



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CROMOSSOMA FILADÉLFIA NEGATIVAS – do diagnóstico ao prognóstico**

Adalberto Nuno Santos Cardoso

---

**JULHO'2018**



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

### **CROMOSSOMA FILADÉLFIA NEGATIVAS –**

### **do diagnóstico ao prognóstico**

Adalberto Nuno Santos Cardoso

**Orientado por:**

Dra. Blanca Polo Guerrero

---

**JULHO'2018**

## RESUMO

As neoplasias mieloproliferativas cromossoma de Filadélfia negativas (NMP-Ph<sup>-</sup>) são patologias hematopoiéticas crônicas caracterizadas pela expansão clonal de células mielóides maduras, de linhagem diferente consoante o subtipo de doença. Com a revisão da classificação das neoplasias mielóides crônicas pela OMS em 2016, a subcategoria das NMP-Ph<sup>-</sup> inclui a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE), Mielofibrose primária (MFP) e Mielofibrose primária pré-fibrótica (pre-MFP). A história natural destas doenças é caracterizada por uma hematopoiese extramedular e complicações trombohemorrágicas, sendo que os eventos potencialmente mais graves são a evolução para mielofibrose ou a transformação em leucemia mielóide aguda. A informação genômica tem tido um papel principal na descoberta das mutações promotoras dos mecanismos fisiopatológicos destas patologias, tendo começado com a descoberta das mutações da tirosina cinase JAK2 (mutação JAK2<sup>V617F</sup> e no exão 12), no gene do recetor da trombopoietina (MPL) e diferentes tipos de mutações do gene da calreticulina (CALR).<sup>(9)</sup> O surgimento das técnicas de nova geração na sequenciação de genes, permitiu a identificação de novas mutações adicionais, nomeadamente em genes envolvidos na regulação epigenética ou sinalização intracelular, mas que não são específicas das NMP-Ph<sup>-</sup>. Foi já identificada uma assinatura de “alto risco molecular” em doentes com MFP, composta por mutações em cinco genes (ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2) que predizem pior sobrevivência global e risco aumentado de transformação leucémica. Veremos de que forma estas alterações genéticas contribuem e influenciam o prognóstico dos doentes com NMP-Ph<sup>-</sup>, e como a informação de variáveis clínicas e/ou moleculares é utilizada na elaboração dos modelos de prognóstico. O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas; cromossoma Filadelfia negativas; fatores de risco; prognóstico; estratificação do risco;

## ABSTRACT

Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms (MPN-Ph<sup>-</sup>) are chronic myeloproliferative neoplasms characterized by clonal expansion of an abnormal hematopoietic progenitor cell, of different myeloid lineage depending on the disease subtype. With the 2016's WHO revised classification of chronic myeloid neoplasms, MPN-Ph<sup>-</sup> is an operational subcategory which includes Polycythemia vera (PV), Essential thrombocythemia, Primary myelofibrosis (PMF), and prefibrotic Primary myelofibrosis (pre-PMF). Their natural history is characterized by extramedullary hematopoiesis, thrombo-hemorrhagic complications, but the most potentially aggressive events are a propensity to transform into myelofibrosis and leukemic transformation into acute myeloid leukemia. Genomic information has played a major role in the discovery of principal pathogenetic driver mutations of MNP-Ph<sup>-</sup>, beginning with the JAK2 tyrosine kinase (JAK2<sup>V617F</sup> and exon 12), thrombopoietin receptor gene (MPL) and different types of calreticulin's gene mutations (CALR). The development of next generation sequencing has allowed the identification of several additional acquired mutations in Ph-negative MPNs, namely epigenetics regulators, intracellular signaling, or spliceosome genes', however these mutations are not restricted to MNP-Ph<sup>-</sup>. A “high molecular risk” signature was recently identified in patients with PMF, composed by mutations in five genes (ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2), who have significantly shorter overall survival and enhanced risk of transformation to acute leukemia. We shall see how these genetic alterations affect and determine the MNP-Ph<sup>-</sup> patients' prognosis, and how this information is translated into prognostic models. This Final Work expresses the author's opinion and not that of FML.

Keywords: myeloproliferative neoplasms; Philadelphia chromosome negative; risk factors; prognosis; risk stratification;

## Lista de abreviaturas:

<b>CALR</b>	Mutação gene calreticulina
<b>HMR</b>	<i>High molecular risk</i>
<b>HR</b>	<i>Hazard ratio</i>
<b>IWG-MRT</b>	<i>International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment</i>
<b>JAK2</b>	<i>Janus Kinase 2</i>
<b>JAK2<sup>V617F</sup></b>	Mutação V617F no gene da <i>Janus Kinase 2</i>
<b>LMA/AML</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>LMC</b>	Leucemia mielóide crónica
<b>MFP/PMF</b>	Mielofibrose primária
<b>MF-PPV</b>	Mielofibrose pós-Policitemia vera
<b>MF-PTE</b>	Mielofibrose pós-Trombocitemia essencial
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MPL</b>	Mutação gene recetor da trombopoietina
<b>NMP</b>	Neoplasias mieloproliferativas
<b>NMP-Ph<sup>-</sup></b>	Neoplasias mieloproliferativas cromossoma de Filadélfia negativas
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>pre-MFP</b>	Mielofibrose primária pré-fibrótica
<b>PV</b>	Policitemia vera
<b>SG</b>	Sobrevivência global
<b>SLL</b>	Sobrevivência livre leucemia
<b>TE/ET</b>	Trombocitemia essencial
<b>TL</b>	Transformação leucémica
<b>TN</b>	Triplo negativo

## Índice

INTRODUÇÃO.....	2
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO .....	4
FATORES DE PROGNÓSTICO .....	6
Policitemia Vera .....	6
Trombocitemia essencial .....	8
Mielofibrose primária .....	10
Transformação mielofibrótica .....	14
Transformação leucémica.....	16
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO .....	18
Policitemia vera e Trombocitemia essencial .....	18
Mielofibrose primária .....	19
BIBLIOGRAFIA .....	21
ANEXOS .....	26

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos tem havido diversa investigação na área das neoplasias mieloproliferativas (NMP), nomeadamente sobre a leucemia mielóide crónica (LMC).<sup>(1)</sup> O progresso clínico noutros tipos de NMP têm sido mais limitado, mas tem havido novos avanços, nomeadamente terapêuticos, em algumas patologias.<sup>(2)</sup>

O sistema de classificação dos tumores hematopoiéticos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi recentemente revisto. As NMP cromossoma de Filadélfia negativas (NMP-Ph<sup>-</sup>), também designadas por

“BCR-ABL1 negativas”, é uma subcategoria operacional do grupo das NMP, que inclui a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE), Mielofibrose primária (MFP) e Mielofibrose Primária pré-fibrótica (pre-MFP).<sup>(3)</sup> (ver tabela 1)

As NMP-Ph<sup>-</sup> são patologias hematopoiéticas crónicas caracterizadas pela expansão clonal de células progenitoras hematopoiéticas mielóides, de linhagem diferente consoante o subtipo de doença, de forma independente dos mecanismos de regulação e que não apresentam displasia.<sup>(4)</sup>

A PV é uma patologia caracterizada por um aumento da massa de eritrócitos, que está associada principalmente à proliferação de células estaminais da linhagem eritroide da medula óssea (MO).<sup>(5)</sup> A TE caracteriza-se pela expansão clonal da linhagem megacariocítica na MO e contagem elevada de plaquetas no sangue periférico.<sup>(6)</sup> A MFP apresenta um fenótipo heterogéneo, que se caracteriza pela proliferação anormal de megacariócitos, fibrose da medula óssea e citopenias variáveis.<sup>(7)</sup>

### Chronic myeloid neoplasms

<b>1 Myeloproliferative neoplasms (MPN)</b>
Chronic myeloid leukemia (CML), <i>BCR-ABL1</i> <sup>+</sup>
Chronic neutrophilic leukemia (CNL)
Polycythemia vera (PV)
Primary myelofibrosis (PMF)
PMF, prefibrotic/early stage
PMF, overt fibrotic stage
Essential thrombocythemia (ET)
Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)
MPN, unclassifiable
<b>2 Mastocytosis</b>
<b>3 Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, or <i>FGFR1</i>, or with <i>PCM1-JAK2</i></b>
Myeloid/lymphoid neoplasms with <i>PDGFRA</i> rearrangement
Myeloid/lymphoid neoplasms with <i>PDGFRB</i> rearrangement
Myeloid/lymphoid neoplasms with <i>FGFR1</i> rearrangement
<i>Provisional entity: Myeloid/lymphoid neoplasms with <i>PCM1-JAK2</i></i>
<b>4 Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)</b>
Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)
Atypical chronic myeloid leukemia (aCML), <i>BCR-ABL1</i> <sup>-</sup>
Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)
MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis (MDS/MPN-RS-T)
MDS/MPN, unclassifiable
<b>5 Myelodysplastic syndromes (MDS)</b>
MDS with single lineage dysplasia
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)
MDS-RS and single lineage dysplasia
MDS-RS and multilineage dysplasia
MDS with multilineage dysplasia
MDS with excess blasts
MDS with isolated del(5q)
MDS, unclassifiable
<i>Provisional entity: Refractory cytopenia of childhood</i>
<b>6 Myeloid neoplasms with germ line predisposition</b>

**Tabela 1:** Classificação OMS 2016 das neoplasias mielóides, in Tefferi *et al* (2017)<sup>(10)</sup>

A história natural destas doenças é marcada por uma predileção da hematopoiese extramedular, pela presença de complicações trombohemorrágicas, e a evolução para mielofibrose ou sofrerem uma transformação leucémica (TL).<sup>(8)</sup>

A informação genómica tem tido um papel principal na descoberta de mutações promotoras dos mecanismos fisiopatológicos das NMP-Ph<sup>-</sup>. Esse conhecimento tem evoluído bastante nos últimos 13 anos, desde a descoberta da mutação V617F no gene JAK2 (JAK2<sup>V617F</sup>) em 2005. Desde então, outras mutações somáticas têm sido identificadas, tais como as alterações recorrentes no gene do recetor da trombopoietina (MPL), mutações do exão 12 no gene JAK2, e mais recentemente em 2013, diferentes tipos de mutações do gene da calreticulina (CALR).<sup>(9)</sup> Estas mutações são consideradas as mutações clássicas do fenótipo da doença, uma vez que a expressão destes genes mutados em células da linhagem mielóide, provoca um crescimento acelerado ou independente da ação de citocinas nessas células, que é identificado nos doentes com NMP-Ph<sup>-</sup>.<sup>(8)</sup>

A mutação JAK2 está presente na maioria das NMP-Ph<sup>-</sup>, sendo que a JAK2<sup>V617F</sup> está presente em 95% dos doentes com PV e em 50-60% dos doentes com TE e MFP, enquanto que a mutação JAK2 do exão 12 em 3% dos doentes com PV e ausente na TE e MFP. Cerca de 20-30% dos doentes com TE e MFP são caracterizados pela presença da mutação CALR e 3-5% pela mutação MPL. Os restantes 5-10% dos casos de TE e MFP não apresentam nenhuma destas mutações, e representam um subgrupo denominado “triplo negativo” (TN).<sup>(9)</sup>

No entanto, o ambiente mutacional das NMP-Ph<sup>-</sup> é bastante mais complexo, e inúmeras novas mutações adicionais têm sido encontradas em genes envolvidos na regulação epigenética, sinalização intracelular ou na “maquinaria” de *splicing* dos genes. Estas mutações adicionais, tanto podem ocorrer num período precoce da evolução da doença, como num estadio mais tardio.<sup>(4)</sup>

Para a realização deste trabalho foi feita uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos publicados na PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com vista à realização de uma revisão bibliográfica sobre o tema das NMP-Ph<sup>-</sup>, com especial incidência nos fatores de prognóstico destas patologias. Pretende-se que este trabalho represente uma ferramenta de auxílio à decisão clínica na área das NMP-Ph<sup>-</sup>, focando aspetos relativos aos critérios de diagnóstico, prognóstico e estratificação de risco.

## CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO

Em 2001 a OMS introduziu critérios de diagnóstico na classificação das NMP-Ph<sup>-</sup>, que foram atualizados em 2008, passando a incluir as mutações genéticas moleculares (JAK2 e MPL) para além dos critérios laboratoriais e morfológicos (ver tabela 1 em anexo). Da aplicação destes critérios emergiu uma nova epidemiologia clínica de doentes com NMP-Ph<sup>-</sup>.<sup>(3)</sup> A classificação da OMS das NMP-Ph<sup>-</sup> foi novamente atualizada em 2016 (ver tabela 2 e 3).

<i>Polycythemia vera (PV)<sup>a</sup></i>	<i>Essential thrombocythemia (ET)<sup>b</sup></i>
<i>Major criteria</i>	
1 Hemoglobin > 16.5 g/dL (men) Hemoglobin > 16.0 g/dL (women) or Hematocrit > 49% (men) Hematocrit > 48% (women) or increased red cell mass (RCM) <sup>c</sup>	Platelet count $\geq 450 \times 10^9/L$
2 BM biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) including prominent erythroid, granulocytic and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (differences in size)	BM biopsy showing proliferation mainly of the megakaryocyte lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes with hyperlobulated nuclei. No significant left-shift of neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers <sup>d</sup>
3 Presence of <i>JAK2</i> or <i>JAK2</i> exon 12 mutation	Not meeting WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i> + CML, PV, PMF, MDS, or other myeloid neoplasms
4	Presence of <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> or <i>MPL</i> mutation
<i>Minor criteria</i>	
1 Subnormal serum erythropoietin level	Presence of a clonal marker (e.g., abnormal karyotype) or absence of evidence for reactive thrombocytosis

<sup>a</sup>PV diagnosis requires meeting either all three major criteria or the first two major criteria and one minor criterion  
<sup>b</sup>ET diagnosis requires meeting all four major criteria or first three major criteria and one minor criterion  
<sup>c</sup>More than 25% above mean normal predicted value  
<sup>d</sup>Grading of BM fibers

**Tabela 2:** Critérios diagnósticos da OMS 2016 para PV e TE, in Barbui *et al* (2018)<sup>(12)</sup>

As principais alterações introduzidas em 2016 nos critérios diagnóstico foram:

1. Introdução de novos fatores moleculares, nomeadamente a mutação CALR, nos critérios major de diagnóstico da TE, pre-MFP e MFP;<sup>(10)</sup>
2. Inclusão da morfologia da MO como critério major de diagnóstico; (ver tabela 4)
3. Diminuição do limiar dos valores de hemoglobina e hematócrito no diagnóstico da PV. Estes novos valores de *cut-off* permitem fazer melhor a distinção entre TE com mutação JAK2 e PV, introduzindo o conceito de PV “mascarada” (tipo de PV que inicialmente se apresenta como TE, mas que depois se revela como verdadeira PV);<sup>(12)</sup>

Primary myelofibrosis (PMF) <sup>a</sup>	
Prefibrotic/early PMF (pre-PMF)	Overt PMF
<i>Major criteria</i>	
1 Megakaryocytic proliferation and atypia <sup>b</sup> , without reticulin fibrosis > grade 1 <sup>c</sup> , accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Megakaryocyte proliferation and atypia <sup>b</sup> accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2 Not meeting WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i> + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i> + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3 Presence of <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , or <i>MPL</i> mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker <sup>d</sup> or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis <sup>e</sup>	Presence of <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , or <i>MPL</i> mutation or in the absence, the presence of another clonal marker <sup>d</sup> or absence of evidence for reactive BM fibrosis <sup>f</sup>
<i>Minor criteria</i>	
1 Presence of one or more of the following, confirmed in two consecutive determinations:	Presence of one or more of the following confirmed in two consecutive determinations:
• Anemia not attributed to a comorbid condition	• Anemia not attributed to a comorbid condition
• Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$	• Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$
• Palpable splenomegaly	• Palpable splenomegaly
• LDH level above the upper limit of the institutional reference range	• LDH level above the upper limit of the institutional reference range
	• Leukoerythroblastosis

**Tabela 3:** Critérios diagnósticos da OMS 2016 para MFP e pre-MFP, in Barbui *et al* (2018) <sup>(12)</sup>

Grading	
MF-0	Scattered linear reticulin with no intersections (crossovers) corresponding to normal BM
MF-1	Loose network of reticulin with many intersections, especially in perivascular areas
MF-2	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections, occasionally with focal bundles of thick fibers mostly consistent with collagen, and/or focal osteosclerosis*
MF-3	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections and coarse bundles of thick fibers consistent with collagen, usually associated with osteosclerosis*

**Tabela 4:** Classificação da fibrose da MO, in Passamonti *et al* (2016) <sup>(11)</sup>

apresentar fibrose da reticulina, e nesta situação pode apresentar um fenótipo típico da TE;<sup>(11)</sup>

- distinção entre pre-MFP e MFP com base no grau de fibrose da reticulina (grau  $\leq 1$  para pre-MFP e grau  $\geq 2$  para MFP). Estes avanços na caracterização da MO permitiram reconhecer a pre-MFP como uma entidade autónoma em relação à MFP;<sup>(12)</sup>
- reconhecimento da PV com baixos níveis de hemoglobina;<sup>(10)</sup>

Esta melhoria da acuidade diagnóstica das NMP-Ph<sup>-</sup> trazida pela classificação da OMS em 2016, tem influência no *outcome* e prognóstico dos doentes, como veremos mais adiante. No entanto, ainda hoje persiste alguma discussão em relação a estes novos critérios de diagnóstico.<sup>(12)</sup>

## FATORES DE PROGNÓSTICO

Para as diferentes NMP-Ph<sup>-</sup> podemos identificar diferentes fatores de prognóstico, quer de natureza clínica (ver tabela 5), quer de natureza molecular (ver tabela 2 em anexo).

PV	ET	PMF
Age >60	Age >60	Age >65
Prior history of thrombosis	Prior history of thrombosis	Hemoglobin <10 g/dL
Leukocytosis (WBC $\geq 15 \times 10^9/L$ )	Leukocytosis (WBC $\geq 11 \times 10^9/L$ )	Leukocyte count >25,000/mL
Abnormal karyotype		Circulating blast cells $\geq 1\%$
Increased bone marrow fibrosis (grade $\geq 1$ )	Splenomegaly	Presence of constitutional symptoms
Splenomegaly		Unfavorable karyotype <sup>a</sup>
		Platelet count <100,000/mL
		Transfusion need
		Bone marrow fibrosis grade $\geq 2$

<sup>a</sup> Unfavorable karyotype includes complex karyotype or one or two abnormalities that include +8, -7/7q-, -5/5q-, 12p-, inv.(3), or 11q23

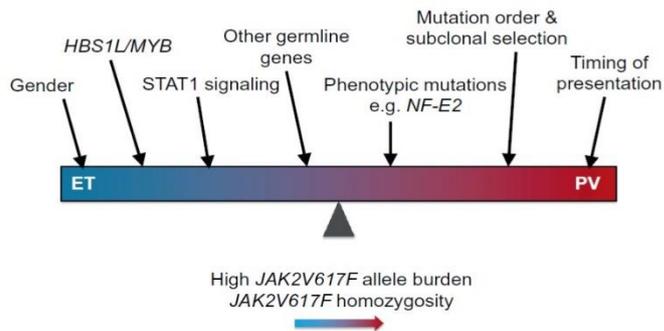
**Tabela 5:** Listagem de fatores clínicos de prognóstico adverso na PV, TE e MFP, *in* Zhou *et al* (2017) <sup>(14)</sup>

### Policitemia Vera

A maior complicação dos doentes com PV é o risco aumentado de ocorrência de eventos trombóticos (venosos ou arteriais). As causas de morte mais comuns são eventos cardiovasculares, tumores sólidos e TL.<sup>(13)</sup>

Os fatores de risco clínicos independentes para a SG são: idade > 60 anos e história prévia de eventos trombóticos.<sup>(14)</sup> <sup>(15)</sup> O risco de complicações trombóticas é significativamente reduzido quando é atingido um valor do hematócrito < 45%.<sup>(16)</sup>

Como já vimos anteriormente, cerca 95% dos doentes com PV tem mutação JAK2<sup>V617F</sup>, enquanto que cerca de 3% da população negativa para esta mutação, apresenta uma mutação no exão 12 do gene JAK2. Ao contrário da mutação <sup>V617F</sup>, a mutação no exão 12 é específica da PV.<sup>(17)</sup>



**Figura 1:** Continuum fenotípico entre PV e TE ( $JAK2^{V617F+}$ ) in Grinfeld *et al* (2017) <sup>(5)</sup>

da linhagem eritroide/megacariocítica e granulocítica/macrofágica.<sup>(5)</sup>

Os doentes com mutação  $JAK2^{V617F}$  não aparentam ter uma diferença significativa no risco de trombose, transformação de doença ou sobrevivência global (SG) quando comparados com a mutação  $JAK2^{V617F}$ .<sup>(17)</sup>

Em 2005, um estudo mostrou que os pacientes com TE  $JAK2^{V617F+}$  apresentavam maior risco de transformação da doença.<sup>(18)</sup> Estudos subsequentes verificaram que a TE ( $JAK2^{V617F+}$ ) tinha características clínicas similares a uma forma ligeira de PV. Ao apresentarem também semelhanças ao nível do perfil biológico, poder-se-á apontar para um modelo em que as duas patologias formam um *continuum*, com o fenótipo preciso a ser determinado por um conjunto de variáveis.<sup>(18)</sup> (ver Figura 1)

Inicialmente os estudos dividiam os doentes com PV como heterozigóticos para mutação  $JAK2^{V617F}$  quando apresentam <50% alelos com mutações, e homozigóticos quando essa percentagem era >50% (medição era realizada com recurso ao ADN granulócitos). No entanto, estudos subsequentes analisaram a carga de alelos mutantes como uma variável contínua, e verificaram que uma maior carga de alelos  $JAK2^{V617F}$  era associada com um fenótipo mais agressivo da PV.<sup>(5)</sup> O género do doente é um fator independente no que diz respeito a variabilidade da carga mutacional  $JAK2^{V617F}$ , em que as mulheres têm uma menor carga mutacional que os homens.<sup>(19)</sup>

Os percursos homozigóticos para  $JAK2^{V617F}$  estão presentes em aproximadamente 80% doentes com PV.<sup>(20)</sup> No entanto, dados mais recentes apontam para o facto de que a aquisição de homocigotia não é suficiente para desenvolver o fenótipo de PV, pelo que existirá um passo mais importante que provoca a expansão clonal de uma dessas colónias.<sup>(20)</sup>

Vários estudos analisaram os efeitos celulares na mutação  $JAK2^{V617F}$  nas populações de células hematopoiéticas (em diferentes estádios de diferenciação), e concluíram que esta estava associada a um aumento de células progenitoras

As mutações JAK2 na linha germinativa, que afetam gene <sup>V617</sup> (<sup>V617I</sup>), podem ser causa de trombocitose hereditária, mas parecem ter menos consequências na função da JAK2 do que a mutação <sup>V617F</sup>.<sup>(21)</sup> No entanto, há um haplótipo constitucional específico JAK2, designado 46/1 e que está presente na linha germinativa, que está fortemente associado ao desenvolvimento de NMP-Ph<sup>-</sup> JAK2<sup>V617F+</sup>, bem como ao aumento da carga dos alelos JAK2<sup>V617F</sup> ao longo do tempo.<sup>(22)</sup>

O desenvolvimento de técnicas de sequenciação genética de nova geração permitiu a identificação de várias mutações adicionais nas NMP-Ph<sup>-</sup> (ver Tabela 6). Apesar de não serem específicas das NMP-Ph<sup>-</sup>, poderão ser a explicação que faltava na promoção da expansão clonal das colónias com mutação JAK2. As mutações TET2 e DNMT3A foram identificadas em doentes com PV em que não havia precursores JAK2<sup>V617F</sup> homozigóticos.<sup>(23)</sup>

Tefferi *et al* (2016) identificou que cerca de 53% dos doentes com PV tinham uma ou mais mutações para além da mutação JAK2. As mutações mais frequentes encontradas foram TET2 e ASXL1. As mutações ASXL1, SRSF2 e IDH2 (com uma prevalência combinada de 15%) estavam associadas a menor SG (mediana 7.7 vs. 16.9 anos).<sup>(24)</sup> (ver Figura 2 em anexo)

Gene	PV (%)	ET (%)	MF (%)	Blast phase (%)
<i>LNK</i> [240-242]	25*	0-7	0-6	10
<i>TET2</i> [105,243,244]	10-16	<5	7-17	17-32
<i>DNMT3A</i> [245-247]	3-7	<5	2-15	14-17
<i>ASXL1</i> [247-250]	2-7	<5	13-32	18-33
<i>SRSF2</i> [251-254]	<5	<5	6-17	19-33
<i>EZH2</i> [249,255,256]	<5	<5	7-13	<5
<i>CBL</i> [147,247,257-259]	<5	<5	0-8	6-9
<i>IDH1/2</i> [260,261]	<5	<5	<5	9-22
<i>SF3B1</i> [247,252,262]	<5	<5	<5	<5

\*JAK2-negative idiopathic erythrocytosis.

