápido, o prognóstico personalizado indicava pouca chance de evolução para LMA. Essa evolução tão rápida pode ser explicada pela porcentagem de blastos que ambos os pacientes tinham ao diagnóstico, o paciente 20 tinha 6% de blastos enquanto o paciente 25 tinha 12%. Na análise para cálculo do prognóstico personalizado, essa informação não é levada em conta, provavelmente por esse motivo que o programa não foi capaz de prever de forma fidedigna a chance de evolução desses pacientes.

**Tabela 4.7. Informações utilizadas para cálculo de prognóstico personalizado segundo Grinfeld et al, para pacientes classificados como risco intermediário 2 pelo IPSS**

ID	Idade	Gênero	Hemoglobina (g/l)	Leucócitos (x10 <sup>9</sup> /l)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	Trombose	Esplenomegalia	Mutação Driver	Mutações adicionais
20	49	F	70	3,8	237	NÃO	SIM	CALR (p.L367fs*46)	ASXL1(p.G646fs*12)EZH2(p.Asn673Ser+p.Cys468Ser) PTPN11(p.Asn308Asp) IDH1(p.Arg132Cys)
29	70	M	92	12,5	1435	NÃO	NÃO	CALR (p.L367fs*46)	
12	65	M	86	21,7	1222	NÃO	NÃO	JAK2 (p.Val617Phe)	
15	68	M	68	6,4	131	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	
25	65	M	91	8,2	236	NÃO	SIM	CALR (p.K385fs*47)	TP53(p.Trp146Ter)
1	64	M	40	6,6	147	SIM	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	ASXL1(p.G646fs*12) EZH2(p.Ile650Thr) U2AF1(p.Gln157Pro) ZRSR2(splice_acceptor_variant(chrX:15826354_A/G)) KRAS(p.Gly12Ser) PTPN11(p.Gln79Arg)
3	77	M	95	13,3	485	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TET2(p.Gly1391Asp) SF3B1(p.Lys666Asn) CBL(p.Ala757fs) CUX(splicesite_3 (chr7:101833152))
19	48	M	79	2,2	314	NÃO	SIM	CALR (p.K385fs*47)	ASXL1(p.G646fs*12) TET2(p.Gly898Ter) TP53(p.Pro152fs*18) EZH2(p.Arg684Cys)
30	75	M	72	3,9	107	NÃO	SIM	MPL (p.Trp515Leu)	U2AF1(p.Gln157Pro)
4	69	M	97	7,6	222	NÃO	SIM	JAK2 (p.Val617Phe)	TET2(p.Arg1216Ter) DNMT3A(p.Tyr735Ser) KIT(p.Leu682fs)



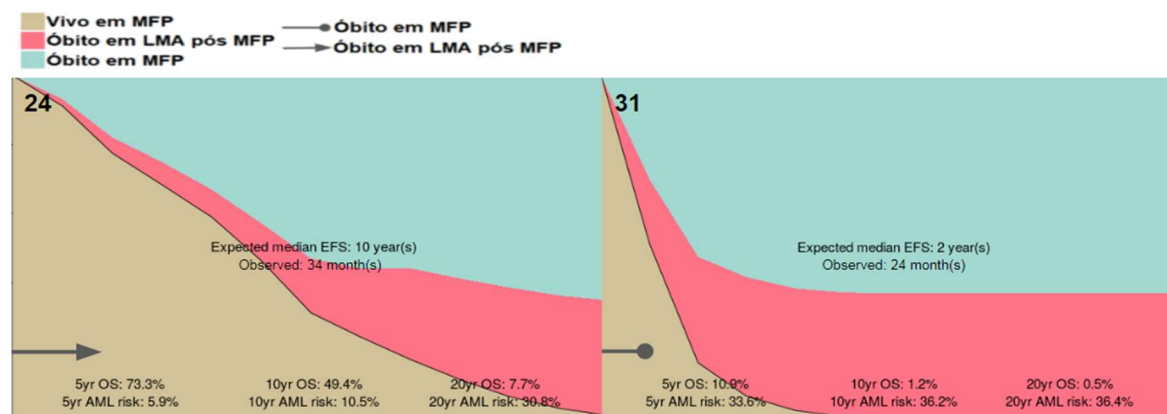
**Figura 4.11. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Intermediário 2 pelo IPSS.**

A figura mostra os resultados do prognóstico personalizado utilizando a calculadora elaborada por Grinfeld et al. de 10 pacientes estratificados na categoria de risco Intermediário pelo IPSS. A cor marrom nos gráficos mostram a probabilidade do paciente estar vivo em MFP, a cor rosa a probabilidade de óbito em LMA após MFP e a cor azul a probabilidade de óbito em MFP. A linha preta representa a sobrevida destes pacientes, o círculo ao final da linha preenchida com a cor preta representa óbito em MFP e a seta representa óbito após evolução para LMA.

Dois pacientes da série estudada de MFP foram estratificados como Alto Risco pelo IPSS (Tabela 4.8) (Figura 4.12). Quando avaliados pelo modelo preditivo de Grinfeld, as sobrevidas esperadas foram de 10 e 2 anos. Ambos pacientes foram a óbito durante o acompanhamento, o paciente #24 evoluiu para LMA em 32 meses após diagnóstico e faleceu 2 meses depois.

**Tabela 4.8. Informações utilizadas para cálculo de prognóstico personalizado segundo Grinfeld et al, para pacientes classificados como risco alto pelo IPSS**

ID	Idade	Gênero	Hemoglobina (g/l)	Leucócitos ( $\times 10^9/l$ )	Plaquetas ( $\times 10^9/l$ )	Trombose	Esplenomegalia	Mutação Driver	Mutações adicionais
24	59	F	93	43,4	880	NÃO	NÃO	CALR (p.L367fs*46)	ASXL1 (p.Arg693ter)
31	70	M	78	57,6	79	NÃO	SIM		TET2(p.Cys1271fs)+R UNX1(p.Arg201Ter)



**Figura 4.12. Prognóstico personalizado calculado segundo Grinfeld et al. para os pacientes com mielofibrose primária (MFP) classificados na categoria de risco Alto pelo IPSS.**

A figura mostra os resultados do prognóstico personalizado utilizando a calculadora elaborada por Grinfeld et al. de dois pacientes estratificados na categoria de risco Alto pelo IPSS. A cor marrom nos gráficos mostram a probabilidade do paciente estar vivo em MFP, a cor rosa a probabilidade de óbito em LMA

após MFP e a cor azul a probabilidade de óbito em MFP. A linha preta representa a sobrevida destes pacientes, o círculo ao final da linha preenchida com a cor preta representa óbito em MFP e a seta representa óbito após evolução para LMA.