**Tabela 6:** Frequências das outras mutações adicionais nas NMP-Ph<sup>-</sup> além JAK, MPL e CALR, *in* Grinfeld *et al* (2017)<sup>(5)</sup>

com ambas as mutações JAK2 e TET2, a aquisição da mutação JAK2 anterior à mutação TET2 aumentava a probabilidade de expressão de um fenótipo de PV em vez TE. Também se correlacionava com uma maior proporção de clones homozigóticos para JAK2<sup>V617F</sup> e aumento do risco trombótico.<sup>(25)</sup>

### Trombocitemia essencial

As mutações JAK2<sup>V617F</sup>, CALR e MPL estão presentes em aproximadamente 85% dos doentes com TE, com frequências respetivas de 58%, 23% e 4%.<sup>(14)</sup>

Num estudo conduzido pelo IWG-MRT foram identificados como fatores de risco para a SG: idade >60 anos, leucocitose  $\geq 11 \times 10^9/L$  e história prévia de eventos trombóticos.<sup>(26)</sup> Noutro estudo do mesmo grupo, a presença de fatores de risco cardiovasculares ou da mutação JAK2<sup>V617F</sup> tinham um risco acrescido para ocorrência eventos trombóticos.<sup>(27)</sup>

Aproximadamente 5-25% dos doentes com TE tem esplenomegalia na altura do diagnóstico.<sup>(14)</sup> Andriani *et al* (2016) verificou que doentes com esplenomegalia eram mais jovens, predominantemente do sexo masculino e apresentavam uma carga superior do alelo JAK2<sup>V617F</sup>. Esses doentes tinham uma maior taxa de eventos trombóticos, em relação àqueles que não apresentavam esplenomegalia (15.7% vs. 8.6%,  $p=0.003$ ), e risco cumulativo para trombose a 5 anos também superior (9.8% vs. 4.4%,  $p=0.012$ ).<sup>(28)</sup>

Haider *et al* (2016) registou que doentes com esplenomegalia tinham eventos trombóticos mais precocemente, mas que este fator não tinha impacto na SG.<sup>(29)</sup>

Uma meta-análise realizada em doentes com TE, em 2015, mostrou que o risco de trombose é quase duas vezes superior em doentes com a mutação JAK2<sup>V617F</sup>, em relação aos doentes sem essa mutação (OR 1.83-1.92). E que esse risco tanto era acrescido para eventos trombóticos de origem arterial como venosa.<sup>(30)</sup>

Num estudo retrospectivo, a homozigotia para a mutação JAK2<sup>V617F</sup> foi considerado como fator de risco independente para a recorrência de eventos trombóticos (HR 6.15), enquanto que o risco foi semelhante entre doentes heterozigóticos e *wild type*.<sup>(31)</sup>

Outra mutação que afeta estes doentes, é a mutação MPL, que está presente em 3-15% dos casos.<sup>(6)</sup> Em relação ao risco trombótico estima-se que a incidência cumulativa a 5 anos seja à volta de 9%.<sup>(32)</sup> Num estudo de cohort prospetivo, as mutações MPL não foram preditivas da ocorrência de tromboses, hemorragias *major*, transformação mielofibrótica ou tiveram impacto na SG.<sup>(33)</sup>

Mais recentemente foram descobertas mutações no gene da calreticulina (CALR), que está presente em 67-71% dos doentes com TE sem mutações JAK2<sup>V617F</sup> e MPL. A calreticulina é uma proteína que desempenha um papel importante na proliferação celular, diferenciação e apoptose. As mutações ocorrem no exão 9, e consistem numa deleção 52-bp (mutação CALR tipo 1) ou numa inserção 5-bp (mutação CALR tipo 2). Em resultado destas alterações há um aumento da ativação da via JAK-STAT.<sup>(6)</sup> (ver figura 1 em anexo)

Na TE a frequência da mutação CALR tipo 1 é de 49% e CALR tipo 2 é de 34%. A mutação CALR tipo 1 está associada a um fenótipo de mielofibrose e alto risco de transformação da TE, enquanto que a de tipo 2 revela um quadro clínico mais indolente, com baixa propensão para transformação mielofibrótica e eventos trombóticos.<sup>(9)</sup>

Klampfl *et al* (2013) identificou uma vantagem na SG dos doentes com TE e mutação CALR, comparativamente aos doentes com mutação JAK2<sup>V617F</sup>.<sup>(34)</sup>

Tefferi *et al* (2014) observa que a diferença na mediana da SG dos doentes com TE e mutação JAK2 (19 anos) ou CALR (20 anos) não é significativa (p=0.32).<sup>(35)</sup>

Os doentes com TE e carga mutacional elevada para CALR apresentam um fenótipo mais proliferativo. Foi encontrada também uma correlação positiva com aumento da frequência de esplenomegalia e maior propensão para transformação em mielofibrose.<sup>(9)</sup>

Em relação às várias mutações adicionais presentes nas NMP-Ph<sup>-</sup>, Tefferi *et al* (2016) identificou como mais frequentes na TE as mutações TET2 e ASXL1, e as mutações com prognóstico adverso SH2B3, SF3B1, U2AF1, TP53, IDH2 e EZH2, (prevalência combinada de 15%) que estão associadas a uma diminuição da SG (mediana 9 vs. 22 anos).<sup>(24)</sup> (ver Figura 3 em anexo)

Algumas mutações como TET2, IDH1/2, DNMT3A, TP53 e N/Kras parecem ocorrer preferencialmente nos últimos estádios do curso da doença.<sup>(6)</sup>

## Mielofibrose primária

A MFP tem o pior prognóstico de entre as NMP-Ph<sup>-</sup>, com sobrevivência média estimada em cerca de 6 anos. As principais causas de morte devem-se a infeções e hemorragias resultantes da falência progressiva da MO.<sup>(14)</sup>

A grande variabilidade fenotípica da MFP deve-se largamente à grande heterogeneidade do seu painel mutacional.<sup>(7)</sup> A complicação potencialmente mais séria da MFP é a TL, podendo evoluir para LMA em cerca de 10-20% dos doentes.<sup>(14)</sup>

A maioria dos doentes com MFP, cerca de 90%, têm pelo menos uma das mutações promotoras clássicas: JAK, CALR e MPL. A mutação JAK2<sup>V617F</sup> é a mais frequente (50-60%), seguida pela mutação CALR (25-30%) e por último a MPL (3-5%).<sup>(14)</sup> (ver tabela 7). A relevância fenotípica das mutações promotoras está bem estabelecida. A mutação JAK2<sup>V617F</sup> está associada a uma idade avançada, enquanto que os doentes com mutações CALR apresentam menor idade.<sup>(36)</sup>

Mutation	Mutational frequency	Phenotypic implications	Prognostic implications
JAK2V617F	50–60%	Older age Higher hemoglobin level Higher WBC count Lower PLT count Highly thrombophilic	Compared with CALR+, MPL+, and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival
CALR	20–25% overall Up to 74% cases of JAK2/MPL unmutated	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F+ and triple-negative cohorts (type 1/2 variants confounded): Lower DIPPS plus scores Lower rates leukemic transformation Superior overall survival
CALR type 1/like Exon 9, 52-bp deletion	~70% of CALR mutations	Compared with JAK2V617F+: Younger age Less frequent anemia Less frequent leukocytosis Higher PLT count	Compared with JAK2V617F/CALR type 2/ MPL-mutated or triple-negative: Superior overall survival
CALR type 2/like Exon 9, 5-bp insertion	~15% of CALR mutations	Compared with CALR type 1+: Higher WBC count Higher circulating blast%	Compared with CALR type 1+: Higher DIPPS plus scores Inferior overall survival
MPL Predominantly MPLW515L and W515K	6–7%	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F+, CALR+ and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival
Triple-negative	10–15%	Older age Lower hemoglobin level Lower WBC count Lower PLT count Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F/CALR/ MPL+ cohorts: Higher IPSS scores Higher rates leukemic transformation and inferior overall survival

**Tabela 7:** Sumário das mutações promotoras clássicas, e suas implicações prognósticas na MFP. in Szuber *et al* (2018) <sup>(7)</sup>

O grau de fibrose da MO não era previamente descrito como fator de prognóstico. Guglielmelli *et al* (2016) constatou que um grau de fibrose  $\geq 2$  estava associado com incidentes adversos como anemia, leucopenia, trombocitopenia, sintomas constitucionais e esplenomegalia mais extensa. Doentes com alto grau de fibrose tinham maior probabilidade de ter as mutações somáticas ASXL1 e EZH2, as quais têm um efeito deletério na SG. O grau de fibrose predizia a SG dos doentes, independentemente do seu *status* mutacional.<sup>(37)</sup>

Li *et al* (2016) também verificou que o grau de mielofibrose constituía um fator de risco independente da SG em doentes com MFP. Os doentes com grau mielofibrose 2 e 3 tinham uma taxa de mortalidade superior à dos doentes com mielofibrose grau 0 e 1 (31.2% vs. 13.1%,  $p < 0.001$ ).<sup>(38)</sup>

Enquanto que a homozigoticidade para JAK2<sup>V617F</sup> é a mais comum em doentes com PV, a carga mutacional do alelo JAK2<sup>V617F</sup> é extremamente baixa em células estaminais hematopoiéticas. Na MFP ou mielofibrose pós-PV/TE esse valor é mais elevado.<sup>(39)</sup>

Uma carga mutacional baixa do alelo JAK2<sup>V617F</sup> tem sido associada a menor SG e sobrevivência livre leucemia (SLL) nos doentes com MFP. No entanto, enquanto alguns estudos têm associado a presença mutação JAK2<sup>V617F</sup> a pior SG e a um risco mais

elevado de TL, outros apresentam resultados contraditórios, defendendo que a mutação é muitas vezes perdida na progressão para a fase blástica da doença.<sup>(39)</sup>

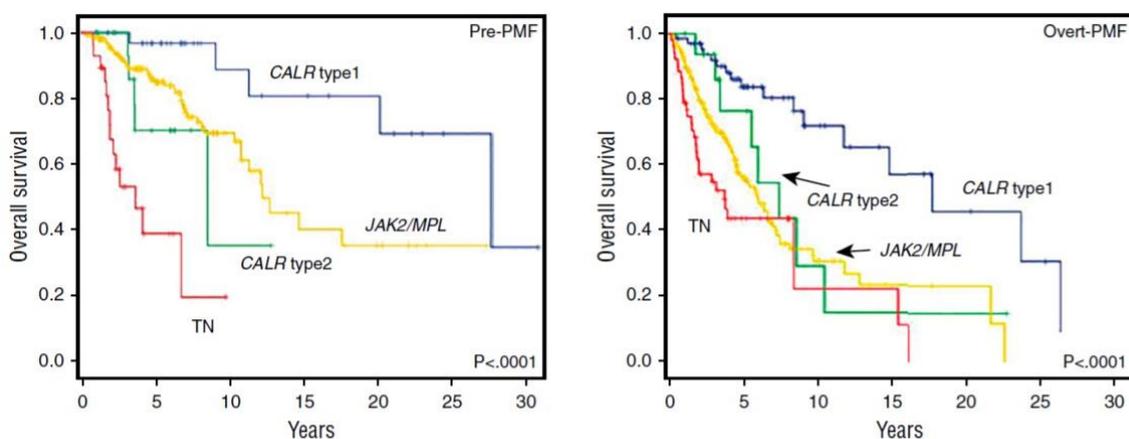
Uma nova investigação mostrou que, a idade avançada e a carga mutacional do alelo  $JAK2^{V617F} \geq 50\%$  estão associados a níveis plasmáticos aumentados da proteína C-reativa e a um padrão de progressão da doença. Estes dados sugerem uma potencial relação entre a frequência do alelo mutado, um microambiente inflamatório e a evolução da MFP.<sup>(40)</sup>

De facto, a MFP tem sido considerada com uma “fase acelerada” das NMP-Ph<sup>-</sup>. A evidência científica existente suporta que a aquisição da mutação  $JAK2^{V617F}$  é um evento tardio na história natural das NMP-Ph<sup>-</sup>.<sup>(41)</sup>

A mutação MPL em doentes com MFP ocorre frequentemente no gene  $W515L/K$ , e é de forma geral mutuamente exclusiva em relação à mutação  $JAK2^{V617F}$ .<sup>(39)</sup>

A mutação CALR foi descoberta em 56-88% dos doentes com MFP sem mutação  $JAK2/MPL$ . Todas as mutações CALR descritas até à data, tipo 1 e 2, parecem ser também mutuamente exclusivas das mutações  $JAK2^{V617F}$  e MPL.<sup>(34)</sup> A frequência da mutação CALR tipo 1 é de 66% e de 12% na de tipo 2.<sup>(9)</sup>

Em dois grandes estudos de doentes com MFP, verificou-se que a mediana da SG era de 17.7 anos com a mutação CALR, de 9.2 anos com a mutação  $JAK2$ , 9.1 anos com mutação MPL e de apenas 3.2 anos nos doentes TN. Ambos demonstraram um efeito favorável da mutação CALR na SG e SLL, e que os doentes pertencentes ao grupo TN tinham a pior SG e SLL.<sup>(42) (43)</sup> Na figura 2 podemos ver a variação das curvas de SG, em relação às mutações  $JAK2/MPL/CALR$  e TN.<sup>(44)</sup>



**Figura 2:** Impacto das mutações promotoras clássicas na SG, *in* Guglielmelli *et al* (2017)<sup>(44)</sup>

Uma meta-análise que analisou o impacto do tipo de mutação CALR na SG, demonstrou que os doentes com mutações CALR tipo 2 têm pior SG em relação aos doentes com mutações CALR tipo 1 (HR 1.8,  $p=0.046$ ).<sup>(45)</sup>

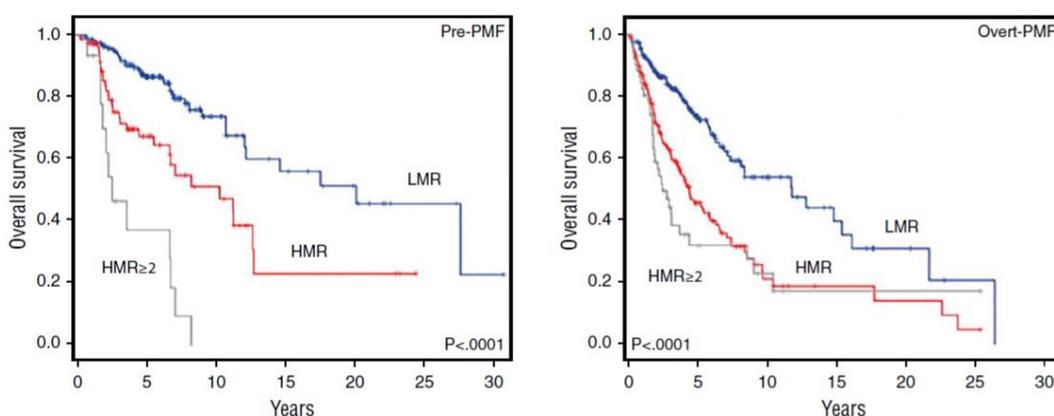
Outra meta-análise em doentes com MFP e mutação JAK2 ou CALR, evidenciou que os doentes com mutação CALR tinham menor risco de desenvolver esplenomegalia (OR 0.47) e eventos trombóticos (OR 0.52), mas não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao risco de TL.<sup>(46)</sup>

Vannucchi *et al* (2013) desenvolveu uma assinatura de “alto risco molecular” (HMR) num estudo em doentes com MFP. As mutações ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2 predizem pior SG. Pelo que, os doentes com MFP que apresentem mutações em qualquer um destes cinco genes, passam a pertencer à categoria de HMR.<sup>(47)</sup> (ver figura 3)

As mutações CALR mostraram um impacto favorável na SG, não obstante o número de mutações de prognóstico negativo, como as mutações HMR.<sup>(48)</sup>

Tefferi *et al* (2014) mostrou que, o impacto favorável das mutações CALR na SG dos doentes com MFP era independente da idade, mas que esse prognóstico era modificável pela presença da mutação ASXL1: era desfavorável na presença da mutação e favorável na sua ausência. Pelo que, o perfil mutacional CALR<sup>-</sup>/ASXL1<sup>+</sup> foi reconhecido como especialmente prejudicial.<sup>(43)</sup>

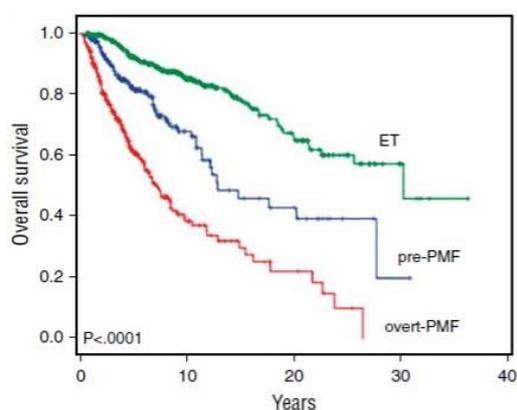
Em relação às mutações adicionais, Tefferi *et al* (2016) identificou que as mais frequentes eram ASXL1, TET2 e SRSF2. As mutações ASXL1, SRSF2, CBL e KIT (com uma prevalência combinada de 60%) estavam associadas a menor SG (mediana 3,6 vs. 8,5 anos).<sup>(36)</sup> (ver Figura 4 em anexo)



**Figura 3:** Impacto das mutações HMR na SG, *in* Guglielmelli *et al* (2017)<sup>(44)</sup>

A mutação U2AF1 foi fortemente associada com anemia e trombocitopenia em doentes com MFP, tendo sido validada como um marcador negativo do prognóstico clínico.<sup>(49)</sup> Barraco *et al* (2016) verificou que a mutação U2AF1 estava associada a pior SG quando comparada com doentes sem essa mutação (mediana SG 3.75 anos vs. 5.74 anos,  $p < 0.0001$ ). No entanto, quando a análise desses resultados foi ajustada para a idade e anemia, essa diferença perdeu significância estatística ( $p = 0.24$ ).<sup>(50)</sup>

Como vimos anteriormente, a nova classificação da OMS de 2016 passou a considerar uma nova categoria: a Mielofibrose Primária pré-fibrótica (pre-MFP). Quando comparados com a MFP, os doentes com pre-MFP são geralmente mais novos, do sexo feminino e exibem um fenótipo mieloproliferativo mais acentuado.<sup>(44)</sup>



**Figura 4:** Curvas de OS em doentes com MFP, pre-MFP e TE, in Guglielmelli *et al* (2017)<sup>(44)</sup>

Há a ideia da existência de um *continuum* fenotípico da pre-MFP à MFP. A MFP está geralmente associada à presença de uma maior incidência de citopenias, maior quantidade de blastos em circulação, um quadro sintomático agravado e maior incidência de esplenomegalia. A sobrevida global dos doentes com MFP é significativamente inferior em comparação com os da pre-MFP.<sup>(51)</sup> Os doentes com pre-

MFP parecem ter maior incidência de eventos trombóticos e hemorrágicos do que os doentes com TE, e também pior SG.<sup>(52)</sup> (ver figura 4).

Não foram encontradas diferenças no perfil mutacional entre a MFP e pre-MFP, no que diz respeito à frequência das mutações promotoras clássicas JAK2/CALR/MPL. Em relação às mutações dos genes pertencentes à categoria HMR, elas são mais frequentes nos doentes com MFP.<sup>(44)</sup>

### Transformação mielofibrótica

Cerca 5-30% dos doentes com PV e TE podem evoluir para formas secundárias de mielofibrose como parte da sua história natural de doença, conhecidas por mielofibrose pós-PV (MF-PPV) e mielofibrose pós-TE (MF-PTE).<sup>(53)</sup>

A mielofibrose PPV e PTE apresenta características típicas de MFP: diminuição contagem periférica de elementos hematopoiéticos por falência da MO, e hematopoiese

extramedular, geralmente associada a uma esplenomegalia significativa.<sup>(54)</sup> Tanto os achados histopatológicos, como os mecanismos fisiopatológicos e as anormalidades do microambiente da MO (incluindo neoangiogênese e osteosclerose) são muito semelhantes nas formas primária e secundária de mielofibrose.<sup>(55)</sup>

A mediana de tempo até à transformação em MF-PPV e MF-PTE é de 7-20 anos desde o diagnóstico de PV/TE. Os valores de incidência cumulativa a 15 anos da MF-PPV e MF-PTE de que há registo, são de 5-14% para a PV e 1.6-9% para TE.<sup>(54)</sup> Apesar de existirem múltiplos fatores identificados como podendo influenciar a taxa de transformação mielofibrótica, o fator de risco mais consistentemente mencionado é leucocitose  $>15 \times 10^9/L$ .<sup>(56)</sup>

Há poucos estudos que se tenham focado especificamente nas formas secundárias de mielofibrose, pelo que ainda subsistem algumas dúvidas sobre de que modo o seu curso clínico diverge da MFP, e quais as variáveis que o influenciam. Em relação ao prognóstico, há evidência que a aplicação do International Prognostic Score System (IPSS) usado como rotina na MFP, não tem tido resultados satisfatórios nas formas secundárias de mielofibrose.<sup>(57)</sup>

Masarova *et al* (2017) comparou as características clínicas e *outcomes* de 1099 doentes com MF-PPV, MF-PTE e MFP. Em relação às frequências das mutações JAK2<sup>V617F</sup>, MPL<sup>W515</sup> e CALR, verificou que a sua distribuição era semelhante entre os doentes com MF-PPV e MF-PTE. A mediana da carga mutacional do alelo JAK2 era maior nos doentes com MF-PPV ( $p < 0.001$ ), mas sem qualquer impacto na SG. A frequência de doentes com mutações MPL era superior na MF-PTE em relação à TE (9.7% vs. 2-4%). Em linha com resultados anteriores verificados em doentes com MFP, apurou que o grupo com a mutação CALR tinha o prognóstico mais favorável e o grupo TN o pior prognóstico. E em relação à carga mutacional CALR, esta era significativamente superior nos doentes com MF-PTE em relação aos doentes com TE. Embora a natureza retrospectiva deste último resultado deva ser analisado com precaução, poderá investigar-se no futuro se a acumulação de mutações nos alelos CALR terá algum papel na progressão da TE para MF-PTE.<sup>(54)</sup>

Tefferi *et al* (2016) identificou que as mutações com impacto significativo na sobrevivência livre de mielofibrose eram: SRSF2 na PV, SF3B1 e U2AF1 na TE.<sup>(24)</sup>

## Transformação leucémica

Vários fatores de risco clínicos e genéticos já foram identificados como sendo úteis no prognóstico da transformação leucémica (TL) nas NMP-Ph<sup>-</sup>. (ver Tabela 8).