No total, 15 pacientes da série de pacientes do estudo de MFP foram a óbito durante o tempo de acompanhamento: 2/10 do grupo de risco baixo, 4/11 do grupo Intermediário I, 7/10 do grupo Intermediário 2 e 2/2 do grupo de risco alto.

## 5. DISCUSSÃO

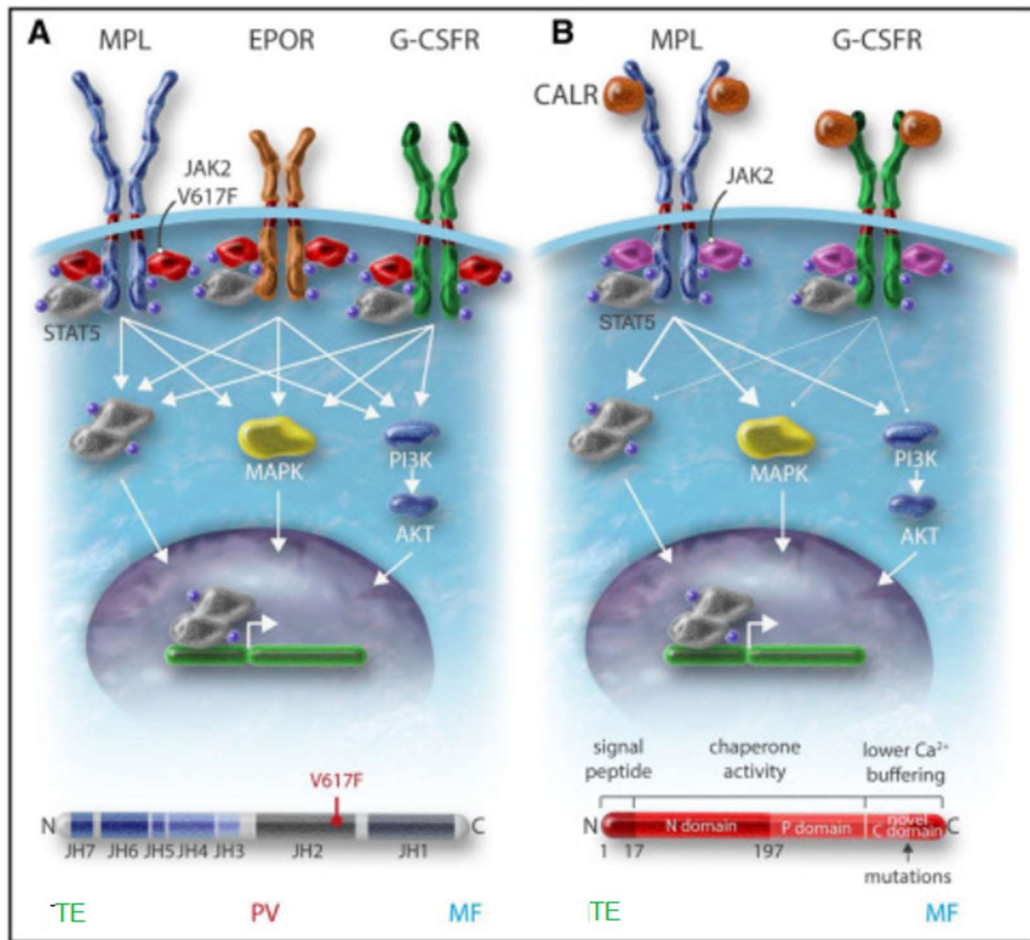
Atualmente, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares das NMPs, em especial da MFP, avançou e vários aspectos da fisiopatologia dessa doença começam a ser esclarecidos. Além disso, vários estudos demonstraram o impacto prognóstico de diferentes mutações e novos sistemas de prognóstico propostos buscam incorporar informação genômica no sentido de refinar a estratificação de risco dos pacientes com MFP. Considerando que o único tratamento com potencial de cura ainda é o Alo-TCTH, procedimento relacionado a uma alta taxa de mortalidade e para o qual somente um grupo pequeno de pacientes é elegível, é interessante aplicar modelos que contribuam para individualização terapêutica. O modelo proposto por Grinfeld et al. além de se basear em características clínico-laboratoriais já utilizadas em sistemas anteriores, integra também variáveis referentes ao perfil genômico para avaliar o prognóstico dos pacientes. Além de estimar a sobrevida global desses pacientes, este modelo também é capaz de estimar a sobrevida livre de eventos e o risco de transformação em leucemia aguda. No artigo que este modelo foi proposto, os autores chamam atenção para a importância do uso de coortes adicionais de pacientes com NMP para validação adicional desse modelo.

Em nosso laboratório, foi estudada uma série de 32 pacientes diagnosticados com MFP. Nossa serie de pacientes apresentou uma idade mediana ao diagnóstico de 62,5 anos com predomínio do sexo masculino (56,25%), enquanto as populações reportadas em outros estudos apresentavam uma mediana de idade de 64-65 anos e a percentagem do sexo masculino variando de 60,5% a 62% (CERVANTES F, DUPRIEZ B, PEREIRA A, et al., 2009;TEFFERI A, LASHO TL, JIMMAT, et al., 2012).

Em relação às mutações drivers, a maioria dos pacientes era portador da mutação *JAK2*V617F, seguido pela mutação *CALR* sendo 21,9% do tipo 1 e 12,5% do tipo 2, somente um paciente apresentou a mutação *MPL*W515 (3,1%) e 6,3% foi TN. Este perfil de distribuição de mutações drivers está de acordo com estudos apresentados na literatura, inclusive de pacientes brasileiros (SOUZA MC, RODRIGUES CA, SILVA MR, et al., 2013; NONINO A, CAMPREGHER PV, DE SOUZA SANTOS FP, et al., 2020). A série de pacientes apresenta uma porcentagem atípica de triplo negativos, mas isso pode ser justificado devido ao n amostral baixo.