O risco de TL nas NMP-Ph<sup>-</sup> depende da sua variante, sendo mais alta na MFP com uma incidência de 10-20% nos primeiros 10 anos de doença, menor na PV com risco estimado em 3% a 10 anos e 8% a 20 anos, e a mais baixa regista-se na TE, com um risco inferior a 1% nos primeiros 10 anos.<sup>(13)</sup>

A taxas de TL não parecem ser muito diferentes entre MFP e as fases fibróticas da PV ou TE, podendo estas últimas transformarem-se diretamente na fase blástica das NMP-Ph<sup>-</sup>, sem primeiro passarem pela fase fibrótica de doença.<sup>(58)</sup>

A evolução da PV para a mielofibrose ou LMA diminui significativamente a SG. Os fatores de risco para LMA pós-PV são idade >61 anos, fibrose da reticulina, leucocitose  $\geq 15 \times 10^9/L$ , esplenomegalia, cariótipo anormal e mutações TP53 e RUNX1.<sup>(59)</sup>

O papel da mutação JAK2<sup>V617F</sup> na progressão de uma fase crónica da PV para LMA é particularmente complexo. Nos doentes em que a mutação JAK2<sup>V617F</sup> era detetável nos

Risk factors	Essential thrombocytosis	Polycythemia vera	Myelofibrosis
Clinical	Age $\geq 60$ y <sup>27,28</sup> Thrombosis <sup>6</sup>	Age $> 70$ y <sup>29</sup> Age $> 61$ y <sup>17</sup>	Age $> 65$ y <sup>30</sup> Red blood cell transfusion dependency <sup>31</sup>
Laboratory	Platelets ( $\geq 1000 \times 10^9/L$ ) <sup>6,28</sup> Anemia <sup>28,32</sup> Leukocytosis ( $\geq 15 \times 10^9/L$ ) <sup>33,34</sup>	Leukocytes ( $15 \times 10^9$ ) <sup>17</sup>	White blood cells ( $> 30 \times 10^9/L$ ) <sup>35</sup> Platelets ( $< 50 \times 10^9/L$ ) <sup>36</sup> Peripheral blast ( $\geq 3\%$ ) and/or platelets ( $< 100 \times 10^9/L$ ) <sup>37</sup> IL-8, IL-2R <sup>38</sup> C-reactive protein ( $> 7$ mg/L) and peripheral blast ( $> 1\%$ ) <sup>30</sup>
Bone marrow	Prefibrotic primary myelofibrosis morphology, reticulin grading, and bone marrow cellularity <sup>6,34</sup>		Bone marrow blasts ( $\geq 10\%$ ) <sup>36</sup>
Previous therapy		Cytoreductive agents, pipobroman, P32, chlorambucil <sup>39</sup>	
Cytogenetic abnormalities	None	Abnormal karyotype <sup>17</sup>	Abnormal karyotype <sup>35</sup> Chromosome 17 aberrations <sup>36</sup> Monosomal karyotype (1q, 7q, 5q, 6p, 7p, 19q, 22q, and 3q, del17p, -5, -7) and/or complex <sup>40</sup> Unfavorable karyotype (complex karyotype or sole or 2 abnormalities that include +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3), or 11q23 rearrangement) <sup>41,42</sup> Del 17p, -5, -7, and/or complex <sup>43</sup>
Mutations	TP53, EZH2 <sup>33</sup>	SRSF2, IDH2 <sup>33</sup>	Triple-negative mutational status <sup>40</sup> ASXL1, SRSF2, IDH1, or IDH2 <sup>44</sup>

IL-2R = interleukin 2 receptor; IL-8 = interleukin 8.

**Tabela 8:** Fatores de risco para TL na PV, TE e MFP, in Yogarajah *et al* (2017) <sup>(62)</sup>

blastos leucémicos, a evolução da doença deve-se provavelmente ao aumento dos danos causados ao ADN das células e à inibição da apoptose celular.<sup>(5)</sup>

Numa cohort de doentes com PV, Lundberg *et al* (2014) encontrou uma associação entre a mutação TET2 e o aumento das taxas de TL.<sup>(60)</sup> Também em doentes com PV, Tefferi *et al* (2016) identificou as mutações SRSF2 e IDH2 com tendo um impacto significativo na SLL.<sup>(24)</sup>

Na TE um diagnóstico morfológico preciso é crítico na avaliação do risco de TL, pela necessidade de fazer uma correta distinção entre TE e pre-MFP.<sup>(61)</sup> Foram identificados como fatores de risco para TL na TE: idade >65 anos, anemia, trombocitose >1000x10<sup>9</sup>/L e leucocitose ≥15x10<sup>9</sup>/L.<sup>(62)</sup> Tefferi *et al* (2016) examinou o perfil mutacional de doentes com TE, e identificou que as mutações TP53 e EZH2 como fatores de prognóstico adverso na SLL.<sup>(24)</sup>

Os fatores de risco para TL já conhecidos na MFP são: contagem blastos circulantes >3%, plaquetas <100x10<sup>9</sup>/L, leucocitose >30x10<sup>9</sup>/L, necessidade de transfusão de eritrócitos e idade > 65 anos.<sup>(62)</sup> A nível genético, a presença assinatura de HMR referida anteriormente (ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2) ou pertencer ao grupo TN são fator de mau prognóstico, com impacto adverso na SLL.<sup>(47)</sup> Também as mutações RUNX1, CEBPA ou SH2B3 são associadas a um aumento do risco de TL, enquanto que a presença da mutação CALR tipo 1-*like* faz diminuir esse risco.<sup>(36)</sup> Tefferi *et al* (2016) verificou que as mutações SRSF2, RUNX1, CEBPA, SH2B3 estavam associadas a menor SLL (risco a 7 anos de 25% vs. 4%), e que esse efeito era independente do *status* mutacional JAK2/CALR/MPL.<sup>(36)</sup>

# ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO

## Policitemia vera e Trombocitemia essencial

A atual estratificação do risco na PV e TE estão desenhados para estimar a probabilidade de recorrência de eventos trombóticos.<sup>(10)</sup>

Risk stratification in PV and ET based on thrombotic risk

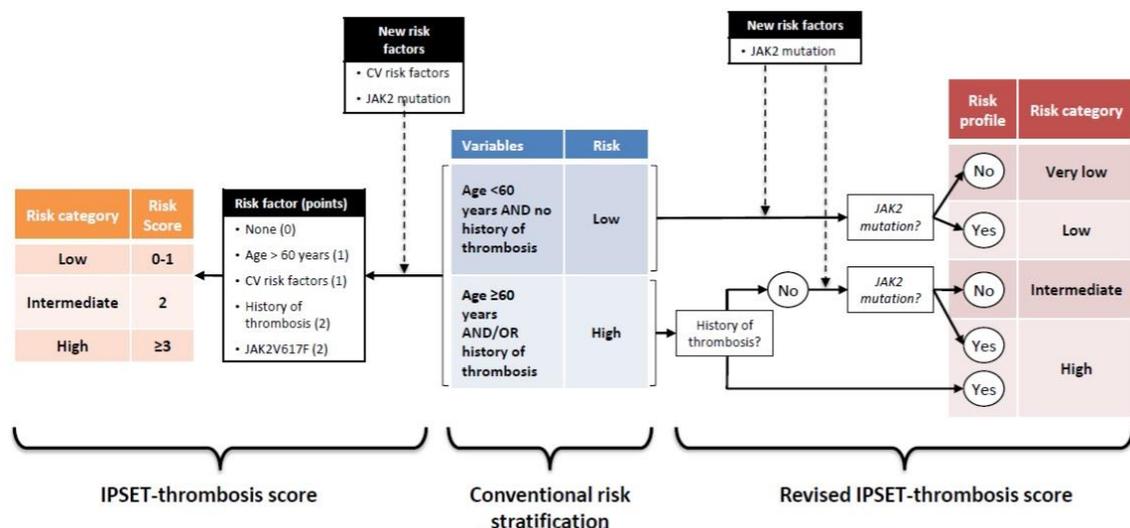
Risk category	Age >60 years or history of thrombosis	Cardiovascular risk factors <sup>a</sup>
Low	No	No
Intermediate	No	Yes
High	Yes	

**Tabela 9:** Modelo estratificação do risco trombótico para PV e TE, in Finazzi G et al (2008)<sup>(67)</sup>

Na PV, a idade e história prévia de trombose são os parâmetros prognósticos utilizados para classificar os doentes na categoria de baixo risco (idade < 60 anos e sem história de trombose) e alto

risco (idade ≥ 60 anos e evento trombótico anterior). Entretanto foi criada uma categoria de risco intermédio (idade <60 anos, sem história de trombose, presença de fatores de risco cardiovasculares), mas que ainda não foi formalmente validada.<sup>(63)</sup> (ver Tabela 9).

Na TE foi criado o modelo prognóstico “IPSET-thrombosis”, que deve ser aplicado em todos os doentes que preencham os critérios diagnósticos definidos na classificação da OMS de 2016. Foram identificados como fatores de risco independentes a idade > 60 anos, história prévia de trombose, presença de fatores de risco cardiovasculares e da mutação JAK2<sup>V617F</sup>.<sup>(27)</sup> Este modelo foi recentemente revisto com base em novas observações e validado externamente numa cohort de doentes com TE, em que apenas a mutação JAK2<sup>V617F</sup> e história de trombose prediziam os eventos trombóticos de modo independente.<sup>(5)</sup> (ver figura 5)

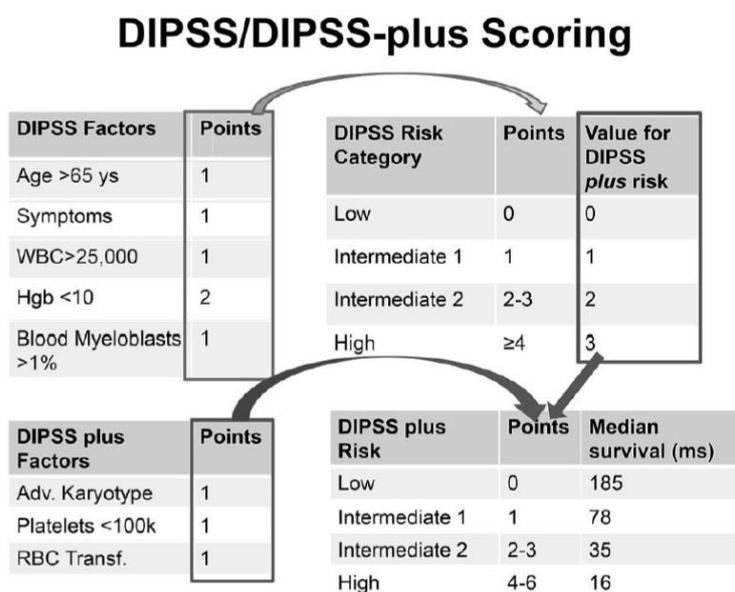


**Figura 5:** Modelo prognóstico IPSET-thrombosis e IPSET-thrombosis revisto, in Falchi et al (2017)<sup>(6)</sup>

Existe um modelo prognóstico que foi desenhado para prever a TL em pacientes com TE. Na estratificação do risco era utilizadas duas variáveis: valor hemoglobina inferior ao normal e contagem de plaquetas  $\geq 1000 \times 10^9/L$ . Eram considerados de baixo risco os doentes sem nenhum dos fatores presentes, de risco intermédio aqueles que apresentassem um dos fatores e na categoria de alto risco os doentes que tivessem ambos.<sup>(64)</sup>

## Mielofibrose primária

Para o prognóstico na MFP, o IPSS que se baseia em variáveis clínicas e hematológicas, é o modelo de prognóstico que se recomenda que seja aplicado a todos os doentes. A integração adicional de informação citogénica e/ou molecular, permitiria obter uma classificação prognóstica melhorada e mais individualizada. O modelo “*Dynamic-IPSS*”