Em relação à idade, pacientes portadores da mutação *JAK2* V617F eram mais velhos do que pacientes portadores de *CALR* indel, apresentaram maior contagem de leucócitos e maiores níveis de hemoglobina. Em grandes coortes internacionais, como a coorte italiana de 617 pacientes (RUMI E, PIETRA D, PASCUTTO C, et al. 2014) e a coorte da Mayo Clinic (TEFFERI A, LASHO T., FINKE CM et al, 2016), também foram observadas essas mesmas diferenças, entretanto nessas coortes maiores também foi possível observar que pacientes com mutação em *CALR* apresentavam uma contagem de plaquetas maior em relação aos pacientes com mutação em *JAK2*. Em 2014 Tefferi et. al, associou pacientes com mutação em *CALR* são com a idade mais jovem e melhor prognóstico (TEFFERI A., LASHO TL., FINKE CM., et al. 2014). Em um estudo brasileiro, os pacientes com mutações em *CALR* foram associadas a contagens de plaquetas mais altas e níveis de hemoglobina mais baixos (MONTE-MOR BDA C, AYRES-SILVA JDE P, CORREIA WD, et al., 2016).

Existe uma explicação fisiopatológica do por quê pacientes com mutação em *CALR* apresentam menor nível de hemoglobina. A mutação em *JAK2* é capaz de ativar constitutivamente três receptores: *MPL*, *EPOR* e *G-CSFR*, enquanto a mutação em *CALR* ativa constitutivamente o receptor *MPL* e em um nível mais baixo o receptor *G-CSFR* mas não é capaz de ativar o receptor para EPO (*EPOR*)(Figura 5.1). Essa diferença se reflete no aumento da série vermelha, como o nível de hemoglobina.



**Figura 5.1. Os receptores de citocinas e mecanismos patogênicos subjacentes à mutação *JAK2V617F* e inserções e deleções em *CALR*.** (A) A mutação *JAK2V617F* ativa a sinalização através dos três principais receptores homodiméricos EPOR, MPL e G-CSFR, que estão envolvidos na eritrocitose, trombocitose e neutrofilia, respectivamente. (B) Os mutantes *CALR* ativam principalmente o receptor MPL e em um nível baixo o G-CSFR. Fonte: Adaptado de ( Vainchenker and Kralovics, 2017)

Com relação às mutações adicionais, em nosso trabalho foram avaliadas por um painel customizado de NGS, baseado na tecnologia IonTorrent. A análise dos dados, principalmente a análise de SNVs, foi feita por meio de dois pipelines, que tiveram sobreposição na identificação da maior parte das mutações descritas. Novas variantes potencialmente patogênicas foram identificadas e inclusive algumas foram validadas em nosso laboratório por sequenciamento direto.

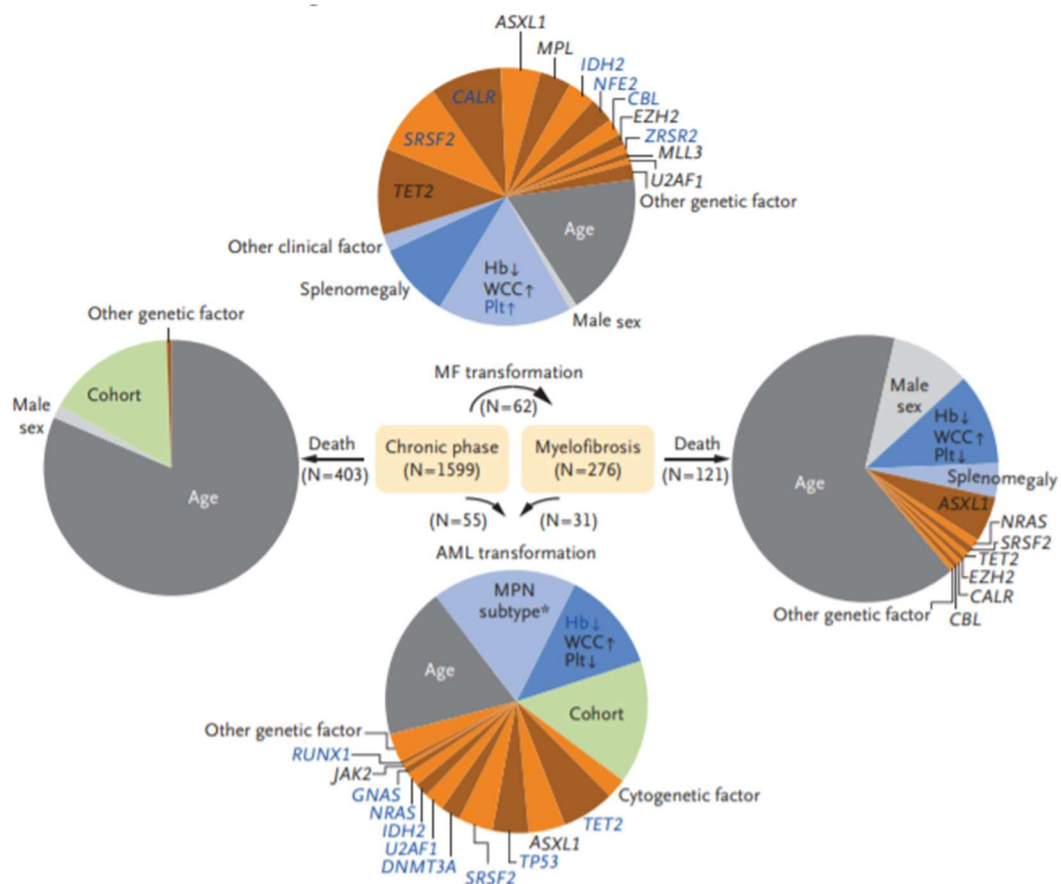
Todos os pacientes da série apresentaram pelo menos uma mutação, inclusive os dois pacientes que não apresentaram os marcadores moleculares de diagnóstico *JAK2*, *CALR* ou *MPL*. Através de análise estatísticas, foi possível identificar diferenças entre grupos de pacientes que foram agrupados pelo número de

mutações e o grupo de pacientes com mais do que 4 mutações apresentou pior sobrevida. Em um estudo com 797 pacientes, Guglielmelli et al. demonstraram que a presença de duas ou mais mutações foi associada a pior sobrevida e também à redução da sobrevida livre de leucemia (GUGLIELMELLI P, LASHO TL, ROTUNNO G, et al. 2014).