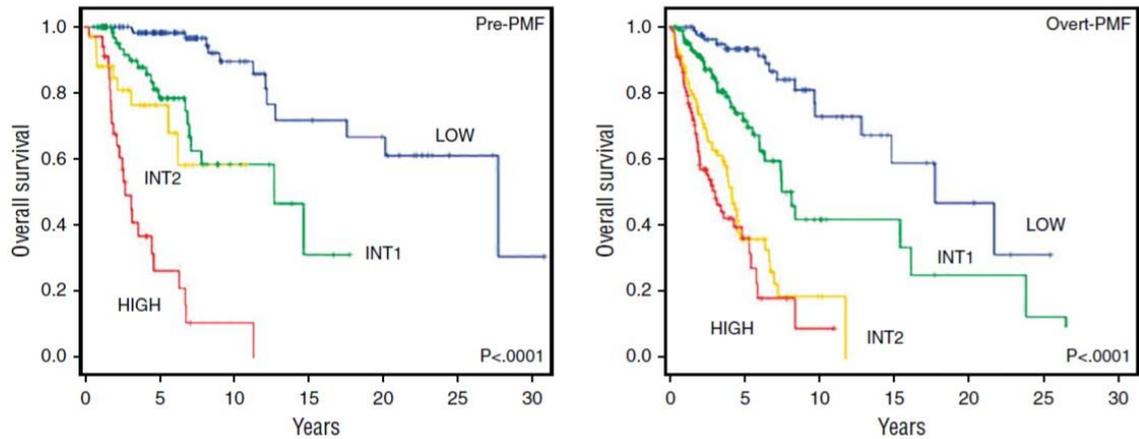
**Figura 6:** Modelo prognóstico DIPSS/DIPSS-plus para MFP, in Salit *et al* (2018)<sup>(69)</sup>

(DIPSS), que possui as mesmas variáveis clínicas e hematológicas do IPSS, ou o DIPSS-plus, que assenta em variáveis clínicas, hematológicas e citogénicas, são os modelos recomendados para reavaliação do prognóstico durante o curso da doença.<sup>(63)</sup> (ver figura 6)

Nos doentes com MFP, é possível hoje identificar duas categorias de risco com base na informação molecular: doentes de alto risco e baixo risco. Pertencem à categoria de baixo risco os doentes em que: estão ausentes as mutações anteriormente identificadas como HMR (ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2) ou outras mutações adversas (SH2B3, RUNX1 ou CEPBA), ou está presente a mutação CALR tipo 1-like. De modo inverso, considera-se como alto risco os doentes em que estão presentes as mutações HMR ou outras de prognóstico adverso, ou está ausente a mutação CALR tipo 1-like.<sup>(39) (65)</sup>

Em doentes candidatos a transplante alogénico de células estaminais, deve ser pesquisada a presença da mutação ASXL1, porque é conhecido que a taxa de sucesso dos transplantes é menor, quando essa mutação está presente.<sup>(66)</sup>

Na figura 7 podemos ver a variação da SG em relação às categorias de risco do IPSS.<sup>(44)</sup>



**Figura 7:** SG em função das categorias de risco do IPSS, *in* Guglielmelli *et al* (2017)<sup>(44)</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, Gambacorti-Passerini C, Saglio G, Cortes J, Daley GQ. (2016) [Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams](#). *Haematologica*. May;101(5):541-58.
2. Mughal TI, Gotlib J, Mesa R, Koschmieder S, Khoury HJ, Cortes JE, Barbui T, Hehlmann R, Mauro M, Saussele S, Radich JP, Van Etten RA, Saglio G, Verstovsek S, Gale RP, Abdel-Wahab O. (2018) [Recent advances in the genomics and therapy of BCR/ABL1-positive and -negative chronic myeloproliferative neoplasms](#). *Leuk Res*. Apr;67:67-74.
3. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. (2016) [The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances](#). *Blood Rev*. Nov;30(6):453-459.
4. Luque Paz D, Chauveau A, Boyer F, Buors C, Samaison L, Cottin L, Seegers V, Férec C, Le Maréchal C, Gueguen P, Lippert E, Ianotto JC, Ugo V. (2017) [Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome](#). *Genes Chromosomes Cancer*. May;56(5):354-362.
5. Grinfeld J, Godfrey AL. (2017) [After 10years of JAK2V617F: Disease biology and current management strategies in polycythaemia vera](#). *Blood Rev*. May;31(3):101-118.
6. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek S. (2017) [Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era](#). *Leukemia*. Sep;31(9):1845-1854.
7. Szuber N, Tefferi A. (2018) [Driver mutations in primary myelofibrosis and their implications](#). *Curr Opin Hematol*. Mar;25(2):129-135.
8. Barbui T, Falanga A. (2016) [Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms](#). *Thromb Res*. Apr;140 Suppl 1:S71-5.
9. Gángó A, Mózes R, Boha Z, Kajtár B, Timár B, Király PA, Kiss R, Fésüs V, Nagy N, Demeter J, Körösmezey G, Borbényi Z, Marton I, Szőke A, Masszi T, Farkas P, Várkonyi J, Plander M, Pósfai É, Egyed M, Pál K, Radványi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpár D, Bödör C. (2018) [Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms](#). *Leuk Res*. Feb;65:42-48.
10. Tefferi A, Barbui T. (2017) [Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management](#). *Am J Hematol*. Jan;92(1):94-108.
11. Passamonti F, Maffioli M. (2016) [Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual](#). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. Dec 2;2016(1):534-542
12. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Orazi A, Tefferi A. (2018) [The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion](#). *Blood Cancer J*. Feb 9;8(2):15.
13. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, Gangat N, Fjerza R, Belachew AA, Lasho TL, Ketterling RP, Hanson CA, Rambaldi A, Finazzi G, Thiele J, Barbui T, Pardanani A, Vannucchi AM. (2014) [Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis](#). *Blood*. Oct 16;124(16):2507-13; quiz 2615.
14. Zhou A, Afzal A, Oh ST. (2017) [Prognostication in Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms: a Review of the Recent Literature](#). *Curr Hematol Malig Rep*. Oct;12(5):397-405.
15. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, Randi ML, Vaidya R, Cazzola M, Rambaldi A, Gisslinger B, Pieri L, Ruggeri M, Bertozzi I, Sulai NH, Casetti I, Carobbio A, Jeryczynski G, Larson DR, Müllauer L, Pardanani A, Thiele J, Passamonti F, Barbui T. (2013) [Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study](#). *Leukemia*. Sep;27(9):1874-81.
16. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Masciulli A, Mennitto MR, Barbui T. (2011) [The CYTO-PV: A Large-Scale Trial Testing the Intensity of CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera](#). *Thrombosis*.2011:794240.
17. Scott LM. (2011) [The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review](#). *Am J Hematol*. Aug;86(8):668-76.

18. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group.; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party.; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group (2005) [Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study.](#) *Lancet.* Dec 3;366(9501):1945-53
19. Stein BL, Williams DM, Wang NY, Rogers O, Isaacs MA, Pemmaraju N, Spivak JL, Moliterno AR. (2010) [Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders.](#) *Haematologica.* Jul;95(7):1090-7.
20. Godfrey AL, Chen E, Pagano F, Silber Y, Campbell PJ, Green AR. (2013) [Clonal analyses reveal associations of JAK2V617F homozygosity with hematologic features, age and gender in polycythemia vera and essential thrombocythemia.](#) *Haematologica.* May;98(5):718-21.
21. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, Leroy E, Harutyunyan AS, Abgrall JF, Favier R, Toussaint A, Solary E, Kralovics R, Constantinescu SN, Najman A, Vainchenker W, Plo I, Bellanné-Chantelot C. (2014) [Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors.](#) *Blood.* Feb 27;123(9):1372-83.
22. Alvarez-Larrán A, Angona A, Martínez-Avilés L, Bellosillo B, Besses C. (2012) [Influence of JAK2 46/1 haplotype in the natural evolution of JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms.](#) *Leuk Res.* Mar;36(3):324-6.
23. Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, Godfrey AL, Grinfeld J, Thakker C, Massie CE, Baxter J, Sewell D, Silber Y, Campbell PJ, Green AR. (2015) [DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype.](#) *Haematologica.* Nov;100(11):e438-42.
24. 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. (2016) [Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia.](#) *Blood Adv.* Nov 22;1(1):21-30.
25. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Döhner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi A, Campbell PJ, Green AR. (2015) [Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms.](#) *N Engl J Med.* Feb 12;372(7):601-612.
26. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Ruggeri M, Randi ML, Gangat N, Vannucchi AM, Gianatti A, Gisslinger B, Müllauer L, Rodeghiero F, d'Amore ES, Bertozzi I, Hanson CA, Boveri E, Marino F, Maffioli M, Caramazza D, Antonioli E, Carrai V, Buxhofer-Ausch V, Pascutto C, Cazzola M, Barbui T, Tefferi A. (2012) [A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment.](#) *Blood.* Aug 9;120(6):1197-201.
27. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A, Vannucchi AM, Tefferi A. (2012) [Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia \(IPSET-thrombosis\).](#) *Blood.* Dec 20;120(26):5128-33; quiz 5252.
28. Andriani A, Latagliata R, Anaclerico B, Spadea A, Rago A, Di Veroli A, Spirito F, Porrini R, De Muro M, Crescenzi Leonetti S, Villivà N, De Gregoris C, Montefusco E, Polverelli N, Santoro C, Breccia M, Cimino G, Majolino I, Mazzucconi MG, Vianelli N, Alimena G, Montanaro M, Palandri F. (2016) [Spleen enlargement is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: Evaluation on 1,297 patients.](#) *Am J Hematol.* Mar;91(3):318-21.
29. Haider M, Gangat N, Hanson C, Tefferi A. (2016) [Splenomegaly and thrombosis risk in essential thrombocythemia: the Mayo Clinic experience.](#) *Am J Hematol.* May;91(5):E296-7.
30. Qin Y, Wang X, Zhao C, Wang C, Yang Y. (2015) [The impact of JAK2V617F mutation on different types of thrombosis risk in patients with essential thrombocythemia: a meta-analysis.](#) *Int J Hematol.* Aug;102(2):170-80.

31. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, Micò C, Tieghi A, Cacciola RR, Santoro C, Vianelli N, Guglielmelli P, Pieri L, Scognamiglio F, Cacciola E, Rodeghiero F, Pogliani EM, Finazzi G, Gugliotta L, Leone G, Barbui T; GIMEMA Chronic Myeloproliferative Neoplasms Working Party (2010) [Increased risk of recurrent thrombosis in patients with essential thrombocythemia carrying the homozygous JAK2 V617F mutation](#). *Ann Hematol.* Feb;89(2):141-6.
32. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, Sant'Antonio E, Ferretti V, Pancrazzi A, Rotunno G, Severgnini M, Pietrelli A, Astori C, Fugazza E, Pascutto C, Boveri E, Passamonti F, De Bellis G, Vannucchi A, Cazzola M; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. (2013) [Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms](#). *Blood.* May 23;121(21):4388-95.
33. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. (2008) [MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort](#). *Blood.* Jul 1;112(1):141-9.
34. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagninski 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. (2013) [Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms](#). *N Engl J Med.* Dec 19;369(25):2379-90.
35. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Gangat N, Wolanskyj AP. (2014) [Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia](#). *Leukemia.* 2014 Dec;28(12):2300-3. doi:10.1038/leu.2014.148
36. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A. (2016) [Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis](#). *Blood Adv.* Nov 30;1(2):105-111.
37. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Rumi E, Rosti V, Delaini F, Maffioli M, Fanelli T, Pancrazzi A, Pieri L, Fjerza R, Pietra D, Cilloni D, Sant'Antonio E, Salmoiraghi S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Barbui T, Cazzola M, Vannucchi AM. (2016) [Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients](#). *Am J Hematol.* Sep;91(9):918-22.
38. Li B, Zhang P, Feng G, Xu Z, Qin T, Zhang Y, Sha Z, Dong D, Zhang H, Fang L, Pan L, Hu N, Qu S, Cai W, Huang G, Xiao Z. (2016) [Bone marrow fibrosis grade is an independent risk factor for overall survival in patients with primary myelofibrosis](#). *Blood Cancer J.* Dec 9;6(12):e505.
39. Bose P, Verstovsek S. (2016) [Prognosis of Primary Myelofibrosis in the Genomic Era](#). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* Aug;16 Suppl:S105-13.
40. Barosi G, Massa M, Campanelli R, Fois G, Catarsi P, Viarengo G, Villani L, Poletto V, Bosoni T, Magrini U, Gale RP, Rosti V. (2017) [Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease](#). *Leuk Res.* Sep;60:18-23.
41. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, Elliott MA, Litzow MR, Hanson CA, Pardanani A. (2010) [JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival](#). *Leukemia.* Jan;24(1):105-9.
42. 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. (2014) [Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis](#). *Blood.* Aug 14;124(7):1062-9.
43. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A. (2014) [CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons](#). *Leukemia.* Jul;28(7):1472-7.

44. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, Maffioli M, Fanelli T, Pancrazzi A, Pietra D, Salmoiraghi S, Mannarelli C, Franci A, Paoli C, Rambaldi A, Passamonti F, Barosi G, Barbui T, Cazzola M, Vannucchi AM; AGIMM Group. (2017) [Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis](#). *Blood*. Jun 15;129(24):3227-3236.
45. Kourie HR, Ameye L, Paesmans M, Bron D. (2017) [Improved survival in patients with CALR1 compared to CALR2 mutated primary myelofibrosis: a meta-analysis](#). *Br J Haematol*. Dec;179(5):846-848.
46. Pei YQ, Wu Y, Wang F, Cui W. (2016) [Prognostic value of CALR vs. JAK2V617F mutations on splenomegaly, leukemic transformation, thrombosis, and overall survival in patients with primary fibrosis: a meta-analysis](#). *Ann Hematol*. Sep;95(9):1391-8.
47. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, Ketterling RP, Rotunno G, Knudson RA, Susini MC, Laborde RR, Spolverini A, Pancrazzi A, Pieri L, Manfredini R, Tagliafico E, Zini R, Jones A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Pietra D, Rumi E, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Tefferi A. (2013) [Mutations and prognosis in primary myelofibrosis](#). *Leukemia*. Sep;27(9):1861-9.
48. 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. (2014) [The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients](#). *Leukemia*. Sep;28(9):1804-10.
49. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Wassie EA, Knudson R, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A. (2014) [U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype](#). *Leukemia*. Feb;28(2):431-3.
50. Barraco D, Elala YC, Lasho TL, Begna KH, Gangat N, Finke C, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. (2016) [Molecular correlates of anemia in primary myelofibrosis: a significant and independent association with U2AF1 mutations](#). *Blood Cancer J*. May 6;6:e416.
51. Mudireddy M, Shah S, Lasho T, Barraco D, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A, Tefferi A. (2017) [Prefibrotic versus overtly fibrotic primary myelofibrosis: clinical, cytogenetic, molecular and prognostic comparisons](#). *Br J Haematol*. Jul 5.
52. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Schalling M, Gleiss A, Schiefer AI, Müllauer L, Thiele J, Kralovics R, Gisslinger H. (2017) [Impact of white blood cell counts at diagnosis and during follow-up in patients with essential thrombocythaemia and prefibrotic primary myelofibrosis](#). *Br J Haematol*. Oct;179(1):166-169.
53. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, Rumi E, Maffioli M, Delaini F, Brogi G, Fanelli T, Pancrazzi A, Pietra D, Bernardis I, Belotti C, Pieri L, Sant'Antonio E, Salmoiraghi S, Cilloni D, Rambaldi A, Passamonti F, Barbui T, Manfredini R, Cazzola M, Tagliafico E, Vannucchi AM, Guglielmelli P. (2016) [Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group](#). *Am J Hematol*. Jul;91(7):681-6.
54. Masarova L, Bose P, Daver N, Pemmaraju N, Newberry KJ, Manshouri T, Cortes J, Kantarjian HM, Verstovsek S. (2017) [Patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera differ from patients with primary myelofibrosis](#). *Leuk Res*. Aug;59:110-116.
55. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). (2008) [Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment](#). *Leukemia*. Feb;22(2):437-8
56. Passamonti F, Rumi E, Caramella M, Elena C, Arcaini L, Boveri E, Del Curto C, Pietra D, Vanelli L, Bernasconi P, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. (2008) [A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis](#). *Blood*. Apr 1;111(7):3383-7.

57. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Gómez M, Boqué C, Ferrer-Marín F, Raya JM, García-Gutiérrez V, Kerguelen A, Xicoy B, Barba P, Martínez J, Luño E, Alvarez-Larrán A, Martínez-López J, Arbelo E, Besses C; Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Filadelfia Negativas. (2014) [The International Prognostic Scoring System does not accurately discriminate different risk categories in patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera myelofibrosis](#). *Haematologica*. Apr;99(4):e55-7.
58. Tefferi A, Mudireddy M, Mannelli F, Begna KH, Patnaik MM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Yogarajah M, De Stefano V, Passamonti F, Rosti V, Finazzi MC, Rambaldi A, Bosi A, Guglielmelli P, Pardanani A, Vannucchi AM. (2018) [Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts](#). *Leukemia*. May;32(5):1200-1210.
59. Cerquozzi S, Tefferi A. (2015) [Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors](#). *Blood Cancer J*. Nov 13;5:e366.
60. 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. (2014) [Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms](#). *Blood*. Apr 3;123(14):2220-8.
61. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, Rodeghiero F, d'Amore ES, Randi ML, Bertozzi I, Marino F, Vannucchi AM, Antonioli E, Carrai V, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Müllauer L, Carobbio A, Gianatti A, Gangat N, Hanson CA, Tefferi A. (2011) [Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study](#). *J Clin Oncol*. Aug 10;29(23):3179-84.
62. Yogarajah M, Tefferi A. (2017) [Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: A Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome](#). *Mayo Clin Proc*. Jul;92(7):1118-1128.
63. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, Verstovsek S, Mesa R, Kiladjan JJ, Hehlmann R, Reiter A, Cervantes F, Harrison C, Mc Mullin MF, Hasselbalch HC, Koschmieder S, Marchetti M, Bacigalupo A, Finazzi G, Kroeger N, Griesshammer M, Birgegard G, Barosi G. (2018) [Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet](#). *Leukemia*. May;32(5):1057-1069.
64. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, Tefferi A. (2007) [Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients](#). *Leukemia*. Feb;21(2):270-6
65. Tefferi A. (2016) [Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management](#). *Am J Hematol*. Dec;91(12):1262-1271.
66. Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, Zabelina T, Trivai I, Araujo Cruz MM, Shahswar R, Ayuk F, Gehlhaar M, Wolschke C, Bollin R, Walter C, Dugas M, Wiehlmann L, Lehmann U, Koenecke C, Chaturvedi A, Alchalby H, Stadler M, Eder M, Christopheit M, Göhring G, Koenigsmann M, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Stocking C, Fehse B, Thol F, Heuser M. (2017) [Impact of Molecular Genetics on Outcome in Myelofibrosis Patients after Allogeneic Stem Cell Transplantation](#). *Biol Blood Marrow Transplant*. Jul;23(7):1095-1101.
67. Finazzi G, Barbui T. (2008) [Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia](#). *Leukemia*. Aug;22(8):1494-502.
68. Saeidi K. (2016) [Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics](#). *Crit Rev Oncol Hematol*. Feb;98:375-89.
69. Salit RB, Deeg HJ. (2018) [Transplant Decisions in Patients with Myelofibrosis: Should Mutations Be the Judge?](#) *Biol Blood Marrow Transplant*. Apr;24(4):649-658.

# ANEXOS

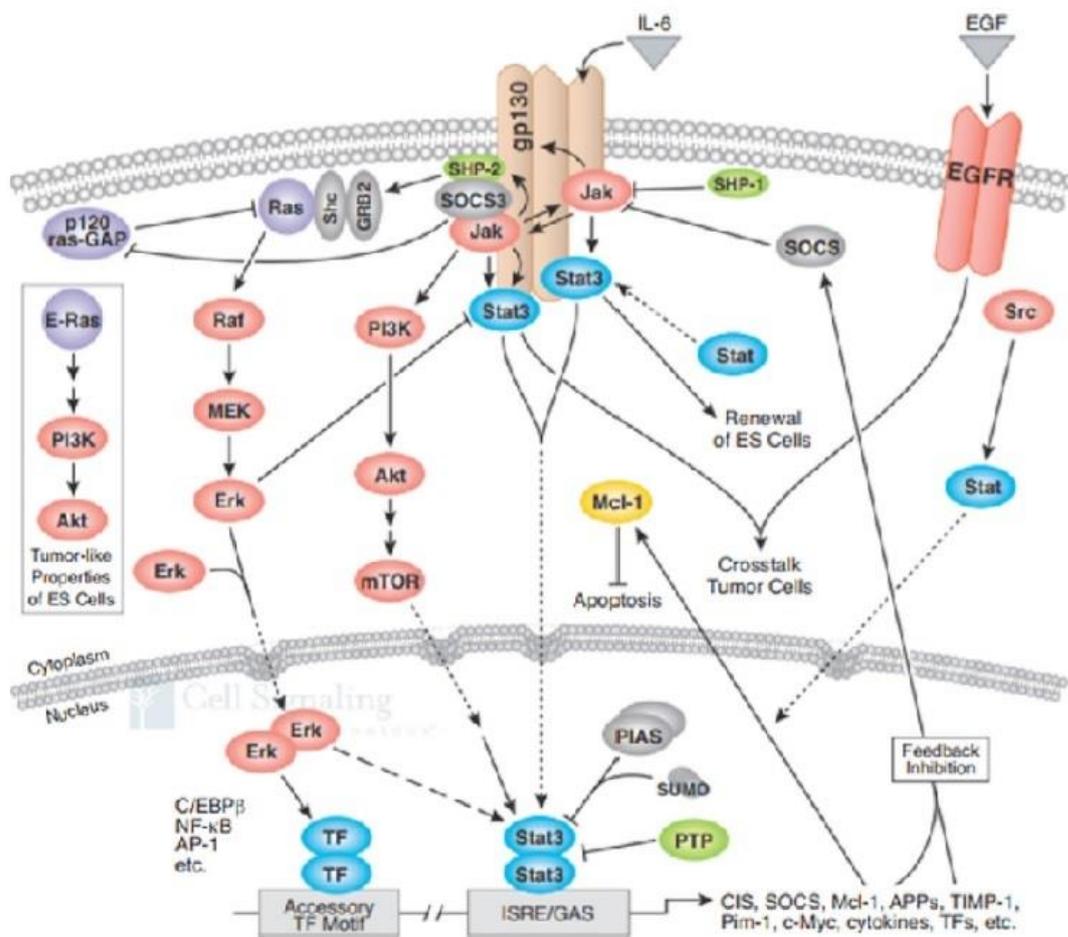
2008 World Health Organization diagnostic criteria for Philadelphia chromosome-negative MPNs.