*ASXL1* foi o gene mais frequentemente mutado na série, ocorrendo em 33,3% dos pacientes. Este gene está associado à regulação epigenética e estudos prévios mostraram uma porcentagem similar de mutações em pacientes com MFP (VANNUCCHI AM, LASHO TL, GUGLIELMELLI P, et al. 2013). Em todas as neoplasias mieloides, mutações em *ASXL1* são associadas a pior prognóstico e especialmente na MFP (TEFFERI A, GUGLIELMELLI P, LARSON DR, et al., 2014). Em nosso estudo, talvez devido ao número reduzido de casos, não houve diferença significativa na sobrevida entre pacientes portadores de mutações nesse gene e pacientes WT.

Primeiramente, a série de pacientes foi estratificada pelo IPSS e posteriormente os grupos foram analisados pelo modelo prognóstico estabelecido por Grinfeld et al. Foi interessante observar que, dentro os pacientes com baixo risco, aqueles com mais de uma mutação apresentaram uma menor sobrevida esperada e uma maior taxa de probabilidade de evolução, principalmente os que apresentaram mutações em genes do tipo HMR (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* e *IDH1/2*). No artigo que esse modelo foi proposto, nos pacientes com MFP dentre os fatores que contribuem para a progressão para LMA está a presença de mutações, principalmente os genes *TET2*, *ASXL1*, *TP53* e *SRSF2* (Figura 5.1).

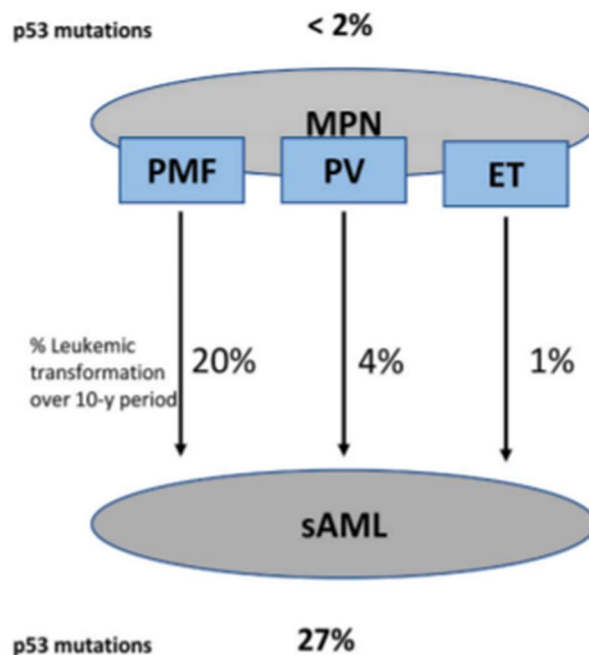




**Figura 5.2. Modelagem do desfecho de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs) segundo Grinfeld e colaboradores.** Na figura os pacientes com NMPs estão representados em fase crônica (FC) (trombocitemia essencial ou policitemia vera) ou com mielofibrose (MF) e os desfechos analisados foram morte em FC, transformação para MF, morte em MF ou transformação para leucemia mieloide aguda. Cada gráfico de pizza apresenta as diferentes variáveis clínicas, demográficas, laboratoriais ou genômicas que mais contribuíram para prever o risco de cada desfecho. Todas essas variáveis foram integradas em um modelo único de predição de risco individualizado para pacientes com NMP. Fonte: (Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ. et al, 2018).

De forma similar, dentre os 11 pacientes classificados no grupo de risco Intermediário 1 segundo IPSS, o paciente que apresentou menor sobrevida esperada e observada era portador de mutações em dois genes HMR (*ASXL1* e *EZH2*), além de ter mutação em *JAK2*. Já o paciente (#7) que apresentou maior risco de evolução para LMA apresentou mutações em *TP53* e *RUNX1*, além de ser *JAK2+*. O gene *TP53* é conhecido pelo mau prognóstico em diversos cânceres, e especialmente em NMPs a frequência de mutações encontradas é relativamente baixa, cerca de menos de 2%. Apesar disso, quando pacientes com LMA secundária pós NMPs são avaliados, é possível ver que há um aumento dessa frequência chegando a 27% (GOYAL et al., 2020)(Figura 5.3). E em pacientes com SMD, é

proposto que *RUNX1* mutado leva à transformação leucêmica (NIIMI H, HARADA H, HARADA Y, Ding Y, et al., 2006; ISMAEL O, SHIMADA A, HAMA A, et al., 2012). Esse paciente tinha 42 anos até o final do acompanhamento então era considerado jovem, ele poderia ser beneficiado da individualização terapêutica porque apesar dele ter sido classificado pelo IPSS intermediário 1, a taxa de risco de transformação era alta chegando a 32% em 10 anos, dessa forma ele poderia ser um bom candidato para transplante.



**Figura 5.3. Mutações em TP53 e a transformação leucêmica a partir de neoplasias mieloproliferativas (NMPs).** Menos de 2% dos pacientes com NMPs apresentam mutações no gene *TP53*. Entretanto, pacientes com LMA secundária a NMPs apresentam uma taxa bem maior, chegando a 27%. A freqüência com que ocorre transformação leucemia é de 20% a partir de mielofibrose primária (MFP), 4% a partir de policitemia vera (PV) e 1% a partir de trombocitemia essencial (TE). Fonte: (Goyal et al., 2020).