	Polycythemia vera <sup>a</sup>	Essential thrombocythemia <sup>b</sup>	Primary myelofibrosis <sup>c</sup>
Major criteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hb &gt; 18.5 g/dL for men or &gt; 16.5 g/dL for women or other evidence of increased red blood cell volume<sup>d</sup></li> <li>Presence of <i>JAK2V617F</i> or <i>JAK2</i> exon 12 mutation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Platelet count <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li> <li>BM biopsy showing megakaryocyte proliferation, many with enlarged and mature morphology and no significant increase in granulopoiesis or erythropoiesis</li> <li>Not meeting WHO criteria for PV, PMF, CML, MDS or other myeloid neoplasm</li> <li>Demonstration of <i>JAK2V617F</i> or other clonal marker; in absence of <i>JAK2V617F</i>, no evidence of reactive thrombocytosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Megakaryocyte proliferation and atypia accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis; or in absence of reticulin fibrosis, megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis (i.e., pre-fibrotic PMF)</li> <li>Not meeting WHO criteria for CML, PV, MDS, or other myeloid neoplasm</li> <li>Demonstration of <i>JAK2V617F</i> or other clonal marker; in absence of clonal markers, no evidence of secondary bone marrow fibrosis</li> <li>Leukoerythroblastosis</li> <li>Increased serum lactate dehydrogenase</li> <li>Anemia</li> <li>Palpable splenomegaly</li> </ul>
Minor criteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage proliferation</li> <li>Serum Epo below reference range for normal</li> <li>Endogenous erythroid colony formation in vitro</li> </ul>		

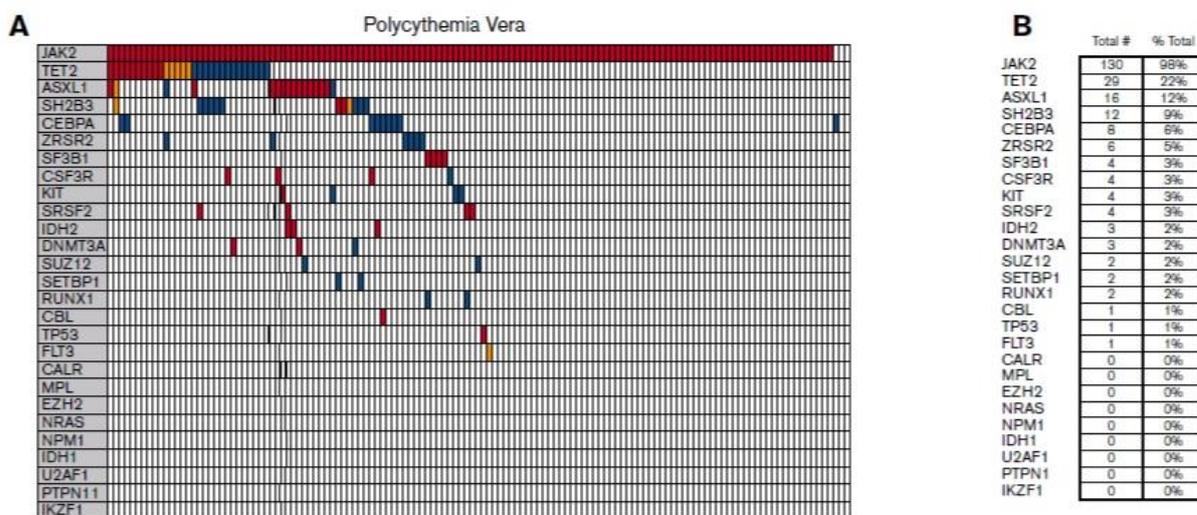
**Tabela 1:** Critérios diagnósticos da OMS 2008 para NMP-Ph<sup>-</sup> in Barbu *et al* (2016) <sup>(3)</sup>

Mutations	Chromosome location	Mutational frequency	Pathogenetic relevance
<i>JAK2</i> (Janus kinase 2) <i>JAK2V617F</i> exon 14 mutation	9p24	PV ~ 96% ET ~ 55% PMF ~ 65%	Contributes to abnormal myeloproliferation and progenitor cell growth factor hypersensitivity
<i>JAK2</i> exon 12 mutation <i>CALR</i> (Calreticulin) Exon 9 deletions and insertions	9p24 19p13.2	PV ~ 3% PMF ~ 25% ET ~ 20% PV 0%	Contributes to primarily erythroid myeloproliferation Wild-type <i>CALR</i> is a multi-functional Ca <sup>2+</sup> binding protein chaperone mostly localized in the endoplasmic reticulum
<b>MPL (Myeloproliferative leukemia virus oncogene)</b> MPN-associated <i>MPL</i> mutations involve exon 10 <i>LNK</i> (as in Links) a.k.a. <i>SH2B3</i> (a membrane-bound adaptor protein) MPN-associated mutations were monoallelic and involved exon 2	1p34 12q24.12	ET ~ 3% PMF ~ 10% PV ~ rare ET ~ rare PMF ~ rare BP-MPN ~ 10%	Contributes to primarily megakaryocytic myeloproliferation Wild-type <i>LNK</i> is a negative regulator of <i>JAK2</i> signaling
<i>TET2</i> (TET oncogene family member 2)  Mutations involve several exons	4q24	PV ~ 16% ET ~ 5% PMF ~ 17% BP-MPN ~ 17%	<i>TET</i> proteins catalyze conversion of 5-methylcytosine (5mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), which favors demethylated DNA. Both <i>TET1</i> and <i>TET2</i> display this catalytic activity. <i>IDH</i> and <i>TET2</i> mutations might share a common pathogenetic effect.
<i>ASXL1</i> (Additional Sex Combs-Like 1)  Exon 12 mutations <i>IDH1/IDH2</i> (isocitrate dehydrogenase) Exon 4 mutations	20q11.1 2q33.3/ 15q26.1	ET ~ 3% PMF ~ 13% BP-MPN ~ 18% PV ~ 2% ET ~ 1% PMF ~ 4% BP-MPN ~ 20%	Wild-type <i>ASXL1</i> is needed for normal hematopoiesis and might be involved in co-activation of transcription factors and transcriptional repression. <i>IDH</i> mutations induce loss of activity for the conversion of isocitrate to 2-ketoglutarate (2-KG) and gain of function in the conversion of 2-KG to 2-hydroxyglutarate (2-HG). 2-HG might be the mediator of impaired <i>TET2</i> function in cells with mutant <i>IDH</i> expression.
<i>EZH2</i> (enhancer of zeste homolog 2) Mutations involve several exons	7q36.1	PV ~ 3% PMF ~ 7% MDS ~ 6%	Wild-type <i>EZH2</i> is part of a histone methyltransferase (polycomb repressive complex 2 associated with H3 Lys-27 trimethylation). MPN-associated <i>EZH2</i> mutations might have a tumor suppressor activity, which contrasts with the gain-of-function activity for lymphoma-associated <i>EZH2</i> mutations.
<i>DNMT3A</i> (DNA cytosine methyltransferase 3a)  Most frequent mutations affect amino acid R882 <i>CBL</i> (Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene) Exon 8/9 mutations	2p23 11q23.3	PV ~ 7% PMF ~ 7% BP-MPN ~ 14% PV ~ rare ET ~ rare MF ~ 6%	DNA methyltransferases are essential in establishing and maintaining DNA methylation patterns in mammals <i>CBL</i> is an E3 ubiquitin ligase that marks mutant kinases for degradation. Transforming activity requires loss of this function.
<i>IKZF1</i> (IKAROS family zinc finger 1) Mostly deletions including intragenic <i>TP53</i> (tumor protein p53) Exons 4 through 9	7p12 17p13.1	CP-MPN ~ rare BP-MPN ~ 19% PMF ~ 4% BP-MPN ~ 27%	<i>IKZF1</i> is a transcription regulator and putative tumor suppressor A tumor suppressor protein that targets genes that regulate cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair.
<i>SF3B1</i> (splicing factor 3B subunit 1) Exons 14 and 15, mostly	2q33.1	PMF ~ 7%	<i>SF3B1</i> is a component of the RNA spliceosome. <i>SF3B1</i> mutations are closely associated with ring sideroblasts.
<i>SRSF2</i> (serine/arginine-rich splicing factor 2) Exon 2	17q25.1	PMF ~ 17%	<i>SRSF2</i> is a component of the RNA spliceosome, whose dysfunction promotes defects in alternative splicing.
<i>U2AF1</i> (U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1)	21q22.3	PMF ~ 16%	<i>U2AF1</i> is subunit of the U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor involved in pre-mRNA processing

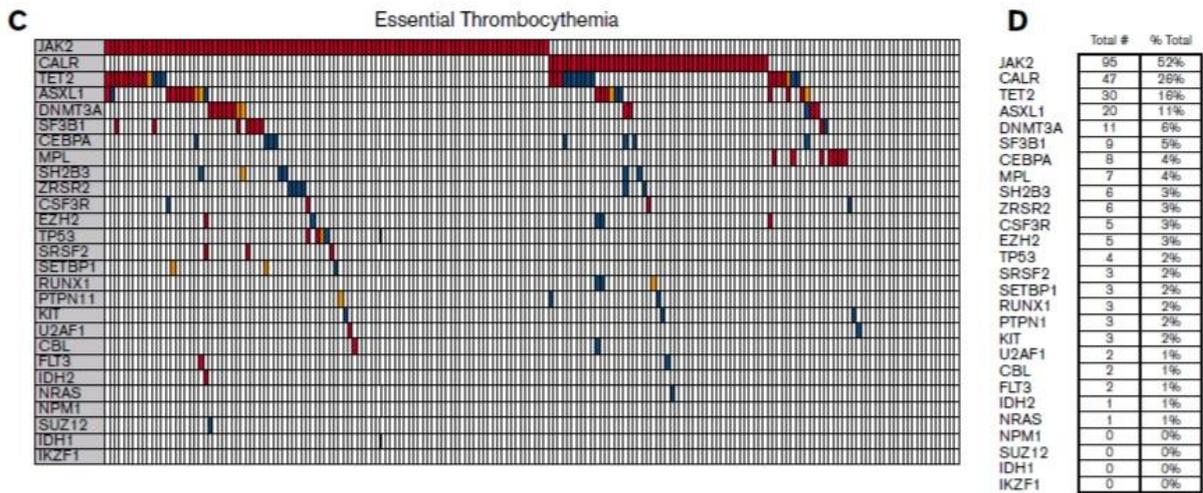
**Tabela 2:** Fatores de prognóstico molecular nas NMP-Ph<sup>-</sup>, in Tefferi, A. (2016) <sup>(65)</sup>



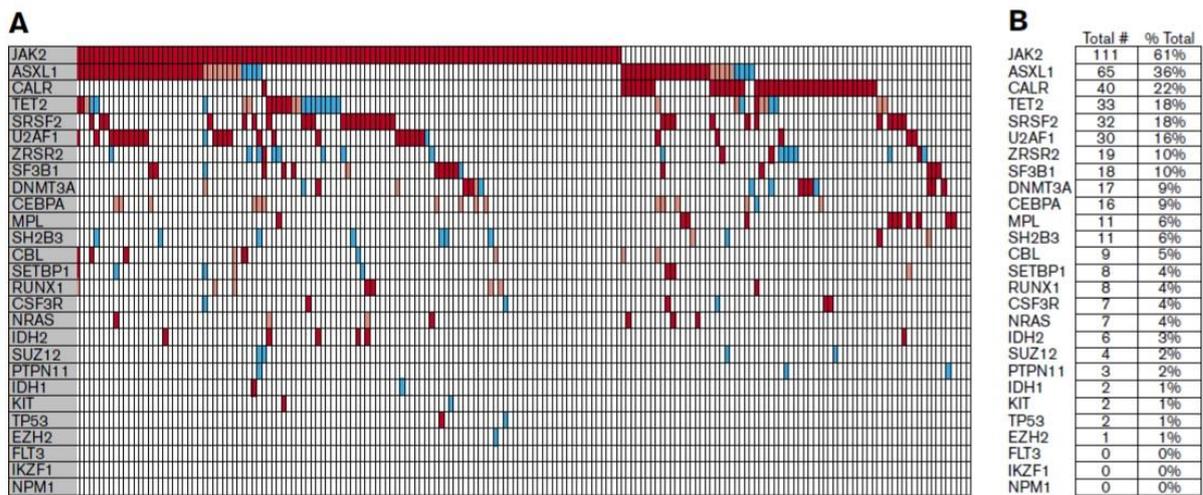
**Figura 1:** Via de sinalização intracelular JAK-STAT, *in* Saeidi, K. (2016) <sup>(68)</sup>



**Figura 2:** Painel com variações nas seqüências de ADN de 27 genes em doentes com PV, *in* Tefferi *et al* (2016) <sup>(24)</sup>



**Figura 3:** Painel com variações nas seqüências de ADN de 27 genes em doentes com TE, in Tefferi *et al* (2016) <sup>(24)</sup>



**Figura 4:** Painel com variações nas seqüências de ADN de 27 genes em doentes com MFP, in Tefferi *et al* (2016) <sup>(36)</sup>