Dentre os 10 pacientes que foram classificados na categoria de risco Intermediário 2, segundo IPSS, 7 pacientes foram a óbito durante o acompanhamento, sendo que dois pacientes faleceram após evolução para LMA. Apesar de ambos os pacientes terem evoluído rapidamente, o prognóstico personalizado não indicava risco alto de evolução para LMA. Uma observação que fizemos com relação a estes pacientes foi que ambos apresentaram blastos ao diagnóstico, 6% e 12%, porém essa variável não está incluída como um dos fatores

para cálculo do prognóstico personalizado. Os três pacientes com maior risco de transformação leucêmica apresentaram também a menor sobrevida esperada e foram a óbito antes. Nesses casos, o alto risco calculado pelo sistema de Grinfeld poderia ser explicado pela presença de mutações em *ASXL1*, *TET2*, *TP53* e *EZH2* no paciente #19; a presença de mutações em *TET2*, *DNMT3A* e *KIT* no paciente #4; e no paciente #30, pela presença de mutação em *U2AF1* e nível baixo de plaquetas ( $107 \times 10^9/L$ ).

Somente dois pacientes foram estratificados como Risco alto pelo IPSS e foram a óbito durante o acompanhamento, tendo um paciente evoluído para LMA. O paciente que progrediu para LMA, apresentava 1% de blasto ao diagnóstico além de possuir mutação em *ASXL1*.

Assim, nossos dados em uma série de pacientes de MFP de "mundo real" corroboram a ideia de que a determinação do perfil genômico dos pacientes e a identificação de mutações somáticas adicionais às mutações drivers poderia contribuir para avaliação personalizada de prognóstico e eventualmente, para individualização terapêutica. A identificação de pacientes de baixo risco/risco intermediário 1 IPSS e/ou de pacientes jovens, mas portadores de mutações do tipo HMR, ou portadores de mais de duas mutações pode abrir possibilidades para o tratamento da doença.

## **6. CONCLUSÕES**

Neste trabalho, analisamos dados clínicos, laboratoriais e genômicos de uma série de 32 pacientes com MFP no Rio de Janeiro. Pudemos analisar o impacto das mutações drivers nos parâmetros hematológicos dos pacientes. Também foi possível verificar o impacto do número de mutações nos pacientes. Aplicamos o modelo de prognóstico de Grinfeld et al. nos pacientes com MFP, ressaltando a heterogeneidade na sobrevida predita encontradas nos grupos estratificados por IPSS corroborando a ideia da necessidade do perfil genômico dos pacientes e a identificação de mutações somáticas adicionais para ser possível uma avaliação personalizada de prognóstico e eventualmente, individualização terapêutica. Principalmente, em pacientes classificados como de baixo risco/risco intermediário 1 pelo IPSS e/ou de pacientes jovens, mas portadores de mutações HMR, ou portadores de mais de duas mutações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL, Tefferi A. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1200-2.

Alvarez Argote J, Dasanu CA. ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Curr Med Res Opin*. 2018 May;34(5):757-763.

Aly M, Ramdzan ZM, Nagata Y, Balasubramanian SK, Hosono N, Makishima H, Visconte V, Kuzmanovic T, Adema V, Nazha A, Przychodzen BP, Kerr CM, Sekeres MA, Abazeed ME, Nepveu A, Maciejewski JP. Distinct clinical and biological implications of *CUX1* in myeloid neoplasms. *Blood Adv*. 2019 Jul 23;3(14):2164-2178. doi: 10.1182/bloodadvances.2018028423. PMID: 31320321; PMCID: PMC6650742.

Angona A, Fernandez-Rodriguez C, Alvarez-Larran A, Camacho L, Longaron R, Torres E, Pairet S, Besses C, Bellosillo B. Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. *Blood Cancer J* 2016; 6(8):e463; PMID:27564461; <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2016.75>

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27069254.

Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB: Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 276: 32282-32287, 2001.

Basquiera AL, Soria NW, Ryser R, Salguero M, Moiraghi B, Sackmann F, Sturich AG, Borello A, Berretta A, Bonafé M, Barral JM, Palazzo ED, García JJ. Clinical significance of V617F mutation of the JAK2 gene in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Hematology*. 2009 Dec;14(6):323-30. doi: 10.1179/102453309X12473408860226

Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141-149.

Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, Marzac C, Le Couediec JP, Droin N, Chachoua I, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative essential thrombocythemia patients. *Blood* 2016; 127(3):333-42; PMID:26450985; [http://dx. doi.org/10.1182/blood-2015-07-661983](http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-07-661983)

Cadioux C, Fournier S, Peterson AC, Bedard C, Bedell BJ, Nepveu A. Transgenic mice expressing the p75 CCAAT-displacement protein/Cut homeobox  $\gamma$  isoform develop a myeloproliferative disease-like myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2006;66(19):9492-9501.

Cairolì R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3463-8. doi: 10.1182/blood-2005-09-3640. Epub 2005 Dec 29. PMID: 16384925.

Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, Marburger TB, Wen J, Perrotti D, Bloomfield CD, Whitman SP. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1022-4. doi: 10.1182/blood-2006-12-061176.

Cao Q, Gearhart MD, Gery S, et al. BCOR regulates myeloid cell proliferation and differentiation. *Leukemia*. 2016;30(5):1155-1165.

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;113:2895-901

Chaligné R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(10):3735-3743.

Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, Kiladjian JJ, Socie G, Bordessoule D, Le Bousse-Kerdiles MC, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008; 22(8):1557-66.

Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa JP, Godley LA, Li W, Goodell MA. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):23-31.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. F.. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo , v. 32, n. 4, p. 308-316, 2010 .

Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau JL, Issa JP, Hermouet S. JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2. *Leukemia* 2010; 24 (5):1069-73; PMID:20182460;

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372-5.

Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, Della Valle V, Couronné L, Scourzic L, Chesnais V, Guerci-Bresler A, Slama B, Beyne-Rauzy O, Schmidt-Tanguy A, Stamatoullas-Bastard A, Dreyfus F et al,

Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119: 3211-3218.

Damnernsawad A, Kong G, Wen Z, Liu Y, Rajagopalan A, You X, Wang J, Zhou Y, Ranheim EA, Luo HR, Chang Q, Zhang J. Kras is Required for Adult Hematopoiesis. *Stem Cells*. 2016 Jul;34(7):1859-71. doi: 10.1002/stem.2355. Epub 2016 Mar 28. PMID: 26972179; PMCID: PMC5358545.

Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, James W. Vardiman; The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391–2405.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguíé F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 May 28;360(22):2289-301.

Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4198-200.

Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, Sekeres MA, Wang XF, McDevitt MA, Maciejewski JP. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10349-57.

Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boulwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone

methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):722-6.

Fennell KA, Bell CC, Dawson MA. Epigenetic therapies in acute myeloid leukemia: where to from here? *Blood.* 2019 Nov 28;134(22):1891-1901.

Fisher CL, Berger J, Randazzo F, Brock HW. A human homolog of *Additional sex combs*, *ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1*, maps to chromosome 20q11. *Gene.* 2003;306:115–126.

Gan L, Yang Y, Li Q, Feng Y, Liu T, Guo W. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res.* 2018 Mar 9;6:10.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009 Jun;145(6):788-800.

Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487.

Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, Kreil S, Jones A, Score J, Metzgeroth G, Oscier D, Hall A, Brandts C, Serve H, Reiter A, Chase AJ, Cross NC. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009 Jun 11;113(24):6182-92.

Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2017;102(1):7-17. 7



Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010;207(2):339-44.

Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011;118(23):6153-6163.

Göllner S, Oellerich T, Agrawal-Singh S, Schenk T, Klein HU, Rohde C, Pabst C, Sauer T, Lerdrup M, Tavor S, Stölzel F, Herold S, Ehninger G, Köhler G, Pan KT, Urlaub H, Serve H, Dugas M, Spiekermann K, Vick B, Jeremias I, Berdel WE, Hansen K, Zelent A, Wickenhauser C, Müller LP, Thiede C, Müller-Tidow C. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2017 Jan;23(1):69-78.

Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, Longtine JA, Sabath D, Wang YL. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2013; 15(6):733-44; PMID:23978506;

Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, Fanelli T, Ernst T, Winkelmann N, Jones AV, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Villani L, Bosi A, Barosi G, Cross NC, Vannucchi AM. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5227-34.

Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, Pacilli A, Pardanani A, Rumi E, Rosti V, Hanson CA, Mannelli F, Ketterling RP, Gangat N, Rambaldi A, Passamonti F, Barosi G, Barbui T, Cazzola M, Vannucchi AM, Tefferi A. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018 Feb 1;36(4):310-318.

Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, Biamonte F, Pardanani A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Fanelli T, Pietra D, Rumi E, Finke C, Gangat N, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, Bosi A, Pereira A, Manfredini R, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Vannucchi AM, Tefferi A. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1804-10.

Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM; GIMEMA--Italian Registry of Myelofibrosis; MPD Research Consortium. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol*. 2007 May;137(3):244-7.

Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med*. 2011 Feb 3;364(5):488-90.

Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, Cervantes F, Jones MM, Sun K, McQuitty M, Stalbovskaya V, Gopalakrishna P, Barbui T. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. 2016 Aug;30(8):1701-7.

Hinds DA, Barnholt KE, Mesa RA, et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;128(8):1121-1128.

Ismael O, Shimada A, Hama A, Elshazley M, Muramatsu H, Goto A, Sakaguchi H, Tanaka M, Takahashi Y, Yinyan X, Fukuda M, Miyajima Y, Yamashita Y, Horibe K, Hanada R, Ito M, Kojima S. De novo childhood myelodysplastic/myeloproliferative disease with unique molecular characteristics. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(1):129-37.

Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):497-506.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2488-98.

James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.

Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*. 1997 Oct 1;11(19):2468-81. Erratum in: *Genes Dev* 1997 Dec 1;11(23):3277. PMID: 9334313; PMCID: PMC316567.

Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagiński K, Milanesi C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90.

Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30(3):229-236.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.

Kuchenbauer F, Feuring-Buske M, Buske C. AML1-ETO needs a partner: new insights into the pathogenesis of t(8;21) leukemia. *Cell Cycle*. 2005 Dec;4(12):1716-8.

Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1652-60.

Latchney, S.E.; Calvi, L.M. The aging hematopoietic stem cell niche: Phenotypic and functional changes and mechanisms that contribute to hematopoietic aging. *Semin. Hematol*. 2017, 54, 25–32.

Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Jimma T, Knudson RA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia*. 2012 May;26(5):1135-7.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-97.

Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandath C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010 Dec 16;363(25):2424-33.

Li Y, Hetet G, Maurer A-M, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br J Haematol* 1994; 87: 471–76

Lower KM, Turner G, Kerr BA, Mathews KD, Shaw MA, Gedeon AK et al. Mutations in PHF6 are associated with Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome. *Nat Genet* 2002; 32: 661–665.

Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, Girsberger S, Lehmann T, Passweg J, Stern M, Beisel C, Kralovics R, Skoda RC. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014 Apr 3;123(14):2220-8.

Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:169-77.

McKerrell T, Park N, Moreno T, et al; Understanding Society Scientific Group. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hematopoiesis. *Cell Reports*. 2015;10(8):1239-1245.

McNerney ME, Brown CD, Wang X, et al. CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(6):975-983.

Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, Bagienski K, Kubesova B, Pietra D, Gisslinger B, et al. Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016; 127(3):325-32.

Monte-Mor Bda C, Ayres-Silva Jde P, Correia WD, Coelho AC, Solza C, Daumas AH, Bonamino MH, Santos FP, Datoguia TS, Pereira Wde O, Lisboa BC, Ramos CF, Machado-Neto JA, Hamerschlak N, Campregher PV, Traina F, Pagnano KB, Zalberg I. Clinical features of JAK2V617F- or CALR-mutated essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2016 Sep;60:74-7.

Nahi H, Selivanova G, Lehmann S, Möllgård L, Bengtzen S, Concha H, Svensson A, Wiman KG, Merup M, Paul C. Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia. *Br J Haematol*. 2008 May;141(4):445-53.

Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, Bunda S, Finklestein JZ, Gorr TA, Mehta P, Schmid I, Kropshofer G, Corbacioglu S, Lang PJ, Klein C, Schlegel PG, Heinzmann A, Schneider M, Starý J, van den Heuvel-Eibrink MM, Hasle H, Locatelli F, Sakai D, Archambeault S, Chen L, Russell RC, Sybingco SS, Ohh M, Braun BS, Flotho C, Loh ML. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2010 Sep;42(9):794-800.

Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*. 2006 Apr;20(4):635-44.

Nonino A, Campregher PV, de Souza Santos FP, Mazzeu JF, Pereira RW. Genomic characterization and prognostication applied to a Brazilian cohort of patients with myelofibrosis. *Int J Hematol*. 2020 Sep;112(3):361-368.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [abstract]. *Science*. 1960;132(3438):1497.

Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K and Ito Y. (1999). *Blood*, 93, 1817–1824.

Pandey R, Saxena M, Kapur R. Role of SHP2 in hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2017 Jul;24(4):307-313.

Pérez B, Mechinaud F, Galambrun C, Ben Romdhane N, Isidor B, Philip N, Derain-Court J, Cassinat B, Lachenaud J, Kaltenbach S, Salmon A, Désirée C, Pereira S, Menot ML, Royer N, Fenneteau O, Baruchel A, Chomienne C, Verloes A, Cavé H. Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with

predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. *J Med Genet.* 2010 Oct;47(10):686-91.

Pant V, Quintás-Cardama A, Lozano G. The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans. *Blood.* 2012 Dec 20;120(26):5118-27.

Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2006 Aug 20;24(24):3904-11.

Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, Guglielmelli P, Pungolino E, Caramella M, Maffioli M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M, Tefferi A. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010 Mar 4;115(9):1703-8.

Pietra, D., Rumi, E., Ferretti, V. *et al.* Differential clinical effects of different mutation subtypes in *CALR*-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 30, 431–438 (2016).

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006;3(7):e270.

Peter C. Nowell, David A. Hungerford, Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 25, Issue 1, July 1960, Pages 85–109

Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 1974 Jun 13;290(24):1382.

Puda A, Milosevic JD, Berg T, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, Rumi E, Pietra D, Malcovati L, Elena C, et al. 2012. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. *Am J Hematol* 87: 245–250.

Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, Colomer D, Pieri L, Pratcorona M, Rotunno G, Sant'Antonio E, Bellini M, Cavalloni C, Mannarelli C, Milanesi C, Boveri E, Ferretti V, Astori C, Rosti V, Cervantes F, Barosi G, Vannucchi AM, Cazzola M; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014 Aug 14;124(7):1062-9.

Ryan PE, Davies GC, Nau MM, Lipkowitz S. Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci*. 2006 Feb;31(2):79-88.

Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MHH, Grundler R, Rensinghoff M, Thiessen C, Tickenbrock L, Schwäble J, Brandts C, August B, Koschmieder S, Bandi SR, Duyster J, Berdel WE, Müller-Tidow C, Dikic I, Serve H. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1004-12.

Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1459-77.

Schafer KA: The cell cycle: a review. *Vet Path* 35: 461-478, 1998.

Schieber M, Crispino JD, Stein B. Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. *Blood Cancer J*. 2019 Sep 11;9(9):74.

Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, B€urkle D, Dengler R, Distelrath A, Eckart M, Eckert R, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPL W515 mutations and essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Haematologica* 2009; 94(1):141-4;



Schnittger S, Bacher U, Kern W, Schr€. oder M., Haferlach T, Schoch C. Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leukemia* 2006; 20 (12):2195-7.

Schoenmakers EF, Bunt J, Hermers L, et al. Identification of CUX1 as the recurrent chromosomal band 7q22 target gene in human uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(1):11-23.

Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468.

Shimizu T, Kubovcakova L, Nienhold R, Zmajkovic J, Meyer SC, Hao-Shen H, Geier F, Dirnhofer S, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Feenstra JD, Kralovics R, Orkin SH, Skoda RC. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1479-96.

Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doedens M, Medeiros JJ, Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ; HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown AM, Yousif F, Trinh QM, Stein LD, Minden MD, Wang JC, Dick JE. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):328-33.

Song W-J, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy D-C, Busque I, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM and Gilliland DG. (1999). *Nat. Genet.*, 23, 166–175

Souza MC, Rodrigues CA, Silva MR, Ribeiro J, Tognon R, Castro FA, Simões BP, Souto EX, Chauffaille ML. Application of five prognostic survival scores to primary myelofibrosis in 62 Brazilian patients. *Med Oncol*. 2013;30(2):555.

Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9-16.

Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, Kuhn S, Schauer S, Döhner H, Döhner K. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1217-9.

Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, Gangat N, Fjerza R, Belachew AA, Lasho TL, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014; 124 (16):2507-13.

Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, Belachew AA, Pancrazzi A, Wassie EA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Vannucchi AM. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1494-500.

Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Begna KH, Naseema Gangat, Pardanani A, Vannucchi AM. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018 Jul;32(7):1631-1642.

Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M, Mai M, McClure RF, Gilliland DG, Levine RL, Pardanani A, Vannucchi AM. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1302-9.

Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-

negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1472-7. doi: 10.1038/leu.2014.3.

Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, Pacilli A, Hanson CA, Pancrazzi A, Ketterling RP, Mannarelli C, Barraco D, Fanelli T, Pardanani A, Gangat N, Vannucchi AM. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016 Nov 22;1(1):21-30.

Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the Mayo Clinic experience. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 25–33

Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol*. 2015 Apr;1(1):97-105. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.89. PMID: 26182311.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, BlooMFPIeld CD, Vardiman JW. 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 Aug 15;110(4):1092-7.

Tiedt R., Hao-Shen H., Sobas M. A., Looser R., Dirnhofer S., Schwaller J., Skoda R. C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111, 3931–3940.

Tsuchida N, Ryder T, Ohtsubo E. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science*. 1982 Sep 3;217(4563):937-9.

Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):667-679.

Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo M, Van Roy N et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2010; 42: 338–342.

Van Vlierberghe P, Patel J, Abdel-Wahab O, Lobry C, Hedvat CV, Balbin M et al. PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 130–134.

Vannucchi AM. Management of myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:222-30.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008 Jul;22(7):1299-307. doi: 10.1038/leu.2008.113.

Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31.

Yamashita, Y. et al. *Oncogene* 29, 3723–3731 (2010).

Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987 Nov;6(11):3341-51.

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach

T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.

Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):10-3.

Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):701-18.

Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD . Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* 2000; 14: 973–990.

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22788-92.

## 8. APÊNDICES

Tabela de mutações encontradas no NGS

GENE	CDS	AA	ID PACIENTE	NM	VAF (%)	COSMIC	dbSNP
ASXL1	c.1771_1772insA	p.Tyr591fs	#5	NM_015338.5	22,2	COSM3720601	
	c.2384_2384delC	p.Trp796fs	#23	NM_015338.5	23,2	COSM97085	
	c.2077C>T	p.Arg693Ter	#23	NM_015338.5	1,5	COSM51388	
	c.1934dup	p.G646fs*12	#10	NM_015338.5	8,1	COSM34210	
	c.2077C>T	p.Arg693ter	#24	NM_015338.5	47,0	COSM51388	
	c.2491_2492insT	p.Asp832fs	#2	NM_015338.5	14,1		
	c.1934dup	p.G646fs*12	#19	NM_015338.5	16,2	COSM34210	
	c.2134_2155delGCCATGTC CAGAGCTAGGAGAG	p.Ala712fs	#9	NM_015338.5	18,3		
ATRX	c.5081A>G	p.Asn1694Ser	#27	NM_000489.4	8,3	COSM488630	
	c.3904_3904delA	p.Arg1302f4	#7	NM_000489.4	15,4	COSM144226	
CBL	c.1169A>T	p.Asp390Val	#2	NM_005188.3	16,9	COSM132872	
	c.2270_2270delC	p.Ala757fs	#3	NM_005188.3	47,9		
CUX	splicesite_3		#3	NM_181552.3	4,9		
DNMT3A	c.2204A>C	p.Tyr735Ser	#4	NM_022552.4	48,7	COSM133126	
EZH2	c.1949T>C	p.Ile650Thr	#1	NM_004456.4	43,4		
	c.2069G>A	p.Arg690His	#5	NM_004456.4	5,6	COSM52980	
	c.2050C>T	p.Arg684Cys	#19	NM_004456.4	0,6	COSM53005	
	c.2018A>G	p.Asn673Ser	#20	NM_004456.4	3,6		
	c.1403G>C	p.Cys468Ser	#20	NM_004456.4	23,5		
	c.1978G>A	p.Gly660Arg	#21	NM_004456.4	47,8	COSM53027	
IDH1	c.395G>A	p.Arg132His	#2	NM_005896.3	12,2	COSM28746	
	c.394C>T	p.Arg132Cys	#20	NM_005896.3	20,0	COSM28747	

	c.629G>A	p.Ser210Asn	#32	NM_005896.3	5,0	COSM1291423	
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	p.Val617Phe	#5	NM_004972.3	23,5	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#1	NM_004972.3	9,2	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#2	NM_004972.3	41,7	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#3	NM_004972.3	54,3	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#8	NM_004972.3	43,8	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#6	NM_004972.3	81,8	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#7	NM_004972.3	64,3	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#10	NM_004972.3	98,4	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#11	NM_004972.3	64,3	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#12	NM_004972.3	10,5	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#13	NM_004972.3	35,4	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#14	NM_004972.3	60,2	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#15	NM_004972.3	100,0	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#16	NM_004972.3	16,7	COSM12600	
	c.1849G>T	p.Val617Phe	#18	NM_004972.3	98,7	COSM12600	
<i>KIT</i>	c.2040_2040delT	p.Leu682fs	#4	NM_000222.2	16,7		
	c.2446G>A	p.Asp816Asn	#8	NM_000222.2	48,4	COSM1313	
<i>KMT2A</i>	c.9335G>T	p.Ser3112Ile	#22	NM_001197104.1	49,1		
<i>KRAS</i>	c.34G>A	p.Gly12Ser	#1	NM_033360.3	1,0	COSM517	
<i>MPL</i>	c.1544G>T	p.Trp515Leu	#30	NM_005373.2	46,2	COSM18918	
<i>PTPN11</i>	c.236A>G	p.Gln79Arg	#1	NM_002834.3	15,7	COSM5879378	
	c.794G>A	p.Arg265Gln	#9	NM_002834.3	48,6	COSM1948751	
	c.922A>G	p.Asn308Asp	#20	NM_002834.3	8,6	COSM24612	
<i>RUNX1</i>	c.404G>A	p.Gly135Asp	#7	NM_001754.4	14,3	COSM444420	
	c.601C>T	p.Arg201Ter	#31	NM_001754.4	47,7	COSM186279	

<i>SF3B1</i>	c.1998G>T	p.Lys666Asn	#3	NM_012433.2	68,5	COSM131557		
<i>TET2</i>	c.3788G>A	p.Cys1263Tyr	#2	NM_001127208.2	42,6	COSM4383918		
	c.4757C>A	p.Ser1586Ter	#2	NM_001127208.2	5,7	COSM110784		
	c.4172_4173delGCinsAT	p.Gly1391Asp	#3	NM_001127208.2	46,2			
	c.3646C>T	p.Arg1216Ter	#4	NM_001127208.2	45,4	COSM42029		
	c.688_689insT	p.Ser231fs	#8	NM_001127208.2	43,6	COSM9312277		
	c.2692G>T	p.Gly898Ter	#19	NM_001127208.2	86,5	COSM87108		
	c.2905C>T	p.Gln969Ter	#22	NM_001127208.2	34,8	COSM7908496		
	c.3811_3812insG	p.Cys1271fs	#31	NM_001127208.2	100,0	COSM5879024		
	splicesite_3			#11	NM_001127208.2	25,0	COSM87141	
	<i>TP53</i>	c.734G>A	p.Gly245Asp	#6	NM_000546.5	44,8	COSM43606	
c.569_569delC		p.Pro190fs	#7	NM_000546.5	12,5	COSM44454	rs1597368891	
c.455_455delC		p.Pro152fs*18	#19	NM_000546.5	96,6	COSM43792		
c.817C>T		p.Arg273Cys	#21	NM_000546.5	61,8	COSM10659		
c.437G>A		p.Trp146Ter	#25	NM_000546.5	89,6	COSM43609		
<i>U2AF1</i>	c.470A>C	p.Gln157Pro	#1	NM_006758.2	42,9	COSM211534		
	c.470A>C	p.Gln157Pro	#30	NM_006758.2	44,0	COSM144988		
<i>ZRSR2</i>	splicesite_5		#1	NM_005089.3	90,5			